

TESIS DOCTORAL

**FARMACOCINÉTICA CLÍNICA
DE DOXORUBICINA EN
PACIENTES DIAGNOSTICADOS
DE LINFOMA NO HODGKIN**

Jonás Samuel Pérez Blanco



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA - 2016

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

FARMACOCINÉTICA CLÍNICA DE DOXORUBICINA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE LINFOMA NO HODGKIN

Memoria para optar al grado de
Doctor en Farmacia, presentada por:
Jonás Samuel Pérez Blanco

Salamanca, 2016

Las que suscriben, **Dra. M^a José García Sánchez**, Catedrática de Universidad, **Dra. Dolores Santos Buelga** y **Dra. María del Mar Fernández de Gatta García**, Profesoras Titulares del Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

que la investigación incluida en esta Memoria para optar al grado de Doctor, titulada:

**“FARMACOCINÉTICA CLÍNICA DE DOXORUBICINA EN PACIENTES
DIAGNOSTICADOS DE LINFOMA NO HODGKIN”**

ha sido realizada por Jonás Samuel Pérez Blanco, bajo su dirección y supervisión en el Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca, reuniendo las condiciones necesarias para que pueda aspirar con este trabajo a la obtención del Grado de Doctor.

Para que así conste, firman el presente certificado a 30 de enero de 2016.

Fdo. Dra. M^a José García Sánchez

Fdo. Dra. Dolores Santos Buelga

Fdo. Dra. María del Mar Fernández de Gatta García

AGRADECIMIENTOS

Una tesis es un proceso continuo de aprendizaje que te da la oportunidad de enfrentarte a multitud de retos, tanto personales como profesionales. En este camino he tenido la suerte de encontrarme con multitud de personas que me han ayudado a la realización del presente trabajo de tesis, no pudiendo por menos que dedicar unas palabras de agradecimiento a todos ellos.

En primer lugar, quería agradecer a Cote, Dolo y M^a del Mar, mis directoras de tesis, la oportunidad que me brindaron allá por 2010 ofreciéndose a dirigir mi tesis doctoral. Ha sido un privilegio poder aprender de tan grandes doctoras, su disponibilidad y actitud han sido siempre de gran ayuda. Solo puedo intentar expresar mi alegría y orgullo por poderme llamar discípulo vuestro. Gracias por las innumerables lecciones, tanto en el trabajo como en la vida.

Especial mención merece Cote, mi guía más cercana. Su tremendo curriculum profesional no llega a alcanzar su grandeza personal. Su ímpetu, alegría y fortaleza han hecho que todos los momentos compartidos hayan sido disfrutados desde la admiración y el cariño ganando una compañera y mejor amiga.

En la ecuación de mi tesis hay una variable imprescindible, los pacientes. Por esto, quería agradecer a todos los servicios de hematología su colaboración. Una remarcada atención merecen el Dr. Alejandro Martín y sobre todo el Dr. Jesús M^a Hernández Rivas quien fue uno de los impulsores de este trabajo y el cual ha estado siempre disponible para resolver dudas y explicarme aspectos de la práctica clínica desde su vasta experiencia.

Agradecer a la Dra. Belén Valenzuela y a la Dra. Vanesa Escudero por permitirme realizar una estancia de investigación en la Unidad de Farmacoterapia Personalizada del USP Hospital San Jaime. Las dos estuvieron y han estado dispuestas a ayudarme en el desarrollo de la tesis y sus enseñanzas han sido muy importantes en el desarrollo la misma.

Un reconocimiento especial merece el Prof. Leon Aarons, uno de los impulsores de la farmacocinética de poblaciones, reconocido experto científico a nivel mundial que me abrió las puertas de su laboratorio de Manchester para enseñarme y compartir grandes momentos a pesar de mi escaso nivel inglés por aquella época. Quiero agradecer toda la ayuda y el tiempo empleado en mí destacando su cercanía y simpatía. Además, mi agradecimiento más sincero a todos los miembros del "Center for Applied Pharmacokinetics Research (CAPKR)" de Manchester, de los que aprendí todos los días y me ayudaron a sentirme como en casa, en especial a Andrés, Thierry, Nico, Fernando y Adam.

Además, gracias a los congresos, cursos y estancias en otros grupos de investigación he podido conocer multitud de grandes personas que trabajan en el mundo de la farmacocinética, hecho que me ha empujado a seguir estudiando y aprendiendo esta gran e importante ciencia. Me gustaría destacar a todos los chicos del UPSS (Jens, Iris, Johana, Mohamed, Alex, Nacho, Dodie), el grupo de París ("Milleys", Floris, Adrien) y todos los asistentes al biosim cada año (Franc Andreu, Edu, Victor, Iñaki, Dolors, Juanjo, Mati y muchos más).

No puedo por menos que agradecer a todos aquellos que han querido aportar su experiencia a la tesis y han colaborado en la mejora de aspectos muy concretos como han sido Paco, Glenda, Bea Castaño, Paulo, Arancha, Cris y Dodie. Tengo que agradecer también a la Editorial Elsevier B.V., PharmGKB y Stantford University por los permisos concedidos para reproducir material bajo su copyright. Así mismo, estos agradecimientos son extensibles al biobanco del centro de Hematoterapia de Castilla y León por el plasma humano facilitado y al ensayo clínico GEL-R-COMP-2013 por parte de las muestras aportadas.

La tesis es un proceso largo, a veces tedioso, que sin el apoyo de los compañeros de trabajo sería una misión imposible. Por esto, quería agradecer a todo el área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del reciente creado departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca por alegrarme el día a día, reír mis chistes malos y hacerme reír a diario. Creo oportuno destacar a mis compañeros de café M^a José ("DJ"), Carmen, Arancha, Cris, Fer, Hino, Paulo y Pepe por conseguir endulzar cada día. Así como Julian y Toñi, por ayudarme en todos los papeleos, que no son pocos, y reírnos juntos de las cosas rutinarias. Además, en mi escasa trayectoria profesional he tenido la inmensa suerte de compartir gran parte de mi tiempo con la Dra. Ana Martín, mi más profundo agradecimiento por permitirme colaborar en todos tus proyectos y hacerme disfrutar a otro nivel de nuestra profesión. Siguiendo con la ejemplificación necesito destacar a Hino, no solo por su altura, sino por ayudarme en todas las pequeñas cosas, ser mi compañera y apoyo, escuchar todas mis preocupaciones y compartir nuestras alegrías. Hino es esa amiga y respaldo imprescindible sin la cuál el doctorado habría sido mucho más duro, por todo esto, muchas gracias.

Por otro lado, la tesis no es solo un período de estudio pues muchas personas están a tu lado los días buenos y los no tan buenos. Agradecer la diversión, alegrías y tristezas compartidas durante todo este tiempo a mis "Amigüitos" (Pablo, Rizos, Fer, Titi, Lidya, Bea, Jime, Carlos, Clara, Angy, Septi y Terry), a Elena, a todos los "RockStar" (Prado, Victor Rico, Diego, Manu, Isa, Fati y Mamen), a las chicas de Voley (Patri, Gaga, Laurita, Alba, Marina, "Mateeeo" y todos los demás miembros de la piña), a todos los "Añoveres" y a Beus que no está dentro de ningún grupo y en casi todos a la vez (mi ejemplo a seguir). Todos ellos y resto de amigos "inclasificables" han estado siempre ahí para disfrutar de la vida entre amigos, por todo esto muchísimas gracias.

Un agradecimiento más que especial merece Dodie, por ser la compañera de viaje perfecta, mi motivación y ayuda. Sus apoyo y ejemplo han sido imprescindibles para la conclusión de este proyecto.

Por último y no menos importante, agradecer a mi familia el apoyo recibido durante todo este tiempo. Mi madre (la mejor del mundo), mi difunto padre (el ejemplo de buen humor), mis hermanos (Luis, Oscar, Ana, Kate y Bea) y mis sobrinos y ahijados (Arturo, Melisa, Izan, Maribel y Florence), ellos han sido el apoyo y la motivación ideal para realizar esta tesis. MUCHAS GRACIAS.

*Rise and rise again
until lambs become lions.*

Ruseell Crow – Robin Hood (2010)

A mis padres

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. DOXORUBICINA.....	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Propiedades farmacológicas.....	4
1.1.3. Propiedades farmacocinéticas	8
1.1.4. Farmacocinética poblacional de doxorubicina	11
1.1.5. Relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia	14
1.2. FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL.....	16
1.2.1. Introducción.....	16
1.2.2. Modelos de efectos mixtos no lineales.....	19
1.2.3. Selección de modelos	25
1.2.4. Simulaciones	28
1.2.5. Análisis de covariables.....	29
1.2.6. Evaluación del modelo	36
1.2.7. Software.....	42
2.- OBJETIVOS.....	45
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. TÉCNICA ANALÍTICA.....	51
3.1.1. Reactivos.....	51
3.1.2. Equipo.....	51
3.1.3. Procedimiento	52
3.1.4. Validación	53
3.2. PACIENTES Y TRATAMIENTO FARMACOTERAPÉUTICO	54
3.2.1. Criterios de inclusión	54
3.2.2. Criterios de exclusión	54
3.2.3. Criterios de retirada del tratamiento	55
3.2.4. Recogida de datos y toma de muestra	55
3.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL	57
3.4. ANÁLISIS PK/PD	57
4.- RESULTADOS.....	59
4.1. TÉCNICA ANALÍTICA.....	61
4.1.1. Validación de la técnica analítica	61
4.2. PACIENTES Y TRATAMIENTO FARMACOTERAPÉUTICO	62
4.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL	62
4.4. ANÁLISIS PK/PD	62
5.- DISCUSIÓN	63
6.- CONCLUSIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA	71
ABREVIATURAS	91
ANEXOS.....	97

TABLAS

- Tabla I-1. Parámetros farmacocinéticos de doxorubicina en población adulta.*
- Tabla I-2. Descripción de los principales modelos farmacocinéticos poblacionales de doxorubicina (1990 - 2015).*
- Tabla I-3. Escala para evaluar la utilidad de la monitorización de un fármaco (adaptada de Brünen y cols. 2011) (85).*
- Tabla I-4. Métodos de construcción del modelo de covariables (adaptada de Byon 2013) (107).*
- Tabla MM-1. Características de los pacientes y del tratamiento con doxorubicina.*
- Tabla MM-2. Modelos estructurales farmacocinéticos de doxorubicina evaluados.*
- Tabla R-1. Covariables categóricas basales de los pacientes.*
- Tabla R-2. Parámetros farmacocinéticos y criterios de diagnóstico de diferentes modelos estructurales propuestos para doxorubicina (n=45).*
- Tabla R-3. Parámetros farmacocinéticos y criterios de diagnóstico de diferentes modelos estructurales propuestos para doxorubicina y doxorubicinol (n=45).*
- Tabla R-4. Resultados del análisis de inclusión de covariables (stepwise covariate model) en el modelo estructural de doxorubicina y doxorubicinol.*
- Tabla R-5. Parámetros farmacocinéticos del modelo final y resultados del bootstrap.*
- Tabla R-6. Resultados del análisis de la distribución de los errores de predicción normalizados (NPDE) del modelo farmacocinético final.*
- Tabla R-7. Parámetros hematológicos.*
- Tabla R-8. Parámetros farmacocinéticos secundarios y dosis de doxorubicina y doxorubicinol.*
- Tabla R-9. Evaluación de la toxicidad hematológica a partir de los parámetros farmacocinéticos secundarios de doxorubicina y doxorubicinol.*
- Tabla R-10. Análisis de correlación entre parámetros farmacocinéticos y hematológicos.*
- Tabla D-1. Resultados de los bootstraps generados a partir del modelo final para 500, 1000 y 2500 replicados.*

FIGURAS

- Figura I-1. Estructura química de daunorubicina y doxorubicina.*
- Figura I-2. Estructura química de doxorubicinol*
- Figura I-3. Rutas metabólicas y de transporte de doxorubicina.*
- Figura MM-1. Equipo y condiciones cromatográficas de la técnica de UHPLC utilizada para la determinación y cuantificación de doxorubicina y doxorubicinol en muestras de plasma humano.*
- Figura MM-2. Esquema del tratamiento de muestra para el análisis cromatográfico.*
- Figura MM-3.- Diagrama de flujo del desarrollo del modelo farmacocinético poblacional de doxorubicina y doxorubicinol.*
- Figura R-1. Cromatograma correspondiente a un muestra de plasma con 150 ng/mL de daunorubicina (DAU), blanco, superpuesto con una muestra patrón de 200 ng/mL de doxorubicina (DOX), 20 ng/mL de doxorubicinol (DOXol) y 150 ng/mL de DAU.*
- Figura R-2. Histograma de distribución de las covariables continuas.*
- Figura R-3. Exploración visual predictiva (VPC) de los modelos estructurales propuestos.*
- Figura R-4. Concentraciones de doxorubina observadas y simuladas a partir de los modelos estructurales propuestos en la tabla MM-2.*
- Figura R-5. Esquema del modelo estructural de doxorubicina seleccionado.*
- Figura R-6. Representación gráfica de las correlaciones entre las variabilidades interindividuales (IIV) de los aclaramientos del modelo farmacocinético estructural (se han excluido los valores correspondientes al paciente con ID 47, considerado como un outlier).*
- Figura R-7. Resultados del análisis de correlación de las covariables continuas estudiadas.*
- Figura R-8. Gráficos de correlación de covariables continuas con la variabilidad interindividual del aclaramiento de doxorubicina (ETA1). Abreviaturas covariables, véase anexo III.*
- Figura R-8. Gráficos de correlación de covariables continuas con la variabilidad interindividual de doxorubicina (ETA1) (continuación). Abreviaturas covariables, véase anexo III.*
- Figura R-9. Representación gráfica y análisis estadístico de la distribución de la variabilidad interindividual del aclaramiento de doxorubicina a través de los diferentes grupos definidos por las covariables categóricas estudiadas.*
- Figura R-10. Resultados análisis del GAM (arriba) y del bootstrap GAM (abajo).*
- Figura R-11. Esquema del modelo estructural de doxorubicina (azul) y doxorubicinol (rojo).*
- Figura R-12. Representación gráfica de las correlaciones entre las variabilidades interindividuales (IIV) de los aclaramientos del modelo farmacocinético final (se han excluido los valores correspondientes al paciente con ID 47, considerado como un outlier).*
- Figura R-13. Gráficos de evaluación de bondad del ajuste de las concentraciones de doxorubicina al modelo farmacocinético final.*
- Figura R-14. Gráficos de evaluación de bondad del ajuste de las concentraciones de doxorubicinol al modelo farmacocinético final.*
- Figura R-15. Perfil individual de concentraciones plasmáticas de doxorubicina predichas poblacional (PRED, -) e individualmente (IPRED, ---) junto*

con los datos de las observaciones (DV, ●). TAD: tiempo tras la administración.

Figura R-16. Perfil individual de concentraciones plasmáticas de doxorubicina predichas poblacional (PRED, -) e individualmente (IPRED, ---) junto con los datos de las observaciones (DV, ●) para los pacientes muestreados hasta las 24 h tras la administración del fármaco (TAD).

Figura R-17. Perfil individual de concentraciones plasmáticas de doxorubicinol predichas poblacional (PRED, -) e individualmente (IPRED, ---) junto con los datos de las observaciones (DV, ●). TAD: tiempo tras la administración.

Figura R-18. Perfil individual de concentraciones plasmáticas de doxorubicinol predichas poblacional (PRED, -) e individualmente (IPRED, ---) junto con los datos de las observaciones (DV, ●) para los pacientes muestreados hasta las 24 h tras la administración del fármaco (TAD).

Figura R-19. Exploración visual predictiva (VPC) del modelo final de doxorubicina (izquierda) y doxorubicinol (derecha).

Figura D-1. Perfiles farmacocinéticos de doxorubicina simulados ($n=1000$) a partir de los modelos propuestos por Kontrny y cols. (48) (---), Callies y cols. (47) (---) y Wilde y cols. (40) (---) junto con las concentraciones plasmáticas del fármaco observadas (●). IPRED: predicciones individuales; DV: observaciones de doxorubicina; TAD: time after dose.

Figura D-2. VPC modelo estructural de doxorubicina.

Figura D-3. Correlaciones encontradas en las covariables continuas estudiadas.

Figura D-4. Correlación entre la variabilidad interindividual del aclaramiento de doxorubicina (ETA1) el peso libre de grasa (LBW, lean body weight) y la alanino amino transferasa (AST).

Figura D-5. Distribución de la variabilidad interindividual de la doxorubicina (ETA1) en función del sexo.

Figura D-6. Evolución de las concentraciones plasmáticas observadas de doxorubicina (arriba) y doxorubicinol (abajo) junto con las predicciones poblacionales e individuales obtenidas con el modelo farmacocinético final.

Figura D-7. Histogramas de distribución de frecuencias de los valores de los parámetros farmacocinéticos del modelo final generados mediante bootstrap ($n=1000$).

Figura D-8. Distribución de los errores de predicción normalizados (NPDE, normalised prediction distribution errors) de doxorubicina en el modelo farmacocinético final.

Figura D-9. Distribución de los errores de predicción normalizados (NPDE, normalised prediction distribution errors) de doxorubicinol en el modelo farmacocinético final.

Figura D-9. Análisis PK/PD categórico (izquierda) y continuo (derecha).

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. DOXORUBICINA

1.1.1. Características generales

1.1.1.1. Propiedades generales

Doxorubicina (DOX) es un antibiótico antineoplásico del grupo de las antraciclinas incluido en el arsenal terapéutico oncológico desde la década de los años 60. Este fármaco, de fórmula empírica $C_{27}H_{29}NO_{11}$ y peso molecular 543,52 g/mol, presenta una estructura tetracíclica unida por un enlace glucosídico al azúcar daunosamina (Figura I-1). La DOX, junto con la daunorubicina (DAU), representan las antraciclinas de primera generación y muestran un amplio espectro de actividad frente a tumores sólidos y neoplasias hematológicas, constituyendo una pieza clave en gran número de protocolos clínicos del tratamiento del cáncer.

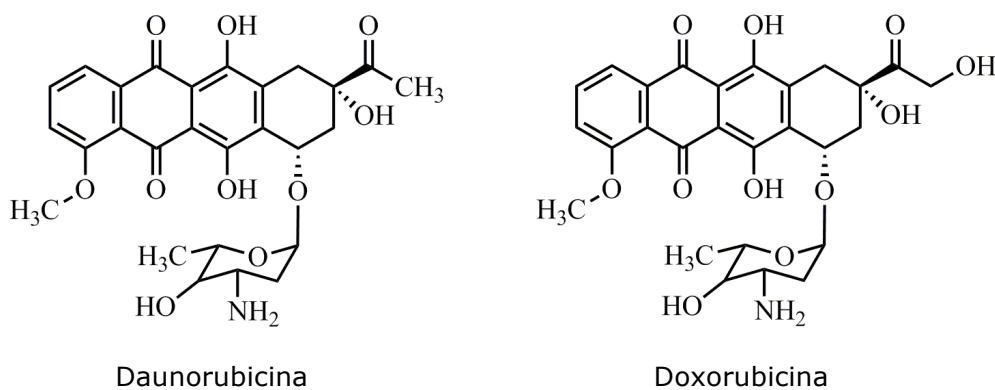


Figura I-1. Estructura química de daunorubicina y doxorubicina.

1.1.1.2. Técnicas analíticas

La caracterización de los perfiles de concentración plasmática de DOX y su principal metabolito, el doxorubicinol (DOXol), precisa de técnicas analíticas adecuadas para la determinación y cuantificación de dichos analitos en los rangos de concentración esperados tras la administración de dosis terapéuticas.

Las técnicas cromatográficas han evolucionado desde las más clásicas, que utilizan equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) hasta las actuales UFLC, UHFLC o UPLC® (*Ultra Fast/High Performance Liquid Chromatography*), en las que las columnas emplean partículas de diámetro interno inferior a 2 μm , mejorando la resolución e incrementando la sensibilidad respecto a las convencionales de HPLC (1). Existen descritas en la literatura numerosas técnicas cromatográficas capaces de cuantificar DOX (2-5), y en ocasiones también su principal metabolito activo, DOXol (6-12). Maudens y cols. (13) han publicado una revisión exhaustiva de la bibliografía de los diferentes métodos cromatográficos disponibles desde los años 90 para la determinación y cuantificación de antraciclinas, principalmente DOX, en fluidos biológicos que incluye un número superior a 40 técnicas; en ella se presenta información pormenorizada de estas técnicas, de los diferentes tratamientos de muestras

(desproteínización, extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido), detectores (fluorescencia, espectrometría de masas, UV, etc.) y fases móviles utilizados, tiempos de análisis, etc.

La mayoría de los métodos requieren detectores costosos y difícilmente asequibles (MS/MS), largos tiempos de análisis o complicados y caros acondicionamientos de las muestras. Todo ello dificulta su aplicación en la práctica clínica hospitalaria en la cual puede ser muy útil la caracterización de estos fármacos para su control terapéutico.

1.1.2. Propiedades farmacológicas

1.1.2.1. Mecanismo de acción

La configuración espacial de DOX favorece la intercalación entre los pares de bases del ácido desoxirribonucleico (ADN) alterando su estructura y estabilizando el complejo ADN-topoisomerasa II, originando la fragmentación del ADN, el bloqueo de la síntesis de nuevo material genético y su reparación. Esta inserción provoca alteraciones en los cromosomas que desencadenan efectos mutagénicos y teratogénicos. Otros mecanismos de acción implicados son la formación de radicales libres hidroxilos, que determinan la fragmentación del ADN, el efecto alquilante y la peroxidación de lípidos celulares (toxicidad cardíaca); así mismo también parece responsable de la unión a proteínas de la membrana celular originando sobreexpresión del receptor del factor epidérmico de crecimiento e inhibición de la transferrina (14-16).

1.1.2.2. Aplicaciones terapéuticas

Las indicaciones terapéuticas aprobadas en España para DOX en combinación con otros fármacos son: sarcomas de los tejidos blandos y osteogénicos, enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin (LNH), leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma del tiroides, mama, ovario, vejiga, microcítico de pulmón, tumor de Wilms, sarcoma de Edwing y neuroblastoma. No obstante, este fármaco también es utilizado en otras indicaciones que incluyen: cáncer de endometrio, páncreas, hepático, próstata, tiroides, útero, sarcoma de Kaposi, leucemia linfocítica crónica, linfoma del manto o mieloma múltiple (16-19).

1.1.2.3. Dosificación y vías de administración

La posología de DOX depende del tipo de tumor, de la función hepática y de la quimioterapia asociada. Las dosis recomendadas en monoterapia corresponden a 60-75 mg/m² en inyección intravenosa (iv) cada tres semanas, 20 mg/m² semanalmente o durante tres días consecutivos cada tres semanas. La eficacia es equiparable en dichos esquemas aunque la pauta semanal está asociada con una menor toxicidad cardíaca. Las pautas posológicas empleadas en combinación con otros fármacos (R-CHOP, ABVD, FAC, AC y CAV) oscilan entre los 40 y los 60 mg/m² cada tres o cuatro semanas en perfusión continua de 30 a 60 minutos (16,19).

La DOX precisa un ajuste posológico en grupos o condiciones determinadas:

- Insuficiencia hepática: reducción de la dosis a la mitad o a un cuarto en pacientes con valores de bilirrubina (BLR) entre 12-30 mg o superiores a 30 mg, respectivamente.
- Pacientes con riesgo cardíaco: control permanente de la función cardíaca mediante la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) e infusión continua de 24 horas en pacientes con riesgo cardíaco.
- Niños: reducción de dosis y control de mielosupresión.

La vía de administración más habitual es la iv tipo bolus y la perfusión continua o intermitente siendo menos habitual las vías intravesical y peritoneal. Las vías subcutánea, intramuscular o intratecal no son adecuadas por la necrosis tisular producida por extravasación. La administración oral no se utiliza debido a su baja biodisponibilidad (5 %) (20).

1.1.2.4. Toxicidad y efectos adversos

La actividad clínica de DOX está limitada por sus importantes efectos adversos dosis-dependiente, siendo la mielosupresión y la cardiotoxicidad crónica los más graves y relevantes (17). A continuación se detallan los principales efectos adversos producidos por este fármaco:

1.1.2.4.a. Toxicidad Hematológica

La mielosupresión producida por DOX es el efecto adverso más prevalente y que ha demostrado ser dosis-dependiente. Se caracteriza por leucopenia, anemia y trombocitopenia pasajeras que alcanzan el nadir a los 10-14 días del inicio del tratamiento pudiendo prolongarse hasta los 21-28 días. La mielosupresión intensa puede originar hemorragias, sepsis e infecciones lo que constituye un indicador para reducir o suspender el tratamiento con DOX.

1.1.2.4.b. Toxicidad cardíaca

La DOX es una sustancia cardiotóxica dosis-dependiente que puede ocasionar taquicardia, alteraciones del electrocardiograma (ECG) o insuficiencia cardíaca, de forma aguda, subaguda o crónica que no siempre responde al tratamiento con digitálicos. Este efecto adverso es una de las principales limitaciones del tratamiento con este antineoplásico pudiendo llegar a ser letal debido al desarrollo de una miocardiopatía congestiva irreversible.

El riesgo de cardiopatía congestiva aumenta con dosis acumulativas totales de 450-550 mg/m². Se distinguen entre los factores de riesgo de cardiotoxicidad:

- El tratamiento previo con DOX u otras antraciclinas.
- La velocidad de la infusión (evitar infusiones rápidas).
- La edad del paciente (menor de 15 años o mayor de 70 años).
- El sexo (mayor sensibilidad en las mujeres).
- El tratamiento concomitante con ciclofosfamida, mitomicina C o dacarbazina y en pacientes que han recibido radioterapia de la zona mediastínica.

- Factores genéticos (trisomía del par 21).
- Factores étnicos (raza negra).
- Enfermedad cardiovascular previa o congénita.
- Coadministración con paclitaxel o docetaxel, por incrementar la formación de DOXol, el cual parece estar implicado en la cardiotoxicidad crónica (18).

La cardiotoxicidad precisa de la monitorización de la función cardíaca, mediante la medición de la FEVI, antes, durante y tras la administración de DOX. Adicionalmente y como se ha expuesto previamente, los pacientes con valores alterados de BLR requieren el ajuste posológico de esta antraciclina (21,22).

Se han desarrollado distintas formulaciones de DOX para minimizar la cardiotoxicidad observándose que algunas de ellas, además incrementan la potencia antitumoral (23,24). También se han propuesto algunas estrategias para reducir la toxicidad cardíaca progresiva de inicio precoz originada por DOX. Así, para minimizar un efecto lesivo sobre el miocardio, se utilizan formulaciones menos cardiotóxicas (antraciclinas liposomales, nanopartículas cargadas con DOX) (25-27), diferentes esquemas de dosificación (infusiones de larga duración, administración semanal) (28-32), agentes cardioprotectores (dexrazoxano, glutatión, cisteína, etc.) (18,29,33-35) o el uso de antagonistas del calcio junto con vitamina D y E (36). En el caso de las formulaciones liposomales, la dosis media acumulativa es un 40 % superior a las convencionales, las cuales disminuyen los efectos adversos tradicionales de la DOX. En contraposición, originan un aumento de la mucositis y, en las pegiladas, un drástico incremento de la eritrodisestesia palmo-plantar (síndrome mano-pie) (18).

La adaptación de la dosis de DOX en cada paciente utilizando criterios farmacocinéticos (PK, *Pharmacokinetic*), junto a los clínicos, sería otra estrategia de gran interés para contribuir a una mayor eficacia del tratamiento disminuyendo el riesgo de padecer una cardiopatía congestiva.

1.1.2.4.c. Toxicidad gastrointestinal

Las náuseas y los vómitos se producen generalmente en las primeras 24 horas tras la administración de DOX. Su incidencia disminuye con la administración de dosis bajas semanales o infusiones continuas con respecto a la administración en bolus intermitente. Estos efectos indeseados suelen responder satisfactoriamente a la administración de antieméticos de tipo benzamídico o antagonistas de los receptores 5-HT₃ de la serotonina.

La diarrea y la mucositis (estomatitis y esofagitis) se manifiestan entre los 5 y 10 días posteriores a la administración y esta última parece ser más frecuente en infusión continua.

1.1.2.4.d. Toxicidad dermatológica

La alopecia, al igual que náuseas y vómitos, son menos frecuentes con infusión continua o dosis bajas semanales y es un efecto adverso frecuente que aparece a las tres semanas tras el inicio del tratamiento. La ruborización, hiperpigmentación del lecho ungueal (más frecuentes en niños), eritema con

vesículas, descamación y dolor en zonas de la piel previamente expuestas a radiaciones (reacciones de "rellamada" a la radioterapia) son otros efectos indeseados menos frecuentes.

La DOX es muy irritante y su extravasación en el lugar de administración puede provocar dolor local, irritación, inflamación, tromboflebitis o incluso ulceración y necrosis graves de la piel.

1.1.2.4.e. Toxicidad renal

La hiperuricemia (durante el período de lisis celular) hace recomendable la ingestión abundante de líquido pudiendo ser necesario la administración de un inhibidor de la xantina-oxidasa (alopurinol). La orina puede tener una coloración rojiza los dos días posteriores al tratamiento sin significación clínica.

1.1.2.5. *Interacciones farmacológicas*

La coadministración de DOX junto con otros fármacos puede originar interacciones tanto a nivel PK como farmacodinámico (PD, *Pharmacodynamic*) que causan alteraciones en la respuesta y seguridad del tratamiento farmacoterapéutico con esta antraciclina. Así mismo, DOX puede condicionar los procesos cinéticos y dinámicos de otros fármacos cuando la administración de los mismos no es espaciada en el tiempo. A continuación se detallan las principales interacciones que otros agentes originan sobre la eficacia y toxicidad de DOX (16,19):

- *Verapamilo*: la administración conjunta aumenta, en ocasiones, los niveles plasmáticos, la semivida de eliminación de la fase terminal ($t_{1/2}$) y el volumen aparente de distribución (Vd) de DOX.
- *Ciclofosfamida*: puede aumentar el riesgo de cistitis hemorrágicas y la toxicidad cardíaca inducidas por el tratamiento previo con este fármaco.
- *Metotrexato*: conocido fármaco hepatotóxico, que incrementa la toxicidad de DOX como consecuencia de reducir su metabolismo hepático, vía predominante en la eliminación de DOX.
- *Ciclosporina*: la administración concomitante de este principio activo en dosis elevadas incrementa los niveles séricos de ambos fármacos acentuando la mielotoxicidad y la cardiotoxicidad de DOX. Además actúa como modificador de la resistencia a DOX (mieloma múltiple). Rushing y cols. (37) sugieren su interacción con la P-glicoproteína (P-gp) originando una reducción del aclaramiento de DOX (CL_{DOX}) y del metabolismo del DOX lo que parece estar relacionado con el aumento de la toxicidad cardíaca.
- *Inhibidores o inductores del citocromo P-450*: fármacos inhibidores como la cimetidina y la ranitidina, e inductores como la rifampicina y los barbitúricos pueden alterar el metabolismo de DOX. No obstante la implicación de este citocromo en el metabolismo de DOX es minoritaria.
- *Paclitaxel*: reduce el CL_{DOX} cuando se administra previamente a la antraciclina. En algunos estudios en cáncer de mama, se observó un aumento en la incidencia de la mucositis y la neutropenia ante este tipo de secuencia de administración (paclitaxel-DOX) (38,39).

La toxicidad causada por DOX puede verse incrementada, de manera menos frecuente, por la administración concomitante de vacunas vivas (inmunosupresión), estreptomycin (inhibe metabolismo de la DOX), trastuzumab (toxicidad cardíaca), cisplatino (dolor precordial, disnea, alteraciones ECG), zidovudina (aumento toxicidad hematológica), progesterona (mielotoxicidad) y mercaptopurina (toxicidad hepática). Agentes citotóxicos como mitramicina, ifosfamida, dacarbazina, dactinomicina pueden aumentar la toxicidad cardíaca.

La DOX puede disminuir la absorción de las quinolonas y la potencia anticoagulante de la warfarina. En contraposición, puede potenciar el efecto de los tratamientos con interferón o tamoxifeno (16).

1.1.3. Propiedades farmacocinéticas

1.1.3.1. Distribución

En el margen de dosis habitualmente utilizado, este antineoplásico presenta un comportamiento cinético lineal. Debido a su compleja distribución, la evolución de sus concentraciones plasmáticas se ha descrito en la literatura tanto de acuerdo a un modelo bicompartimental (40-45) como a un tricompartmental (22,43,46-54) cuyos parámetros PK se recogen en la tabla I-1.

Tabla I-1. Parámetros farmacocinéticos de doxorubicina en población adulta.

Estructura modelo	CL (L/h)	Q ₂ (L/h)	Q ₃ (L/h)	V ₁ (L)	V ₂ (L)	V ₃ (L)	t _{1/2α} (min)	t _{1/2β} (h)	t _{1/2γ} (h)
Bicompartimental	48-62	60-112	NA	12-26	421-1130	NA	10-66	13-30	NA
Tricompartimental	54-62	56-86	22-36	18-22	1830-2360	72-106	5-12	1-3	19-30

CL: aclaramiento plasmático; Q_n: aclaramiento intercompartimental del compartimento n; V_n: volumen de distribución del compartimento n; t_{1/2n}: semivida de distribución/eliminación de la fase n; NA: no aplica.

Estos modelos son compatibles con una amplia y variable distribución a tejidos periféricos que da lugar a un volumen aparente de distribución en el estado de equilibrio (V_{ss}) entre 800 L/m² y 3500 L/m² (47). DOX es capaz de atravesar la placenta, pero no la barrera hematoencefálica. El volumen de distribución en el compartimento central (V_c) es del orden de 20 L con una variabilidad interindividual del 20 % (54,55). Este antineoplásico se une a proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina, en un 50 % a 85 % (19,22,43,50,55,56).

El transportador SLC22A16 es el encargado de la internalización de DOX en la célula siendo el sistema de multirresistencia a los fármacos (MDR, *Multi Drug Resistance*), entre los que se incluye la P-gp, el responsable del transporte del fármaco al exterior de la misma (56).

La formulación de un fármaco en nanopartículas puede modificar completamente su distribución con respecto a las convencionales. La PK y actuación biológica de estos sistemas depende tanto de sus características fisicoquímicas (forma, tamaño, características superficiales, etc.), como de los factores biológicos (bioquímicos, anatómicos, etc.) (57). Sistemas de liberación controlada como las nanopartículas o micelas poliméricas han sido empleados para la DOX con el objetivo de dirigir el fármaco selectivamente a los tejidos tumorales (vectorización)

o proteger el organismo de sus efectos lesivos, por lo cual estas tecnologías terapéuticas están actualmente en investigación tanto en fases preclínicas como clínicas (58,59).

Los liposomas son los sistemas de nanopartículas más utilizados en el arsenal terapéutico, siendo el Doxil[®] el primer fármaco liposomal aprobado por la FDA en 1995 (60). Estos sistemas proporcionan una barrera protectora que favorece una reducción del aclaramiento (CL) y del Vd con el consecuente aumento de la $t_{1/2}$ del fármaco (58,61). Además, este recubrimiento lipídico favorece la acumulación del fármaco en tejidos con la permeabilidad capilar incrementada como son los tumorales y la reducción de los mecanismos de resistencia (58,61). Existen multitud de sistemas liposomales que incorporan DOX en su interior, aunque solo están comercializados Myocet[™], Caelix[®] y Doxil[®]. A diferencia del Myocet[™], Caelix[®] y Doxil[®] son liposomas pegilados, los cuales al tener un menor tamaño de partícula, ocasionan un aumento de la acumulación del fármaco en los tejidos tumorales. Así se encuentran concentraciones hasta 20 veces superiores en las células cancerígenas a las observadas en las no tumorales (58).

Los liposomas, además de prolongar el tiempo de semivida en el organismo, han demostrado favorecer el paso a través de la barrera hematoencefálica siendo una alternativa en el tratamiento de cáncer de mama metastásico intracraneal y en cáncer cerebral (62).

Infusiones prolongadas ocasionan Vd en el estado de equilibrio y captación del fármaco por parte de los tejidos, incluyendo los tumorales, superiores sobre las convencionales (22).

1.1.3.2. Eliminación

Este antineoplásico se metaboliza fundamentalmente en el hígado por una aldoceto-reductasa dependiente de NADPH, presente en todas las células, pero particularmente en los glóbulos rojos, hepatocitos y las células del riñón (20). La DOX se metaboliza mayoritariamente a sus agliconas liposolubles, su semiquinona y a su alcohol secundario, DOXol (figura I-2).

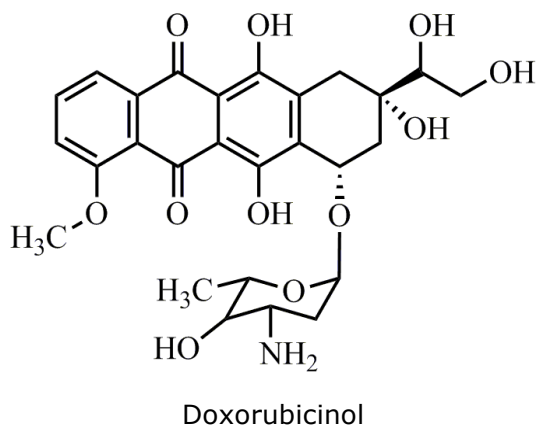


Figura I-2. Estructura química de doxorubicinol

El DOXol es el principal metabolito, el cual presenta en torno al 10 % de actividad respecto a DOX (47) y parece contribuir de forma importante a la cardiotoxicidad (63-65) mediante alteraciones de la homeostasis del Ca en el miocardio.

La figura I-3 muestra un esquema del transporte de DOX al interior y exterior de la célula, así como sus principales rutas metabólicas y las enzimas implicadas (56).

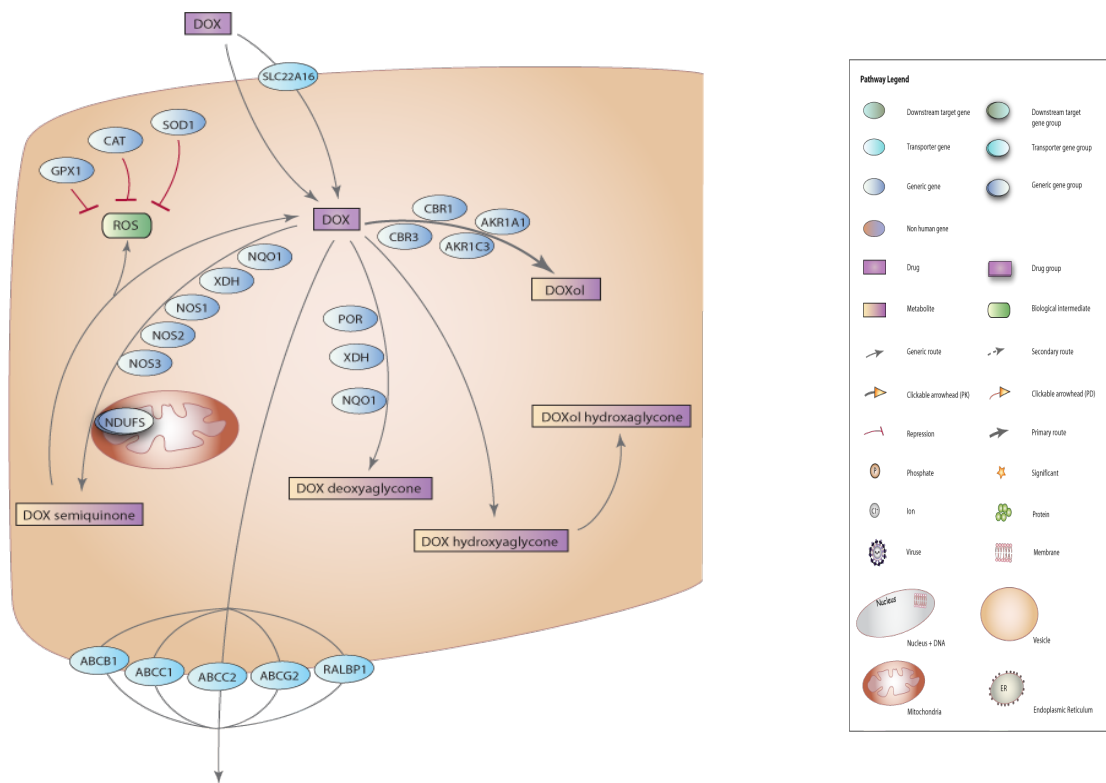


Figura I-3. Rutas metabólicas y de transporte de doxorubicina.

AKR: aldoketoreductasa, CAT: catalasa, CBR: carbonil reductasa, DOX: doxorubicina, DOX deoxyaglycone: doxorubicina deoxiaglicona, DOX hydroxyaglycone: doxorubicina hidroxiaglicona, DOXol: doxorubicinol, DOXol hydroxyaglycone: doxorubicinol hidroxiaglicona, DOX semiquinone: doxorubicina semiquinona, GPX1: glutatión peroxidasa, NDUFS: enzima NADH deshidrogenada del retículo sarcoplásmico y mitocondria, NOQ: enzima NADH deshidrogenada citosólica, NOS: óxido nítrico sintetasa, ROS: radicales libres, SOD1: peróxido dismutasa, XDH: xantina oxidasa.

PharmGKB [Base de datos en Internet]. Doxorubicin Pathway, Pharmacokinetics. [citado 11 Nov 2015]. Disponible en: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165292177>. Reproducido (adaptado) con el permiso de PharmGKB. Copyright PharmGKB® y Stanford University. (2010).

Lal y cols. (66) demostraron la disminución del CL y el aumento del grado de exposición al fármaco en aquellos pacientes con el genotipo CBR1 D2 diploide en comparación con los que presentan el CBR1 D1 diploide. También han sido evidenciadas alteraciones significativas en el grado de exposición a la DOX en función del genotipo del ABCB1 y ABCB2 (67), hecho que reafirma las interacciones PK descritas para fármacos inhibidores de la P-gp (37,47,68,69).

Tras la administración iv de DOX se observa un perfil de la evolución del fármaco en sangre con una fase descendente de rápida disposición, con una $t_{1/2\alpha}$ entre 5 y 10 min, y una fase terminal de eliminación caracterizada por una semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$) en torno a las 20-30 horas (43,70).

El CL_{DOX} es del orden de 60 L/h (40,41,43,47,48,71) pudiendo estar modificado en ancianos, niños (49,51), embarazo (72), dosis superiores a 50 mg/m² (68), obesos (68), mujeres (68,73), coadministración de inhibidores de la P-gp (47,69) o el tipo de cáncer (46,73). En cuanto a la eliminación del DOXol puede estar condicionada por la edad y la composición corporal (51). DOX presenta un aclaramiento renal bajo (12 % de la dosis total se recoge de forma inalterada en orina en los seis días posteriores al tratamiento) y un aclaramiento hepático alto que contribuye más del 50 % a su eliminación. En torno al 50 % y el 23 % de la dosis se elimina por la bilis en forma de DOX y DOXol, respectivamente y alrededor del 10-20 % aparece en heces en 24 horas, porcentaje que se incrementa al 40-50 % transcurridas 150 horas (47,50).

1.1.4. Farmacocinética poblacional de doxorubicina

El comportamiento cinético de DOX en diferentes poblaciones ha sido objeto de estudio por su interés para un adecuado ajuste posológico, la potencial diferenciación de distintas subpoblaciones, el estudio de interacciones con otros fármacos, el conocimiento de las causas de la variabilidad en la eficacia y seguridad, etc. Además, el principal metabolito de este fármaco, el DOXol, ha sido ocasionalmente incluido en los modelos PK poblacionales por su posible implicación en la toxicidad cardíaca de este antineoplásico.

Como se ha mencionado previamente, el perfil cinético de DOX en sangre ha sido descrito siguiendo un modelo compuesto por dos (40-45) o tres (22,43,46-54) compartimentos dependiendo de la duración de la infusión, el número y los tiempos de las muestras extraídas en cada paciente.

La homogeneidad de la población seleccionada en los estudios PK poblacionales es un punto crítico a la hora de extrapolar resultados de utilidad en la práctica clínica. Los pacientes diagnosticados de cáncer son un grupo complejo de estudio debido, entre otras causas, a las numerosas consideraciones éticas que dificultan la realización de un muestreo exhaustivo y a los diferentes protocolos de tratamiento en los que se incluye este fármaco. En este sentido, muchos son los estudios que utilizan bases de datos compuestas por pacientes diagnosticados de diferentes patologías y con tratamientos muy distintos aun siguiendo protocolos quimioterapéuticos establecidos. De hecho, por el momento solo se ha desarrollado un modelo PK de DOX en una población íntegramente diagnosticada de un cáncer hematológico (40).

Un reciente trabajo (48) ha utilizado las bases de datos de tres estudios previamente publicados para desarrollar un modelo PK poblacional de DOX en adultos y niños mayores de tres años, incluyendo el DOXol, siendo validado de forma externa a través de los datos provenientes de un cuarto estudio.

La tabla I-2 resume los principales estudios de PK poblacional de DOX publicados hasta diciembre de 2015. En ella se recogen las características principales de cada estudio (pacientes, diagnóstico, tratamiento, etc.), los valores de los parámetros PK estimados para DOX y DOXol, si procede, y las relaciones

encontradas entre parámetros PK del fármaco o su metabolito así como las diferentes covariables (COV) analizadas en cada uno. La tabla incluye aquellos estudios con un mayor número de pacientes, que utilizan una metodología de modelos de efectos mixtos no lineales, que consideran el metabolito activo DOXol, proporcionan información de los valores de los parámetros PK (estimaciones, variabilidad y precisión), analizan correlaciones con COV relevantes, etc. No obstante se han realizado otros estudios PK de poblaciones de DOX, que no se adaptan a las premisas anteriormente expuestas (23,43,44,68,70,71,73-75).

Table 1-2. Description of the main population pharmacokinetic models of doxorubicin (1990 - 2015).

	Kontny (23)	Wilde (15)	Callies (2)	Thompson (25)	Joergler (22)	Escudero-Ortiz (3)	Völler (24)	Joergler (16)	Wong (17)
CL _{poX} (L/h)	53.3 (31)	57.7 (8.1)	62.3 (20.5)	25.1 (-)	47.6 (24.6)	58 (19.7)	24.1 (30.7)	61.8 (14.3)	53.5 (15.4)
V ₁ (L)	17.7 (19)	18.4 (147.5)	21.5 (-)	6.96 (-)	12.3 (11.8)	21.1 (-)	9.34 (26.7)	23.3 (44.7)	25.6 (15.8)
Q ₂ (L/h)	58.7 (31)	73.2 (41.8)	85.8 (10.3)	24.8 (-)	60.3 (20.7)	84.2 (9.94)	26.8 (35.2)	112 (19.4)	55.9 (-)
V ₂ (L)	1830 (20)	789.7 (0)	2360 (13.6)	557 (-)	421 (25)	2170 (7.26)	560 (-)	1130 (25.5)	446 (14.3)
Q ₃ (L/h)	21.8 (29)	- (-)	35.6 (-)	6.59 (-)	- (-)	34.7 (-)	12.1 (-)	- (-)	- (-)
V ₃ (L)	71.6 (-)	- (-)	104 (-)	16.5 (-)	- (-)	102 (-)	27.8 (-)	- (-)	- (-)
Sigma DOX (%)	23 (-)	44.7 (-)	22.5 (-)	- (-)	45.8 (-)	21.2 (-)	29.6 (-)	34.6 (-)	43.2 (-)
CL _{poXol} (L/h)	31 (50)	34.7 (0)	143* (41.6)	50.2 (-)	108* (29.4*)	- (-)	42.5 (43)	- (-)	92.7 (23.8)
V _{DOXol} (L)	1150 (57)	477.1 (48.5)	3150* (47.7)	1100 (-)	1580* (51.3*)	- (-)	760 (48)	- (-)	1700 (35.4)
Sigma DOXol (%)	26 (-)	44.5 (-)	18.7 (-)	- (-)	40.3 (-)	- (-)	- (-)	36.2 (-)	38.9 (-)
Dose (mg/m ²)	(20 - 110)	25 (22-36)	60 (32-110)	(20-60)	60 (50-66)	41.6 (20-73)	25 (2-57)	20	75
Infusion (min)	(2 - 600)	30 (2-100)	30	(5-360)	15	(30-60)	235 (15-1440)	30	-
No. patients	82 (21 M)	30 (21 M)	36 (18 M)	22 (16 M)	59 (0 M)	33 (15 M)	94 (46 M)	7	44 (0 M)
No. samples DOX	934	258	350	326	232	205	630	91	264**
No. samples DOXol	935	252	357	326	196	-	588	91	264**
Max t sampling (h)	96	21	96	48	24	6	50	72	24
Diagnostic	-	HL	-	8 Ca	BC	9 Ca	5 Ca	KS-AIDS	BC
Protocol	-	BEACOPP	-	-	-	-	-	ABV	AT
Correlations	-	BSA-CL _{poX} ; BMI-V ₁ ; AGE-V _{DOXol}	BLR y AST - CL _{DOXol} y V _{DOXol}	BMI (>30) y % grasa - CL _{DOXol} y V _{DOXol}	BAS, AST, AGE - CL _{DOX} ; CL _{CR} - CL _{DOXol}	-	AGE-CL _{poX}	-	AGE-CL _{poX}
Observations	1	2	3	4	5	6	7	8	9

The articles are identified with the first author name and the reference number signed between brackets (see references). Pharmacokinetics parameters expressed as the population estimate and the interindividual variability (IIV) in % between brackets. DOX: doxorubicin; DOXol: doxorubicin; BSA: body surface area; BMI: body mass index; BLR: bilirubin; AST: aspartate aminotransferase; *: apparent parameters (divided by the metabolite conversion rate); **: six samples per patient (non specified value in the article); Dose and infusion: expressed as the mean value or standard according to the protocol administration, range of values registered between brackets; No. patients: number of patients enrolled in the study, number of males between brackets (females are the difference between the total patients and males); HL: Hodgkin's lymphoma; Ca: cancer; KS-AIDS: Kaposi sarcoma associated with AIDS; BC: breast cancer; ABV: DOX, Bleomicina y vincristine; BEACOPP: Bleomicina y vincristine; DOX, cyclophosphamide, etoposide, DOX, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone; AT: DOX and docetaxel. **Observations:** 1-Kontny: studied three sets of data (Callies, Thompson y Wilde) and it used the fourth one for external evaluation. Population estimates for an average individual of 1.8 m² of BSA. Dataset included 18 kids between 3 and 18 years old. 2-Wilde: two-compartment model with DOXol. 3-Callies: estimates values of the pharmacokinetic parameters of metabolite are apparent (divided by the conversion rate to DOXol). It studies the P-glycoprotein inhibitor influence. Correlations between pharmacokinetic parameters of DOXol and the values of BLR and AST were found, but it were not in the final model. 4-Thompson: parameters are scaled linearly to BSA. 17 patients are younger than 18 years old. The influence of body composition of kids on pharmacokinetic parameters has been evaluated. Relative standard errors have been reported, but not the IIV. 5-Joergler 2007: it is a two-compartment model of DOX in pregnant women. Developed a semi-physiological model for haematological toxicity. 6-Escudero-Ortiz: methodology article, it doesn't study the covariates influence on pharmacokinetic parameters. 7-Völler: study in kids, including kids younger than three years old. Parameters are scaled linearly to BSA. DOXol conversion rate fixed to 0.5. 8-Joergler 2005: two-compartment model for DOX including four different metabolites. F_{DOXol}/V_{DOXol} = 7.33 10⁻³; K_{el}=2.18 h⁻¹. DOXol described as a two-compartment model. 9-Wong: Asiatic population. Two-compartment model for DOX. The haematology count has been done 15 days after the DOX administration.

1.1.5. Relación entre la farmacocinética y la farmacodinamia

La respuesta clínica a DOX muestra una amplia variabilidad interindividual por lo que la caracterización de su perfil farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD, *pharmacokinetic/pharmacodynamic*) en los pacientes puede ser interesante en la práctica clínica con el fin tanto de prevenir la aparición de toxicidad como de optimizar su efectividad. Para fármacos con un índice terapéutico muy estrecho, como es el caso de los antineoplásicos, esta estrategia es particularmente importante cuando el tratamiento tiene como objetivo la curación del paciente, más que la prevención. De hecho, el incremento en la eficacia con una mínima incidencia de efectos adversos constituye el objetivo fundamental de la terapia oncológica (22). Desgraciadamente pocos son los antineoplásicos en los que se han utilizado criterios PK/PD para optimizar sus tratamientos. Así, a pesar de la dilatada historia de utilización de DOX, apenas se ha señalado el interés en cuantificar sus concentraciones y las de su principal metabolito, DOXol, para conocer su probable relación con la eficacia y toxicidad del tratamiento (56,64,65,76,77).

1.1.5.1. Exposición-toxicidad

La cardiotoxicidad de DOX se ha puesto de manifiesto en numerosos ensayos clínicos en los que se ha establecido que en torno a uno de cada cuatro pacientes que reciban una dosis acumulativa superior a 500 mg/m² sufrirán insuficiencia cardíaca congestiva, cerca del 50 % si reciben dosis superiores a 600 mg/m² y la totalidad de los pacientes en el caso de recibir dosis acumulativas mayores de 800 mg/m² (25). En general, se acepta que la dosis acumulativa máxima de DOX no debe sobrepasar nunca los 450-550 mg/m² (35,78,79). En este sentido, sería interesante disponer también de información que relacione las concentraciones de fármaco alcanzadas con las dosis habitualmente administradas y el riesgo de toxicidad (30,55,79-81). Aunque algunos estudios relacionan el grado de exposición al fármaco expresado como el área bajo la curva (ABC_{DOX}) de concentraciones plasmáticas o las correspondientes concentraciones máximas de DOX (C_{max,DOX}) con la cardiotoxicidad, no se ha especificado que valor debe ser considerado límite con esa finalidad (30,55,79,81). Diferentes estudios han sugerido una relación entre ABC_{DOX} y el recuento de leucocitos (LEU) en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón microcítico (37,43). Posteriormente, Toffoli y cols. (71) han sugerido que el ABC_{DOX} puede ser un buen predictor de su toxicidad hematológica en pacientes diagnosticados con LNH de alto grado tratados con protocolos R-CHOP (Rituximab, Ciclofosfamida, DOX, Vincristina y Prednisona). También existen evidencias previas que relacionan el ABC_{DOXol} con la disminución en el recuento de neutrófilos (NEU) y plaquetas (PLA) (37,69).

1.1.5.2. Exposición-eficacia

Algunos estudios han relacionado el ABC_{DOX} con la eficiencia del tratamiento en varios tipos de cáncer (43,53,82,83), pero hay pocos resultados que establezcan esta relación en pacientes con linfoma (40,84). Así, en un ensayo piloto de pacientes diagnosticados de linfoma Hodgkin y tratados con un protocolo ABVD (DOX, Bleomicina, Vinblastina, Dacarbazina), se ha relacionado el ABC_{DOX} y C_{max,DOX}

con la eficacia terapéutica (84). Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al escaso número de pacientes con linfoma incluidos en el estudio, este trabajo puede ser utilizado como base preliminar para establecer un valor de referencia de ABC_{DOX} (36,4 ng/min/mL) y $C_{max,DOX}$ (280 ng/mL) asociada a eficacia terapéutica en pacientes diagnosticados de linfoma, que resulta esencial para la individualización posológica.

1.1.5.3. Monitorización de doxorubicina

Existen una gran cantidad de fármacos eficaces empleados en el tratamiento del cáncer cuya toxicidad no ha sido paliada de manera satisfactoria en la dilatada experiencia con estos tratamientos. El estrecho margen terapéutico de estos fármacos "clásicos", entre los que se encuentra la DOX, los hace candidatos a una individualización posológica. Esta, debido a la necesidad de adaptarse a los protocolos de quimioterapia, se reduce al ajuste de dosis. La posibilidad de establecer una relación entre la cinética y la dinámica del fármaco estudiado constituiría una herramienta importante para contribuir a mejorar la efectividad y/o reducir los efectos adversos provocados tras la administración de un tratamiento farmacológico de este tipo.

La monitorización terapéutica de concentraciones de fármacos en fluidos biológicos (TDM, *Therapeutic Drug Monitoring*), es una estrategia que utiliza los datos de concentración de fármacos, habitualmente en plasma, junto con criterios PK y PD, con el fin de optimizar los tratamientos farmacológicos en pacientes definidos. Brünen y cols. (85) han propuesto una escala, cuyos ítems se muestran en la tabla I-3, para evaluar si un fármaco es un potencial candidato a la TDM, analizando el papel de esta estrategia, sus indicaciones y la justificación de su aplicación en el contexto clínico. Esta escala considera cinco categorías que incluyen aspectos PK, eficacia, toxicidad, características de los pacientes y coste-efectividad de la monitorización. La evaluación sistemática de estas variables puede permitir establecer la conveniencia o no de esta estrategia. Además de ello, la disponibilidad de un método de cuantificación para el fármaco y sus metabolitos activos en fluidos biológicos resulta esencial para abordar la TDM (85).

DOX parece satisfacer algunos de los requisitos exigibles para ser un potencial candidato a la TDM. El presente estudio plantea la hipótesis de que esta estrategia podría contribuir significativamente a un incremento de la eficacia y una reducción de la toxicidad en pacientes diagnosticados de LNH tratados con este antineoplásico.

Tabla I-3. Escala para evaluar la utilidad de la monitorización de un fármaco (adaptada de Brünen y cols. 2011) (85).

Propiedades farmacocinéticas

- Farmacocinética no lineal.
- Semivida elevada (> 48 h).
- Interacciones farmacológicas relevantes.
- Posibles interacciones con alimentos y drogas sociales/legales (tabaco, cafeína, alcohol).

Eficacia

- Estrecho margen terapéutico.
- Ausencia de marcadores subrogados para determinar el resultado del tratamiento.
- Relación entre eficacia y concentraciones plasmáticas.
- Riesgo de ineficacia o recaída con reducción de dosis.

Toxicidad

- Información sobre la relación toxicidad/efectos adversos y concentración en plasma.
- Información sobre intoxicaciones a concentraciones dos veces más altas que el límite superior del margen terapéutico.
- Información sobre muertes por sobredosis.

Características de los pacientes

- Elevada proporción de pacientes con incumplimiento (> 40 %).
- Elevada variabilidad farmacocinética interindividual.
- Elevada variabilidad farmacocinética intraindividual.
- Información sobre polimorfismos genéticos en el metabolismo y transporte del fármaco.
- Alteraciones farmacodinámicas en pacientes de poblaciones especiales.
- Alteraciones en el metabolismo en pacientes de poblaciones especiales.
- Riesgos relacionados con el género.
- Necesidad de ajuste de dosis en pacientes con fallo hepático, renal, etc.
- Otros riesgos (especificar).

Coste-efectividad

- Datos farmacoeconómicos favorables.
-

1.2. FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL

1.2.1. Introducción

La optimización de la posología en los tratamientos farmacológicos constituye una pieza clave para conseguir el éxito terapéutico deseado. Es ampliamente conocido que la administración de una dosis estándar de un fármaco en una población de pacientes no asegura en todos ellos el nivel adecuado para obtener una respuesta óptima. Ello se debe a la elevada variabilidad interindividual en el comportamiento PK y PD que presentan la mayoría de los fármacos. Así los procesos de liberación, absorción, metabolismo y excreción (LADME) que condicionan el perfil PK varían ampliamente de unos individuos a otros y son responsables de que los niveles de fármaco en el organismo sean distintos. Si está bien definido el margen terapéutico de concentraciones en plasma al cual se consiguen la máxima eficacia con la mínima incidencia de efectos adversos, es fundamental conseguir en cada paciente niveles de fármaco dentro de ese margen. Los diferentes factores que condicionan los procesos del LADME son numerosos y el conocimiento de cómo los afectan puede ayudar significativamente a conseguir en cada paciente concentraciones óptimas del fármaco. La variabilidad PD también

puede ser significativa ya que la sensibilidad de cada individuo a concentraciones similares en la biofase puede ser diferente. No obstante este tipo de variabilidad suele ser más difícil de establecer.

La variabilidad PK puede tener su origen en diversos factores (86,87):

- Antropométricos: peso, altura, superficie corporal, etc.
- Fisiológicos: edad, sexo, embarazo, etc.
- Genéticos, especialmente los que afectan a procesos de biotransformación y transporte: isoformas del citocromo P450 y de la P-gp.
- Ambientales: hábito de fumar, dieta, etc.
- Fisiopatológicos: insuficiencia renal o hepática, etc.
- Interacciones con otros fármacos administrados de forma concomitante.
- Otros: naturaleza y horario de las comidas, ritmos circadianos, cumplimiento del régimen prescrito, etc.

Para obtener concentraciones terapéuticas de fármaco en el organismo es preciso conocer su comportamiento cinético en el paciente mediante la determinación de los parámetros PK que relacionan dichas concentraciones con las dosis administradas y permiten predecir su evolución en el tiempo. Los estudios PK, inicialmente tenían como objetivo fundamental la determinación de parámetros asociados a un modelo determinístico capaz de describir la evolución de las concentraciones de fármaco en diferentes fluidos biológicos, habitualmente plasma u orina, en el individuo. La experiencia acumulada con este tipo de estudios PK ha permitido apreciar, como se ha comentado previamente, la gran variabilidad que presentan estos procesos dentro de una población de pacientes determinada. Ello ha dado lugar a numerosos estudios, cuyo objetivo ha sido cuantificar el efecto de diferentes factores tales como edad, peso, sexo, patologías asociadas y presencia de otros fármacos, procesos de disposición del fármaco, etc. con el fin de minimizar la extensión de esa variabilidad, en principio inexplicable. Sin embargo, algunos grupos, tales como los pacientes ancianos, enfermos críticos o ciertos grupos pediátricos resultan difíciles de estudiar debido, sobre todo, a limitaciones de tipo ético y logístico que impiden llevar a cabo sobre estos pacientes la rigurosidad de los protocolos experimentales necesarios para su análisis PK. Sheiner y Beal (88), reconociendo la necesidad de disponer de información PK en estos grupos de pacientes, propusieron una metodología matemático estadística que permitía el tratamiento de los datos generados durante la práctica clínica, los cuales suelen ser escasos y obtenidos de acuerdo con requerimientos de tipo clínico (*sparse data*), para caracterizar el comportamiento PK de fármacos en poblaciones de pacientes que lo reciben como parte de su tratamiento (89). Aunque esta aproximación fue inicialmente desarrollada con objetivo de poder caracterizar el comportamiento cinético a partir de escasos datos, como por ejemplo los obtenidos en la TDM. Su utilización se ha ampliado a otras áreas de la investigación y desarrollo de nuevos fármacos como se pone de manifiesto en las actuales exigencias de las agencias reguladoras, en cuyas publicaciones se incluyen los conceptos fundamentales de PK poblacional (90-92).

La PK de poblaciones constituye una metodología que plantea un enfoque diferente que ha pasado de considerar la estimación de los parámetros PK individuales a la caracterización del comportamiento cinético del fármaco en una

población determinada. Dicha metodología se puede definir como el estudio de la variabilidad inter e intraindividual de las concentraciones que alcanzan los fármacos, cuando se administran en regímenes de dosificación estándar a un grupo amplio de pacientes con características fisiopatológicas y clínicas definidas (93).

A pesar del tiempo transcurrido desde su inicio, ha llevado más de 30 años la aceptación general de esta metodología como un instrumento útil en el desarrollo de fármacos. La atención prestada a la PK de poblaciones se ha puesto de manifiesto en:

- El elevado número de publicaciones que describen aspectos teóricos y aplicados a este campo y la emergencia de organizaciones de investigación por contrato (CRO, *Contract Research Organizations*) especializadas en PK poblacional.
- La publicación por parte de la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA) de las guías sobre PK poblacional (91,92).
- El incremento en la realización de estudios y análisis poblacionales por parte de la industria farmacéutica.
- El desarrollo de numerosas herramientas metodológicas relacionadas.

Teniendo en cuenta las consideraciones previas, los objetivos fundamentales de la PK poblacional podrían resumirse en los siguientes (88):

- Obtener información PK relevante en pacientes que son representativos de la población diana que va a ser tratada con el fármaco.
- Identificar y evaluar factores responsables de la variabilidad PK (demográficos, fisiopatológicos, ambientales, coadministración con otros fármacos, etc.).
- Evaluar la variabilidad inter e intraindividual que existe en el comportamiento cinético y que no ha conseguido ser explicada por los factores demográficos y clínicos. La magnitud de esta variabilidad aleatoria no explicada es importante ya que la eficacia y seguridad de un fármaco disminuye cuando esta variabilidad se incrementa.

Los ámbitos de aplicación de la PK de poblaciones varían ampliamente y pueden extenderse a todas las fases del desarrollo del fármaco, desde su descubrimiento a los ensayos clínicos en fase IV. Estas técnicas han sido específicamente empleadas en la búsqueda de compuestos, selección de candidatos a fármacos, análisis toxocinético, escalado interespecies, estudios de bioequivalencia, etc.

Entre las principales ventajas de los estudios PK poblacionales sobre los tradicionales se pueden destacar:

- El análisis se realiza en la población real de interés en lugar de voluntarios sanos o poblaciones especiales estrechamente controladas.
- La mejor estimación de los parámetros medios y sus varianzas y la posibilidad de evaluar múltiples factores que pueden influir sobre la cinética de disposición del fármaco.

- La superioridad desde el punto de vista costo-efectivo.

Una de las primeras aproximaciones poblacionales realizadas fue el método de datos acumulados (*Naïve Pooled Data Analysis*). Esta metodología, como su propio nombre indica, consiste en el ajuste de la totalidad del conjunto de datos de la población como un único individuo. Tiene la ventaja de su simplicidad y puede ser aplicado cuando la variabilidad interindividual no es muy elevada, pero conlleva importantes limitaciones en la determinación de las fuentes de variabilidad, la estimación de los parámetros, sesgos con datos balanceados (diferencias en el número de observaciones por individuo), etc. (94).

Muy utilizados también han sido los métodos estándar en dos etapas (*Standard Two Stage*) los cuales estiman los parámetros PK en cada individuo, y sobre ellos realizan un análisis estadístico descriptivo para obtener los valores medios y varianzas de los parámetros individuales. Esta metodología es aplicable cuando los datos de concentraciones plasmáticas de fármaco por individuo son suficientes para realizar una caracterización correcta de su perfil PK y el modelo no incluye dependencia del tiempo o de la dosis. La principal limitación de esta estrategia es la sobreestimación de la variabilidad interindividual (94). Además, este método es de difícil aplicación en el contexto clínico debido a las limitaciones éticas y prácticas derivadas del elevado número y frecuencia de extracción de muestras necesarias para llevar a cabo este tipo de análisis PK. Consideraciones pragmáticas, exigen a veces que los datos para estudios PK y PD tengan que ser recogidos bajo condiciones de diseño menos rígidas y restrictivas (por ejemplo, diferente número de muestras o tiempos de muestreo por individuo).

Sheiner y Beal (95) demostraron la obtención de parámetros estimados sesgados mediante los métodos de análisis PK poblacional de datos acumulados y en dos etapas proponiendo los modelos de efectos mixtos no lineales como una alternativa más adecuada para este tipo de análisis. Además, el uso de esta aproximación implementada, entre otros, en el programa NONMEM v.7.3. (ICON Development Solutions, Hanover, EEUU), es capaz de efectuar la totalidad de las operaciones requeridas para llevar a cabo un análisis PK poblacional y ha fomentado en gran medida el uso de esta metodología sobre las existentes, siendo la más empleada en la actualidad en el desarrollo de este tipo de modelos PK (96).

1.2.2. Modelos de efectos mixtos no lineales

Los modelos de efectos mixtos no lineales presentan dos componentes fundamentales: un modelo estructural, definido por unos parámetros de efectos fijos que relacionan las variables dependientes, que en PK habitualmente son las concentraciones de fármaco en fluidos biológicos, con las variables independientes (ej. tiempo, dosis...), y un modelo estadístico, también denominado estocástico o de varianza, constituido por los parámetros de efectos aleatorios que evalúan la variabilidad de los parámetros de efectos fijos y de las variables dependientes. Estos modelos establecen que la variabilidad en la respuesta medida (concentraciones de fármaco) en una muestra de n individuos es debida al error residual, la cual incluye la variabilidad intraindividual, la variabilidad en la medida de la concentración, los errores en el tiempo de obtención de las muestras, etc.) y

a la variabilidad interindividual de los parámetros de efectos fijos. La concentración observada de fármaco en un fluido biológico, habitualmente plasma, en un individuo dado, de acuerdo con este tipo de modelos, se describe mediante la ecuación 1.

$$y_{ij} = f_{ij}(\theta_i, x_{ij}) + \varepsilon_j \quad \text{Ecuación 1}$$

siendo y_{ij} para $j=1, \dots, n$, las observaciones experimentales del individuo i a cada uno de los tiempos x_{ij} . θ_i es el vector de parámetros PK del individuo i . f_{ij} es una función no lineal que establece la relación entre predicciones y parámetros PK en cada individuo i , es decir, corresponde al modelo estructural que mejor ajusta las observaciones experimentales de cada individuo i a cada tiempo j . ε_j es el error o diferencia entre el valor de la variable dependiente observado al tiempo j y el predicho a ese mismo tiempo.

La ecuación 1 constituye una parte del modelo poblacional y se define para los n individuos que constituyen la muestra ($i=1, \dots, n$). Se asume, en general, que los valores de ε_{ij} son independientes y presentan una distribución simétrica de media cero y varianza σ^2 , y representa la variabilidad residual. Los parámetros PK (θ_i) son los mismos para todos los individuos de la población, pero sus magnitudes pueden variar de un individuo a otro, como queda reflejado en la siguiente ecuación:

$$\theta_i = g(\bar{\theta}, z_{ij}) + \eta_j \quad \text{Ecuación 2}$$

siendo, g el modelo PK estructural que mejor describe el valor esperado de θ_i (vector de parámetros PK individuales) como función de una serie de COV específicas de cada individuo z_{ij} , tales como peso, edad, etc. (que pueden variar con el tiempo), y $\bar{\theta}$ el vector de parámetros PK poblacionales. η_j representa la desviación aleatoria del vector de parámetros PK individuales θ_i con respecto a la predicción de los poblacionales $\bar{\theta}$.

Se asume que los valores de η_j son independientes y presentan una distribución simétrica de media cero y varianza ω^2 , representativa de la variabilidad interindividual aleatoria asociada al parámetro $\bar{\theta}$. Los modelos de efectos mixtos no lineales son modelos jerárquicos que presentan dos niveles de variabilidad: los efectos aleatorios interindividuales (η_j), que pertenecen al primer nivel, y los efectos aleatorios residuales (ε_{ij}), que pertenecen al segundo, estando éstos últimos anidados en los primeros.

En resumen, los modelos no lineales de efectos mixtos proporcionan información sobre:

- Parámetros de efectos fijos: valores poblacionales de los parámetros PK ($\bar{\theta}$) del modelo estructural y sus relaciones con las COV analizadas en el estudio.
- Parámetros de efectos aleatorios: representativos de la variabilidad interindividual y variabilidad residual expresados por las varianzas ω^2 y σ^2 de las distribuciones de los valores de η_j y ε_j , respectivamente; obtenidas, su vez, de los valores de las matrices varianza-covarianza Ω y Σ .

1.2.2.1. Modelo estructural

Este modelo define la evolución en el tiempo (variable independiente) de las respuestas medidas (concentraciones plasmáticas de fármaco cuando se trata de un modelo PK) mediante ecuaciones integradas o diferenciales, que establecen su relación con los parámetros de efectos fijos (CL, Vd, etc.). La estructura del modelo es habitualmente compartimental y debe contemplar el número de compartimentos necesarios para caracterizar adecuadamente la evolución de concentraciones plasmáticas del fármaco así como cuantificar la velocidad de transferencia entre los mismos. Para ello se utilizan una serie de criterios de selección de modelos descritos en el apartado 1.2.3. del presente capítulo que permiten obtener un modelo base. A partir de este se desarrollará un modelo de COV que incluya aquellas que puedan tener influencia estadísticamente significativa sobre alguno de los parámetros PK del modelo estructural seleccionado. Los parámetros de regresión de las COV incluidas en el modelo estructural que relacionan dichas COV con los parámetros PK ($\bar{\theta}$) constituyen los denominados parámetros de efectos fijos.

1.2.2.2. Modelo estadístico

Este modelo define la variabilidad interindividual y el error residual, incluyendo cuando se precisa la variabilidad interocasión a través de los denominados parámetros de efectos aleatorios. Estos permiten estimar con precisión los parámetros de efectos fijos así como la variabilidad de estos en la población y las estimaciones empíricas individuales bayesianas (EBE, *Empirical Bayes Estimates*) de los parámetros PK. El análisis de los diferentes factores pronóstico estudiados con las EBE permite identificar tanto subpoblaciones como el tipo de relación (lineal, exponencial, etc.) entre ellas. Para que una COV pueda ser incluida en el modelo debe observarse una tendencia clara de su influencia sobre las EBE del parámetro PK evaluado y la η , mediante un análisis gráfico y estadístico. Además, su inclusión debe ir acompañada de una reducción de la variabilidad inicialmente observada en dicho parámetro.

La selección del modelo de variabilidad interindividual (asumiendo una distribución normal) está condicionada por el tipo de datos experimentales, siendo los más ampliamente utilizados:

- Modelo aditivo:

$$\theta_i = \bar{\theta} + \eta_i \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 3}$$

- Modelo proporcional (coeficiente de variación constante):

$$\theta_i = \bar{\theta} \cdot (1 + \eta_i) \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 4}$$

- Modelo exponencial:

$$\theta_i = \bar{\theta} \cdot e^{\eta_i} \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 5}$$

La magnitud de la variabilidad interindividual (IIV, *interindividual variability*) se denota por su coeficiente de variación (CV) expresado en porcentaje y se calcula a partir de las ecuaciones 6 y 7 para los modelos de variabilidad proporcional/exponencial y aditivo, respectivamente.

$$CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \times 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

$$CV(\%) = \frac{\sqrt{\omega^2}}{\bar{\theta}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

La variación de algunos parámetros PK dentro de un sujeto a lo largo del tiempo se denomina variabilidad inter-ocasión (IOV, *Interoccasion Variability*), en determinadas ocasiones, se presenta de manera aleatoria (97). Se asume al igual que en los otros modelos de error, que son aleatorios entre ocasiones y presentan una distribución simétrica alrededor de cero y con varianza π^2 .

La selección del modelo de variabilidad de error residual está condicionada por el diseño del estudio poblacional. A continuación se muestran los modelos de variabilidad residual más ampliamente utilizados:

- Modelo de error aditivo: independiente del valor de las concentraciones predichas individuales.

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) + \varepsilon_j \quad \varepsilon_j \sim N(0, \sigma_1^2) \quad \text{Ecuación 8}$$

- Modelo de error proporcional: proporcional al valor de las concentraciones predichas individuales.

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \times (1 + \varepsilon_j) \quad \varepsilon_j \sim N(0, \sigma_1^2) \quad \text{Ecuación 9}$$

- Modelo mixto o híbrido (aditivo-proporcional):

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \times (1 + \varepsilon_{1j}) + \varepsilon_{2j} \quad \varepsilon_{1j}, \varepsilon_{2j} \sim N(0, \sigma_1^2), N(0, \sigma_2^2) \quad \text{Ecuación 10}$$

donde $f(\theta_i, D_i, x_{ij})$ representa la concentración individual predicha mediante el correspondiente modelo estructural PK (f), en función de los valores individuales de los parámetros PK (θ), la dosis administrada (D_i) y los tiempos j de determinación de las concentraciones en el individuo i (x_{ij}).

La magnitud de la variabilidad aleatoria residual suele presentarse como CV expresado en porcentaje y su cálculo depende del tipo de modelo de error, proporcional/exponencial (ecuación 11) o aditivo (ecuación 12):

$$CV(\%) = \sqrt{\sigma^2} \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

$$CV(\%) = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{y}} \times 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

siendo \bar{y} el valor promedio de todas las observaciones experimentales.

En general, el modelo aditivo es adecuado para definir la variabilidad residual cuando las concentraciones experimentales son del mismo orden de magnitud. En PK poblacional, es ampliamente admitido que el modelo proporcional es el modelo de error que mejor suele explicar el error residual asociado a las observaciones experimentales exceptuando el caso en el que las concentraciones más bajas estén próximas al límite de cuantificación de la técnica analítica empleada. En esta situación concreta, se puede añadir un componente aditivo al modelo de error proporcional (ecuación 13) como factor corrector en las concentraciones cercanas a dicho límite.

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) + [f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \times \varepsilon_{1j}] + \varepsilon_{2j} \quad \text{Ecuación 13}$$

Además, es preciso tener en cuenta la posible influencia de las COV sobre la estructura del modelo de error residual. Otra posibilidad es que esta variabilidad puede no ser independiente del sujeto en estudio, en cuyo caso la inclusión de variabilidad interindividual en dicho modelo (ecuación 14) puede disminuir la influencia sobre el ajuste de algunos individuos con concentraciones experimentales que se desvían excesivamente de las predichas en ausencia de estas consideraciones.

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) + [f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \times \varepsilon_{1j} + \varepsilon_{2j}] \cdot e^{\eta_{ij}} \quad \text{Ecuación 14}$$

1.2.2.3. Métodos de estimación

En la estimación de los parámetros de efectos fijos $\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_k$, de cualquier modelo es preciso identificar aquellos que consigan un mejor ajuste de los datos. El criterio aplicado para su selección es la minimización del valor de la función objetivo (OFV, *Objective Function Value*), que cuantifica las diferencias entre las respuestas observadas y predichas para un conjunto dado de parámetros. La aproximación general incluye la estimación de las derivadas parciales de la OFV respecto a cada uno de los parámetros θ . La minimización o maximización de la función se determina haciendo dichas derivadas parciales igual a cero.

Los términos θ que cumplan esta condición se obtienen a través de un proceso iterativo que resuelve el sistema de derivadas parciales por integración numérica. El método de estimación habitualmente utilizado en modelos de efectos mixtos no lineales está basado en una aproximación de máxima probabilidad (ML, *Maximum Likelihood*). ML es una alternativa a la función objetivo de mínimos cuadrados que busca maximizar la función de probabilidad o de su logaritmo. En términos generales, la función de probabilidad está definida por la ecuación 15.

$$L = F(Y, \text{modelo}) = \prod_{i=1}^n \{p[y_i, \text{parámetros del modelo } (x_i)]\} \quad \text{Ecuación 15}$$

De acuerdo con esta relación se predice, con los datos de la muestra estudiada, la probabilidad (L) de que ocurran los valores de las variables dependientes (concentraciones plasmáticas del fármaco), para un modelo de regresión determinado. Asumiendo que todas las observaciones son independientes unas de otras, para el modelo esta probabilidad es la suma geométrica (Π , de $i = 1$

a n casos) de las probabilidades para las observaciones de cada individuo, y los parámetros θ para los valores x . La suma geométrica es la multiplicación de las probabilidades individuales a través de los casos. Las estimaciones de parámetros de máxima verosimilitud pueden obtenerse maximizando la ecuación 15. Como es habitual cuando esta función se expresa como logaritmos naturales, la suma geométrica se convierte en una suma aritmética (Σ de $i = 1$ a n casos). Cuanto mayor sea la probabilidad, L , de un modelo concreto, mayor será la probabilidad de que los valores de la variable dependiente se presenten en la muestra y en consecuencia mejor ajuste de los datos al modelo. Dado que resulta de gran dificultad resolver de manera exacta dicha ecuación ya que la mayoría de los modelos PK presentan una dependencia no lineal entre las observaciones y los efectos aleatorios, se han desarrollado diferentes aproximaciones con el objetivo de simplificar el proceso de maximización de la probabilidad.

NONMEM v.7.3. es un programa que implementa diferentes algoritmos de estimación de parámetros poblacionales. El método de estimación debe ser seleccionado en función del tipo de datos (continuos, binarios, etc.), del tiempo de cálculo (*run time*) y del grado de linealidad de los efectos aleatorios en el modelo.

Los métodos de estimación clásicos están basados en el principio de máxima verosimilitud (98) y los más empleados son el método de primer orden (FO, *First Order Method*), método de primer orden con estimación condicional (FOCE, *First Order Conditional Method*) y el laplaciano (LAPLACIAN). Estos métodos de estimación se basan en el algoritmo Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno para maximizar la probabilidad y solo difieren en la forma de realizar la aproximación (99).

En el método FO la probabilidad se linealiza con respecto a los efectos aleatorios usando la aproximación a los términos de primer orden de la serie de Taylor, lo que introduce un sesgo que se incrementa cuanto mayor es la magnitud de los parámetros de efectos aleatorios (100). A pesar de ello, su rapidez le sigue confiriendo importancia en estadios iniciales del desarrollo de modelos complejos que requieren tiempos de análisis muy elevados (101).

El método FOCE realiza la linealización utilizando la serie de Taylor para $\eta_i = \hat{\eta}_i$, lo cual permite solventar, en parte, el sesgo en la estimación de los parámetros poblacionales obtenidos con el método FO que solo considera las de primer orden. El método FOCE con la opción INTERACTION, tiene en cuenta la interacción entre η - ε y es especialmente recomendado en estudios con muestreos exhaustivos en cada individuo.

En el caso de modelos muy alejados de la linealidad, así como para el ajuste de datos categóricos, el método LAPLACIAN que emplea las segundas derivadas parciales suele ser el más indicado.

Además de los métodos de estimación clásicos basados en la linealización de la función de probabilidad se han desarrollado algoritmos de esperanza matemática-maximización en dos etapas (EM, *Expectation-Maximization*). Estos métodos utilizan dos etapas secuenciales, la primera, el paso de esperanza matemática evalúa la probabilidad usando las estimaciones de los parámetros

actuales seguido del paso de maximización de la probabilidad esperada en la fase previa. La versión 7 de NONMEM implementa varios métodos con esta estrategia que difieren en el desarrollo del primer paso, como son el método iterativo en dos etapas (ITS, *Iterative Two Stage*), los métodos de muestro intensivo (IMP, *Monte Carlo Importance Sampling* e IMPMAP, *Importance Sampling Assisted by Mode A Posteriori*) o la aproximación estocástica de EM (SAEM, *Stochastic Approximation EM*). Este último método de estimación, en el que se basa el programa de modelado PK poblacional MONOLIX (Lixoft, Orasy, France), usa un algoritmo que utiliza una densidad de muestreo centrada en la posición previa en lugar de la media condicional de la densidad individual *a posteriori* (99,101).

1.2.3. Selección de modelos

Para el correcto desarrollo de modelos PK poblacionales es necesario establecer unos criterios de diagnóstico que permitan seleccionar aquellos, que cumpliendo el principio de parsimonia, describan mejor la evolución de los niveles de fármaco y sean fácilmente interpretables y clínicamente aceptables (102).

1.2.3.1. Criterios estadísticos

- Minimización satisfactoria: la principal causa de una minimización no satisfactoria es la sobreparametrización del modelo y se puede solucionar otorgando una mayor libertad a los límites de los parámetros de efectos fijos o aleatorios o simplificando el modelo.
- Prueba de razón de verosimilitud (LRT, Likelihood Ratio Test): consiste en seleccionar aquel modelo que presente un valor mínimo de OFV, el cuál equivale a menos dos veces el valor del logaritmo de la máxima verosimilitud. El valor mínimo de la OFV para un modelo particular y una base de datos concreta se asocia con un "mejor ajuste" de los datos, indicando la reducción de las diferencias entre los valores predichos y observados. No obstante, el valor absoluto de la OFV no garantiza por sí solo el mejor modelo, ya que puede ser un método de estimación-dependiente y asociarse a un error tipo I aumentado (90,103). Se asume que la diferencia del valor de la OFV de dos modelos jerárquicos o anidados sigue una distribución χ^2 con grados de libertad igual a la diferencia de parámetros entre los dos modelos. Con estas asunciones, se requiere una disminución del valor de la OFV de 3,84 ó 6,63, en modelos con un grado de libertad de diferencia, para garantizar un cambio estadísticamente significativo a niveles de probabilidad de $p < 0,05$ o $p < 0,01$, respectivamente (104).
- Criterio de Akaike (AIC, Akaike Information Criteria): se utiliza en modelos no anidados:

$$AIC = OFV + 2 \cdot n_p \quad \text{Ecuación 16}$$

donde n_p es el número de parámetros del modelo y OFV el valor de la función objetivo.

Se considera la magnitud del valor de AIC inversamente proporcional a la

bondad del ajuste del modelo, es decir, el modelo que mejor describe las concentraciones experimentales es el que tiene un menor valor de AIC.

- Criterio de información bayesiano (BIC, *Bayesian Information Criteria*) o criterio de Schwarz (SBC, *Schwarz Bayesian Criteria*): es aplicable en modelos no anidados y, a diferencia del AIC, penaliza el valor de OFV por el número de datos disponibles para ajustar el modelo.

$$BIC = OFV + n_p \cdot \ln(N) \quad \text{Ecuación 17}$$

donde N es el número de observaciones experimentales.

AIC y BIC no proporcionan una interpretación estadística en la comparación de modelos, pero es ampliamente considerado que una diferencia superior a dos es suficiente para considerar el ajuste de un modelo superior a otro (103).

1.2.3.2. Precisión en la estimación de los parámetros

La precisión de los parámetros estimados puede cuantificarse mediante los errores estándar (SE, *Standard Error*) o los intervalos de confianza (IC). Los SE pueden estimarse a partir de la matriz de información de Fisher, el perfil del logaritmo de verosimilitud (*log-likelihood profiling*) y técnicas de simulación tipo *bootstrap*.

La incertidumbre de los parámetros estimados, tanto de efectos fijos como aleatorios, se evalúa habitualmente mediante el SE expresado porcentualmente (RSE, *Relative Standard Error*) (ecuación 19).

$$RSE(\%) = \frac{SE}{Estimado} \times 100 \quad \text{Ecuación 18}$$

siendo el estimado el valor medio del parámetro evaluado (parámetro de efecto fijo o aleatorio). Valores de RSE superiores al 25 % y al 50 % para los parámetros de efectos fijos y aleatorios, respectivamente, implican una reducida precisión o elevada incertidumbre en la estimación del parámetro (105).

1.2.3.3. Evaluación de la contracción de la varianza (*shrinkage*)

La escasez de datos por individuo (*sparse data*) puede originar dificultades en la estimación de parámetros por un sobreajustado, sesgo hacia el valor típico poblacional o contracción de la varianza en los parámetros de efectos aleatorios, el cuál se puede cuantificar a través de la estimación del *shrinkage* correspondiente a cada tipo de parámetro de efectos aleatorios:

$$\varepsilon - shrinkage = 1 - SD(IWRES) \quad \text{Ecuación 19}$$

$$\eta - shrinkage = 1 - \frac{SD(EBE)}{\omega} \quad \text{Ecuación 20}$$

donde SD (IWRES) y SD (EBE) son la desviación estándar (SD, *standard deviation*) de los residuales

ponderados individuales ($IWRES = \text{observaciones} - IPRED / \sigma$) y las estimaciones empíricas individuales bayesianas (EBE, *Empirical Bayes Estimates*), respectivamente; σ , es la magnitud del error residual y ω es la desviación estándar de la estimación poblacional de la variabilidad interindividual (η).

Valores elevados de ϵ -*shrinkage* y η -*shrinkage* indican la inconveniencia de utilizar métodos de diagnóstico gráficos basados en predicciones individuales (IPRED) o EBE, respectivamente.

1.2.3.4. Identificación de valores atípicos (*outliers*)

Los valores atípicos, también denominados *outliers*, son aquellos que difieren del resto de los datos sin una clara justificación para su eliminación. Estos valores discrepantes pueden tener una elevada influencia en la estimación de los parámetros PK poblacionales por lo que resulta de gran relevancia su identificación y evaluación para determinar si deben ser eliminados del conjunto de datos a analizar. En PK de poblaciones, la diferencia entre la concentración de fármaco cuantificada y la estimada (residual) por el modelo desarrollado es un parámetro ampliamente utilizado para cuantificar la bondad del ajuste PK del modelo desarrollado. Los valores absolutos de estos residuales ponderados ($|WRES|$) superiores a cuatro son susceptibles de ser considerados como valores que no siguen la distribución de la población estudiada y precisan de un análisis de sensibilidad. Este análisis se realiza tanto del dato concreto de concentración, si se considera un error independiente del sujeto (tiempo de análisis o extracción de la muestra erróneo), como del paciente, si se considera un error dependiente del sujeto (error en el tratamiento de las muestras, en la anotación de la dosis o duración de la infusión, etc.).

1.2.3.5. Inspección de los diagnósticos gráficos

Las técnicas de análisis gráfico son muy válidas para examinar la distribución de los parámetros de efectos fijos y aleatorios. Las gráficas de bondad de ajuste (GOF, *Goodness of Fit Plots*) facilitan la evaluación visual de los resultados obtenidos con el modelo PK propuesto en contraposición con los datos experimentales. A continuación se recogen los gráficos más relevantes e informativos propuestos para la selección de modelos PK poblacionales (92,105-107):

- Observaciones vs. valores de predicciones poblacionales (PRED) en escala lineal y logarítmica que incluyan la línea de identidad y la de regresión lineal.
- Observaciones vs. IPRED en escala lineal y logarítmica que incluyan la línea de identidad y la de regresión lineal.
- Residuales ponderados (WRES) o WRES condicionales (CWRES) vs. PRED.
- Valor absoluto individual de WRES ($|IWRES|$) vs. IPRED.
- WRES o CWRES vs. tiempo o tiempo tras la administración (TAD, *Time After Dose*).
- Concentraciones observadas (o variable dependiente), IPRED y PRED vs. tiempo (superpuesto o individualmente).
- Concentraciones observadas, PRED e IPRED vs. tiempo o TAD en cada individuo.

- Distribución de frecuencias de los errores de predicción normalizados (NPDE, *Normalised Predictions Distribution Errors*), NPDE vs. tiempo y NPDE vs. PRED.
- Histogramas o QQ plot de IWRES y WRES o CWRES.
- Exploración predictiva Visual (VPC, *Visual Predictive Check*).

1.2.3.6. Plausibilidad y relevancia de los resultados

Además de los criterios estadísticos y diagnósticos gráficos expuestos anteriormente es preciso tener en cuenta los siguientes:

- La obtención de resultados fisiológicamente plausibles.
- La disminución de la varianza interindividual o residual al incorporar o eliminar algún parámetro del modelo.
- La relevancia clínica de las COV.
- La constatación de que no existe una elevada correlación entre los parámetros.

1.2.4. Simulaciones

La simulación, es un procedimiento consistente en generar datos a partir de un modelo, que puede realizarse en diferentes etapas del análisis PK de poblaciones. Para diseñar un estudio prospectivamente, la simulación es una herramienta de gran ayuda para examinar aspectos tales como la selección de esquemas de muestreo y regímenes de dosificación. El objetivo de las simulaciones es evaluar el impacto que las dosis y los tiempos de muestreo pueden tener sobre el contenido de la información. También son de gran utilidad para evaluar las asunciones elaboradas en un estudio determinado.

Las técnicas de simulación varían dependiendo del grado de aleatoriedad deseado. Si sólo se desea simular a un individuo típico, se consigue con una solución determinística del modelo estructural para una entrada (dosis) y tiempos de muestreo definidos; en este caso los valores de los parámetros de efectos fijos y de regresión son definidos por el valor típico poblacional. Además, no se precisa la incorporación de las variabilidades inter e intraindividuales, es decir, los valores de las varianzas de los efectos aleatorios, tanto interindividuales (ω^2) como residuales (σ^2), son fijados a cero. De forma similar, pueden simularse, con una solución determinística, las situaciones extremas para ciertos parámetros, fijando éstos en sus límites inferior y superior. Otras simulaciones pueden obtenerse especificando el grado de estocasticidad requerida para responder a las cuestiones deseadas. La variabilidad en estas simulaciones es realizada a partir de un generador de números aleatorios que produce valores de parámetros con una distribución de media y SD iguales a las de los parámetros de efectos aleatorios de un determinado modelo. La situación más frecuente es simular con los datos del modelo completo desarrollado, lo que permite utilizar todas las variables aleatorias con sus límites de probabilidad. Esto proporciona una valiosa información para conocer la influencia de diferentes regímenes de dosificación o de diferentes COV en la respuesta.

La simulación de ensayos clínicos (CTS, *Clinical Trial Simulation*) es una metodología emergente. La información de ensayos clínicos previos se puede utilizar para simular rangos de respuesta en ensayos futuros. Los resultados obtenidos son de gran utilidad para determinar aspectos clave como primeras dosis en humanos, diseño de estudios, número de sujetos, esquemas de muestro, etc.

Este procedimiento se emplea habitualmente también en la evaluación de los modelos PK poblacionales tanto usando una base de datos derivada de la empleada para el desarrollo del modelo (evaluación interna) como a partir de una nueva base de datos (evaluación externa). En el caso de emplear las simulaciones para obtener información extrapolada se requiere confianza en las asunciones del modelo subyacente. Una aplicación habitual es la simulación de dosis diferentes a las utilizadas en el estudio, lo cuál requiere un comportamiento PK lineal y un metabolismo no saturable para que los resultados no sean erróneas. El número de simulaciones depende del propósito de las mismas y se asume que deben realizarse al menos 200 con objeto de obtener valores medios y del orden de 1000 cuando se pretende obtener además intervalos de confianza (90).

1.2.5. Análisis de covariables

Las COV pueden considerarse factores pronóstico que explican parte de la variabilidad de parámetros específicos definidos dentro del contexto de un modelo PK de población. La identificación de las COV es un objetivo primordial en la evaluación de este tipo de modelos y permite explicar de manera más fidedigna la variabilidad PK así como aumentar la capacidad predictiva del modelo y favorecer la individualización de los tratamientos farmacoterapéuticos. La inclusión de factores pronóstico en el modelo debería aportar alguna de las siguientes ventajas:

- Favorecer la interpretación mecanicista del modelo.
- Favorecer la generación de hipótesis.
- Disminuir la variabilidad interindividual.
- Identificar subpoblaciones.
- Aumentar la capacidad predictiva del modelo.
- Mejorar ajustes posológicos en poblaciones determinadas basadas en diferencias PK.
- Permitir explorar el posible impacto de COV en el modelo.

El primer paso en el modelado de COV es aplicar los conocimientos recogidos en estudios previos así como tener en cuenta la utilidad clínica de la inclusión de las mismas. Además, es importante analizar si los datos y el diseño disponibles son adecuados para detectar el efecto de las COV.

Los datos incluidos en la base de datos de COV de los pacientes estudiados pueden tener limitaciones que deben ser evaluadas de manera específica entre las que destacan:

- El cambio en el valor de las COV a lo largo del tiempo del estudio, fenómeno conocido como "time-varying".
- Los errores en la medida.

- La ausencia de algunos valores de las COV analizadas en el estudio (*missing data*) (108,109).
- La elevada amplitud de los rangos de valores (Ej. parámetros bioquímicos) y la distribución alejada de la normal, en cuyo caso se recomienda una transformación logarítmica.

1.2.5.1. Tipos de covariables

Existen diferentes clasificaciones de los posibles factores pronóstico a evaluar. En función de la información que aportan las COV se pueden agrupar en:

- Antropométricas: peso (WGT, *weight*), altura (HGT, *height*), índice de masa corporal (BMI, *body mass index*), etc.
- Fisiológicas: edad (AGE, *age*), sexo (SEX, *sex*), embarazo, etc.
- Parámetros bioquímicos: creatinina sérica (CREA), BLR, albúmina sérica (ABS), etc.
- Variables fisiopatológicas: diálisis, neutropenia, etc.
- Variables del estudio: centro, técnica analítica, diseño, respondedores, etc.
- Grado de exposición: fármaco, metabolito, dosis, área bajo la curva (ABC), concentración máxima (C_{max}), etc.
- Parámetros de la enfermedad: duración de la enfermedad, respuesta, etc.
- Características del tratamiento: comedicación, tratamientos previos, etc.
- Hábitos o factores conductuales: tabaco, alcohol, dieta, ejercicio, etc.
- Tiempo: hora del día, tiempo tras la ingesta de comida, comienzo de tratamiento, etc.

En función del tipo de COV analizada se pueden clasificar en:

- Continuas: WGT, HGT, BMI, AGE, ABS, BIL, CREA, etc.
- Categóricas o Discretas:
 - Dicotómicas: SEX, medicación concomitante, patología, genotipo, diálisis, etc.
 - Categóricas ordenadas: estado funcional según la escala del *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), Índice Pronóstico Internacional (IPI), tratamiento, consumo de alcohol, consumo de tabaco, etc.
 - Categóricas no ordenadas: raza, centro de estudio, diagnóstico, período de tiempo, etc.

Los factores pronóstico pueden ser introducidas en el modelo PK poblacional siguiendo diferentes expresiones matemáticas en función del tipo de COV analizada.

1.2.5.2. Covariables continuas

La relación entre un parámetro PK poblacional (P) y una COV continua puede expresarse mediante correlaciones de tipo lineal, las cuales pueden expresarse de diferentes formas:

$$P = \theta_1 + \theta_{COV} \cdot COV \quad \text{Ecuación 21}$$

$$P = \theta_1 \cdot (1 + \theta_{COV} \cdot COV) \quad \text{Ecuación 22}$$

$$P = \theta_1 + \theta_{COV} \cdot (COV - Med(COV)) \quad \text{Ecuación 23}$$

$$P = \theta_1 + \theta_{COV} \cdot \left(\frac{COV}{Med(COV)} \right) \quad \text{Ecuación 24}$$

donde *Med* es el valor de la mediana de la COV estudiada, la cual también se expresa con frecuencia como media aritmética.

Especial atención reciben las relaciones alométricas frecuentemente utilizadas, las cuales permiten diferenciar subgrupos de población. Las ecuaciones 25 y 26 se usan para establecer la relación del peso corporal con el CL y el Vd, respectivamente.

$$P = \theta_1 \cdot COV^{0,75} \quad \text{Ecuación 25}$$

$$P = \theta_1 \cdot \left(\frac{COV}{COV} \right) \quad \text{Ecuación 26}$$

La relación entre P y COV puede alejarse de la linealidad, especialmente cuando las COV tienen un rango amplio de valores. Algunas de las expresiones no lineales más habituales se muestran a continuación:

$$P = \theta_1 \cdot e^{-\theta_{COV}} \quad \text{Ecuación 27}$$

$$P = \theta_1 \cdot COV^{\theta_{COV}} \quad \text{Ecuación 28}$$

$$P = \theta_1 \cdot (1 + \theta_{1COV} \cdot COV) \text{ si } COV \leq X \quad \text{Ecuación 29}$$

$$P = \theta_1 \cdot (1 + \theta_{2COV} \cdot COV) \text{ si } COV \geq X$$

$$P = \theta_1 + (COV < 40) \cdot \theta_{1COV} + (COV > 40) \cdot \theta_{2COV} \quad \text{Ecuación 30}$$

1.2.5.3. Covariables categóricas

En el caso de variables dicotómicas, como el SEX, que dividen la población en dos grupos se incluye un parámetro θ_{COV} que toma valores de 0 y 1. De esta forma la influencia de la COV solo se manifiesta para uno de los dos grupos, quedando el otro como referencia:

$$P = \theta_1 + \theta_{COV} \cdot COV \quad \text{Ecuación 31}$$

$$P = \theta_1 \cdot (1 + \theta_{COV} \cdot COV) \quad \text{Ecuación 32}$$

$$P = \theta_1 \cdot e^{\theta_{COV} \cdot COV} \quad \text{Ecuación 33}$$

Cuando las COV tienen más de dos categorías pueden introducirse en el modelo según las ecuaciones 34 y 35.

$$\begin{aligned}
 P &= \theta_1 \text{ si COV} = 1 \\
 P &= \theta_2 \text{ si COV} = 2 \\
 P &= \theta_3 \text{ si COV} = 3
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 34}$$

$$\begin{aligned}
 P &= \theta_1 \text{ si COV} = 1 \\
 P &= \theta_1 + \theta_2 \text{ si COV} = 2 \\
 P &= \theta_1 + \theta_2 + \theta_3 \text{ si COV} = 3
 \end{aligned}
 \tag{Ecuación 35}$$

1.2.5.4. Selección de covariables: análisis gráfico e inclusión a priori

Uno de los mayores problemas en la construcción de modelos de COV es la sobreparametrización. Esta situación origina dificultades de convergencia y fracasos en la estimación correcta de la covarianza (\$COV). Cuando dos o más COV están altamente correlacionadas (o hay desequilibrio entre COV discretas), habrá que seleccionar aquella o aquellas que tengan mayor influencia en la bondad del ajuste, con el fin de reducir la colinealidad entre las continuas y el desequilibrio entre las discretas (107). No es pertinente, por ejemplo, la inclusión del WGT y la superficie corporal (BSA, *Body Surface Area*) de manera simultánea ya que el segundo parámetro es derivado del primero y estarán por consiguiente altamente correlacionados. Así se puede simplificar en gran medida el complejo proceso de construcción del modelo de COV.

En la construcción del modelo de COV, es imperativo realizar un análisis previo de los factores pronóstico incluidos en el estudio. También es necesario investigar las evidencias fisiológicas previamente descritas sobre su influencia en los parámetros PK del fármaco estudiado. En este sentido, es evidente que la inclusión de diferentes isoenzimas del citocromo P-450 para explicar la PK de un fármaco que no se metaboliza por esta vía o analizar la variable SEX en un estudio realizado en cáncer de próstata no tiene sentido.

Este análisis inicial debería incluir la representación gráfica de las EBE de los parámetros PK individuales frente a los parámetros de efectos fijos y aleatorios, ayudando a identificar tanto las relaciones como la expresión matemática que pueda caracterizarla más adecuadamente (lineal, exponencial, etc.) (110).

1.2.5.5. Construcción del modelo de covariables

El proceso de identificación y cuantificación de la influencia potencial de COV ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia y complejidad metodológica. Todos los procedimientos o metodologías sistemáticas de construcción del modelo de COV tienen limitaciones. A pesar de que permiten obtener modelos con una bondad de ajuste satisfactoria, no existen garantías de encontrar el modelo idóneo.

A continuación se revisan las metodologías más actuales y frecuentemente utilizadas en la identificación y cuantificación de COV así como las más novedosas:

Los modelos aditivos generalizados (GAM, *Generalized Additive Modeling*) son modelos de regresión lineal múltiple que evalúan relaciones lineales y no

lineales entre las COV y los parámetros PK del modelo expresadas de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EBE = a + f(COV_1) + g(COV_2) + \dots + h(COV_N) \quad \text{Ecuación 36}$$

donde a es la intersección y f,g...h son funciones de tipo lineal y no lineal (111).

Este procedimiento sigue un proceso de inclusión-exclusión utilizando el AIC como criterio estadístico de bondad de ajuste en la selección del modelo. El GAM permite la selección, en etapas iniciales de la construcción del modelo de COV, de posibles factores pronóstico así como el tipo de relación observada (112). Adicionalmente, permiten explorar la presencia de sujetos influyentes en las estimaciones de los parámetros, mediante el valor de Cook, y en la precisión de la estimación de los mismos, mediante el criterio leverage/cov-ratio. El *bootstrap* GAM es una extensión de la metodología anterior que consiste en realizar el procedimiento GAM a N bases de datos generadas por muestreo con reemplazamiento a partir de la base de datos original (*bootstrapping*). Este procedimiento permite estimar el número de veces que se incluyó una COV en el modelo, así como determinar el tamaño más común del modelo de COV en las N bases de datos evaluadas, entre otros resultados (112).

El análisis de COV en dos etapas o gradual (SCM, *Step-wise Covariate Modeling*) es otro procedimiento de inclusión-exclusión que permite discriminar los efectos pronóstico más relevantes de entre un amplio conjunto de candidatos así como establecer posibles relaciones de una manera sistemática y automatizada. Esta metodología, a diferencia del GAM, permite cualquier tipo de parametrización de las COV además de evaluar la bondad del ajuste de cada modelo mediante la magnitud de la disminución de la OFV (LRT) y se puede implementar en el programa PsN (*Pearl-Speaks for NONMEM*). Incluye un primer paso de inclusión de COV para un nivel de significación estadística definido, habitualmente $p < 0,05$, hasta llegar a un modelo que no acepte ninguna COV adicional, denominado modelo completo de COV. A continuación realiza un proceso de eliminación de las COV de una en una acorde a un criterio estadístico más restrictivo, habitualmente $p < 0,01$ o $p < 0,001$, hasta llegar al modelo final. Sus principales limitaciones son su sensibilidad a los efectos de colinealidad cuando ésta se presenta entre dos o más COV y que no garantiza la selección del mejor modelo posible ya que es posible que alguna combinación con elevada influencia no llegue a ser evaluada (104,107,113).

Existen variantes como el *cross-validation* SCM o el *bootstrap* SCM en las que se realiza el procedimiento SCM sobre subdivisiones de la base de datos original o nuevas bases de datos generadas a partir de la original, respectivamente. Estas metodologías permiten determinar tanto la frecuencia de inclusión de las COV analizadas como la del tamaño del modelo final y corrigen algunas de las limitaciones del procedimiento SCM. Además, el *bootstrap* SCM permite investigar la influencia de los individuos en el modelo de COV, así como el error tipo I cometido por la inclusión de COV e identificar correlaciones entre las factores pronósticos introducidos en el modelo. Estos procedimientos pueden ser muy costosos desde el punto de vista computacional (tiempos de análisis superiores a una semana) por lo que Khandelwal y cols. (114) propusieron una aproximación lineal de la influencia de las COV basado en un método de estimación de primer

orden condicional propuesta capaz de disminuir los tiempos de análisis hasta 4000 veces.

Un procedimiento de construcción de modelos de COV alternativo consiste en el empleo de algoritmos de búsqueda como la aproximación de Wald (WAM, *Wald's Approximation Method*) y el LASSO (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) que parten del modelo final y evalúan los posibles modelos restringidos derivados del mismo. En el caso del WAM, el criterio de selección del mejor ajuste es el BIC junto con la aproximación de Wald lo que implica tener definida previamente la matriz de covarianza de las COV. En el caso del LASSO, fue introducido en la PK de poblaciones por Ribbing y cols. (115) y es más adecuado para bases de datos pequeñas. Este proceso tiene una mejor capacidad predictiva además de no necesitar la especificación de un p -valor para la selección de COV. Su principal limitación radica en la incapacidad de ser aplicado a todo tipo de parametrización como es el caso por ejemplo de las relaciones tipo potencial (104).

El método de estimación completo de efectos fijos (FFME, *full fixed effects model estimation*) es una aproximación que se basa en la medida de la precisión de los parámetros estimados y en la relevancia clínica que tiene el potencial efecto de la COV. El proceso se ejecuta en una única etapa (NONMEM) con las COV previamente predefinidas y los resultados son fáciles de interpretar, lo que constituyen las principales ventajas del mismo. Sin embargo, el FFME es muy sensible a las COV correlacionadas, no incluye las relaciones entre los parámetros y las COV, lo que puede sesgar las estimaciones de las relaciones incluidas. Así mismo, la estabilidad del modelo puede ser un problema cuando se establecen un número elevado de relaciones entre parámetros y COV. El método de estimación completo de efectos aleatorios (FRME, *full random effects model estimation*), a diferencia del FFME, no necesita omitir las correlaciones entre las COV, hecho que mitiga algunas de las limitaciones de la aproximación FFME (116,117) aunque la experiencia con este método es todavía muy reducida.

Otros algoritmos de búsqueda de COV que no han sido estudiados en profundidad por sus limitaciones y escaso uso son, en terminología anglosajona, los denominados *Tree*, *Random Forest* y *OSCAR*.

La tabla I-4 recoge los procedimientos de construcción de modelos de COV más comúnmente utilizados junto con sus principales ventajas y desventajas.

Tabla I-4. Métodos de construcción del modelo de covariables (adaptada de Byon 2013) (107).

Método	Definición	Ventajas	Desventajas	Ref.
FFME (Full Fixed effects Model Estimation)	<ul style="list-style-type: none"> Estimar todas las COV de interés predefinidas de manera simultánea y hacer inferencias. 	<ul style="list-style-type: none"> Ejecución simple sin construcción del modelo. Resultado fácil de interpretar. Modelo final obtenido en un paso. 	<ul style="list-style-type: none"> Cuidadosa selección pre-especificado de COV necesarias. Sin intención de elaborar predicciones. 	(117)
FRME (Full Random effects Model Estimation)	<ul style="list-style-type: none"> Análogo al FFME, pero proporciona estimaciones de todas las relaciones entre COV y parámetros. 	<ul style="list-style-type: none"> Ejecución simple sin construcción del modelo. Resultado fácil de interpretar. No es sensible a las correlaciones entre COV. 	<ul style="list-style-type: none"> Problemas con modelos finales pre-definido inestable. Sin intención de elaborar predicciones. Escasa experiencia. 	(117)
SCM (Stepwise Covariate Modeling)	<ul style="list-style-type: none"> Paso de inclusión de COV, seguido del de eliminación. 	<ul style="list-style-type: none"> Concepto simple y fácil implementación (PSN). Permite analizar COV sobre varios parámetros en la misma ejecución. 	<ul style="list-style-type: none"> Selección de sesgos. Comparaciones múltiples sin corrección. Debe generar el modelo de COV total antes del modelo final. 	(113)
WAM (Wald's Approximation Method)	<ul style="list-style-type: none"> A partir del modelo final de COV calcula la LRT aproximada para todos los posibles modelos restringidos. El modelo final se selecciona en base a la máxima (actual) BIC derivada de los modelos ajustados con NONMEM para los 10-15 modelos más probables. 	<ul style="list-style-type: none"> Menos ejecuciones con un gran número de COV. 	<ul style="list-style-type: none"> Requiere un modelo de COV completo con una matriz de covarianza definida antes del modelo final. 	(118)
GAM (Generalized Additive Modeling)	<ul style="list-style-type: none"> Se realiza la regresión entre las estimaciones de los parámetros individuales y las COV utilizando un modelo aditivo lineal generalizado. 	<ul style="list-style-type: none"> Concepto simple y fácil implementación. 	<ul style="list-style-type: none"> Shrinkage. Correlaciones entre parámetros. Dificultad con COV que varían con el tiempo. Solo evalúa la influencia en un parámetro. 	(111)
LASSO (Least Absolute Shrinkage and Selection Operator)	<ul style="list-style-type: none"> Todas las COV tienen que normalizarse con media = 0 y desviación estándar = 1. 	<ul style="list-style-type: none"> Superior a SCM en la obtención de modelos predictivos de COV en bases de datos pequeñas. 	<ul style="list-style-type: none"> Los beneficios son despreciables con bases de datos extensas. Parametrización restringida. 	(115)

Ref.: referencia; LRT: Likelihood Ratio Test; BIC: criterio de información bayesiano; PSN: Pearl-speaks-NONMEM; COV: covariable.

1.2.5.6. Covariables perdidas (*missing covariates*)

La pérdida o ausencia de información de algunas COV en la base de datos (MD, *Missing Data*) son un problema frecuente en los estudios clínicos. Es habitual la pérdida de datos identificadores del paciente o detalles de la administración del fármaco. Siempre que sea posible, deben definirse procedimientos para su mejor manejo de forma prospectiva. Se diferencian tres categorías de datos perdidos: perdidos completamente aleatorios (MCAR, *Missing Completely at Random*), perdidos aleatoriamente (MAR, *Missing At Random*) y perdidos no aleatoriamente (MNAR, *Missing Not At Random*) (108).

El método elegido para el manejo de los MD de COV es un proceso clave con gran repercusión en la capacidad predictiva del modelo desarrollado. Las soluciones habituales a este problema incluyen la eliminación del caso/sujeto y la imputación del valor mediante las siguientes estrategias:

- Asignar el valor de la media o la mediana de la muestra.
- Estimar el valor mediante regresión lineal cuando se conoce su relación con otra COV y ha sido bien establecida en la población estudiada.
- Asignar el valor mediante un procedimiento de maximización de la esperanza.

Cada una de estas aproximaciones presenta requerimientos metodológicos y limitaciones potenciales definidas por el prototipo de los MD. Las limitaciones analíticas, junto con los errores en la recogida de muestras también se consideran dentro de las observaciones perdidas.

El manejo de datos que están por debajo del límite de cuantificación (BLQ, *Bellow Limit of Quantification*) de la técnica analítica ha sido objeto de amplias discusiones. Éstos pueden eliminarse si no son relevantes desde el punto de vista farmacológico o si su contribución al ajuste del modelo es mínima. Si éste no es el caso, el proceso es más complejo ya que el verdadero valor de ese dato será inferior al límite de cuantificación de la técnica analítica (LLOQ, *lower limit of quantification*), pero superior a cero. En estos casos, Beal propone conservar la información que pueden proporcionar estos datos, sin modificar la probabilidad (119).

1.2.6. Evaluación del modelo

La evaluación de un modelo es un proceso imprescindible en los análisis PK poblacionales debido a las asunciones cometidas por los diferentes métodos de estimación poblacionales que condicionan la precisión y exactitud de los resultados obtenidos. Aún siendo un procedimiento recomendado por las agencias reguladoras no hay un consenso sobre su realización y corresponde al experto en farmacocinética seleccionar justificadamente la metodología más adecuada (91,92).

Este proceso se define básicamente como la evaluación de la capacidad de predicción de un modelo (91) y debe demostrar que el modelo final es un buen descriptor de los datos para el objetivo deseado (92). Bajo la asunción de Box de

que “todos los modelos son erróneos, pero algunos son útiles” (120), la evaluación de un modelo PK puede tener un enfoque descriptivo, si su “utilidad” u objetivo es resumir los datos estudiados, o predictivo si se pretende aplicar en la predicción de resultados clínicos como la realización de simulaciones de regímenes de dosificación (106,121).

La evaluación de un modelo PK poblacional puede realizarse de forma interna o externa, en función de la base de datos utilizada. La evaluación interna utiliza un subconjunto de los datos totales que se van a analizar, dejando la mayor parte de los datos para la construcción y refinamiento del modelo, mientras que la evaluación externa precisa el uso de una fuente externa de datos, es decir, datos procedentes de un nuevo estudio experimental que no han sido utilizados en el desarrollo del modelo.

1.2.6.1. Parámetros utilizados en la evaluación del modelo

Estos parámetros cuantifican la magnitud de las diferencias entre las observaciones y las predicciones (errores de predicción) así como la exactitud y precisión de las mismas (122).

Entre los parámetros más utilizados destacan la media del error de predicción (MPE, *Median Prediction Error*) para determinar el sesgo de predicción del modelo y la media del error de predicción absoluto (MAPE, *Median Absolute Prediction Error*) o la media de la raíz cuadrada del error (RMSE, *Root Mean Squared Prediction Error*) si lo que se pretende es la evaluación de la precisión. Las siguientes ecuaciones definen el MPE, MAPE y RMSE:

$$MPE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \frac{(pred_j - obs_j)}{obs_j} \times 100 \quad \text{Ecuación 37}$$

$$MAPE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \left[\frac{|(pred_j - obs_j)|}{obs_j} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 38}$$

$$RMSE = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \sqrt{(pred_j - obs_j)^2} \times 100 \quad \text{Ecuación 39}$$

donde, $pred_j$, representa el j -ésimo valor de concentración predicha; obs_j , el j -ésimo valor de concentración observada; y N corresponde al número de concentraciones incluidas en el estudio.

Se consideran modelos precisos y exactos aquellos con un valor de MPE y MAPE o RMSE iguales o inferiores al 10 % y 25 %, respectivamente (121,123,124).

Los errores de predicción estandarizados se han utilizado tradicionalmente como un criterio mejorado de evaluación del modelo ya que tienen en cuenta la variabilidad en las predicciones y la correlación entre los errores de predicción en un mismo individuo (125). El programa NONMEM calcula estos parámetros bajo la denominación de WRES y CWRES para los algoritmos de estimación FO y FOCE, respectivamente (124). Estos parámetros son obtenidos usando la linearización de

primer orden de la función del modelo lo que presenta ciertos problemas como el aumento del error tipo I cuando se comparan modelos o se evalúa la influencia de COV (126).

Mentré y Escolano (126). propusieron una estandarización de los errores de predicción denominado discrepancias de predicción (*pd*, *prediction discrepancies*). Los *pd* para cada observación se definen como el percentil que ocupa en la completa distribución de los mismos asumiendo la hipótesis nula que el modelo es adecuado. Si el modelo es válido, estos deben seguir una distribución uniforme [0, 1], asunción que puede ser evaluada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Además, también pueden ser representados frente a diferentes variables independiente (tiempo, PRED) para detectar tendencias en las predicciones. Este parámetro no tiene en cuenta la correlación de las observaciones en un mismo individuo por lo que Brendel y cols. (127) propusieron la decorrelación de los *pd* a través de los NPDE. Estos autores establecen que para que un modelo sea "válido", los NPDE deben seguir una distribución $N(0,1)$ que puede evaluarse mediante las siguientes pruebas estadísticas:

- Wilcoxon de los rangos con signo: determina si la media es significativamente diferente de 0.
- Fisher de varianza: prueba si la varianza difiere significativamente de 1.
- Shapiro-Wilk: evalúa si la distribución es significativamente diferente a la normal.
- Test global: se rechaza la hipótesis nula si una de las tres pruebas previamente comentados (media, varianza y normalidad) es significativo con una corrección de Bonferroni ($P = 0,05/3$) (debe ser cercano a la unidad) (128).

Comets y cols. (129) desarrollaron un paquete estadístico en R que estima los NPDE y realiza los test previamente descritos. Adicionalmente, a partir de la versión 7.1.2. de NONMEM, este parámetro es obtenido en la ejecución de los modelos y puede ser listado en el archivo de salida como NPDE (124,129). Se recomienda el uso de los NPDE para la evaluación tanto interna como externa de modelos PK poblacionales sobre el resto de parámetros disponibles para evaluar los errores de predicción (128).

1.2.6.2. Evaluación interna

La evaluación interna consiste en determinar si el modelo desarrollado es adecuado, empleando los mismos datos utilizados en el desarrollo del modelo. Esta metodología es de gran utilidad cuando es complicado o requiere mucho tiempo la obtención de nuevos datos para la evaluación del modelo como, por ejemplo, el caso de los pacientes pediátricos. La evaluación de modelos no sigue una norma estricta y algunos de los métodos sugeridos incluyen criterios estándar de selección de modelos (GOF, *shrinkage*, RSE, etc.) así como aproximaciones más sofisticadas como la división de los datos (*data splitting*), técnicas de remuestreo (*bootstrap*, validación cruzada, *jackknife*) o las validaciones predictivas posteriores (91,103,106,121,123,124,127,130,131).

1.2.6.2.a. Evaluación interna básica basada en las observaciones

Consiste en aplicar los criterios expuestos en el apartado 1.2.3. (Selección de modelos) del presente trabajo de tesis. Así pues, es preciso evaluar la incertidumbre en la estimación de los parámetros, la contracción de la varianza de los efectos aleatorios (*shrinkage*), los diagnósticos gráficos, análisis de sensibilidad (*outliers*), los GOF, etc.

1.2.6.2.b. División de datos o *data splitting*

Esta técnica realiza la partición aleatorizada de los datos disponibles para el análisis de población en subconjuntos de datos para construir el modelo (habitualmente 2/3 de la base de datos original) y para validarlo (habitualmente 1/3 de la base de datos original), denominados grupo de estudio y grupo de evaluación, respectivamente. Su principal limitación radica en que la precisión predictiva se basa en el tamaño de la muestra generado en la división de los datos (132).

1.2.6.2.c. Técnicas de remuestreo

El *bootstrapping* y la validación cruzada son métodos para estimar errores generalizados basándose en técnicas de remuestreo (*resampling*) con la ventaja, frente al método de partición, de utilizar todo el conjunto de datos para desarrollar el modelo (133). Las estimaciones resultantes de los errores generalizados se usan con frecuencia para escoger entre varios modelos así como para evaluar la generalización de las predicciones del modelo.

1.2.6.2.c.1. *Bootstrap*

El término *bootstrapping* se deriva de la idea de generar repetidamente bases de datos con una distribución similar a la original. *Bootstrap* es una técnica general para estimar distribuciones de muestreos. Se han descrito numerosas aproximaciones para establecer la distribución de las muestras generadas a partir de la original (134) siendo el muestreo con reemplazamiento de los individuos que componen la base de datos original, *bootstrap* no paramétrico, la más frecuente en PK de poblaciones al ser habitual el desconocimiento de la verdadera distribución (106).

Los parámetros de efectos fijos y aleatorios se estiman en cada una de las bases de datos generados por *bootstrapping*. Efron y Tibshirani (135) sugieren, de manera general, un número mínimo de 200 conjuntos de datos para estimar el SE de los parámetros estimados y de 1000 para determinar el IC de los mismos. Posteriormente se calcula el valor medio de cada parámetro estimado en las bases de datos *bootstrap*, así como su IC al 95 %. Se considera un modelo adecuado y estable cuando el valor típico del parámetro poblacional, estimado con la base de datos original, está dentro de los IC 95 % de los parámetros obtenidos en las bases de datos *bootstrap*.

Los *bootstrap* pueden ser utilizados para la selección de modelos, la evaluación de su estabilidad y la determinación de la confianza en la estimación de

los parámetros, por lo que es considerado uno de los procedimientos de elección en la evaluación de modelos PK poblacionales (136). Además, esta metodología puede ser utilizada para identificar la región en el espacio paramétrico más consistente con los datos experimentales (137).

1.2.6.2.c.2. Validación cruzada o *cross validation*

La validación cruzada es una técnica de evaluación basada en el uso de replicados de subconjuntos de datos procedentes de la muestra total. Esencialmente, es una partición repetida de los datos (*data splitting*), pero utilizando la totalidad de los mismos. Se extraen k subconjuntos de tamaño similar (habitualmente $N-1$, siendo N el número de individuos) de la base de datos original. Se construyen k modelos eliminando cada vez uno de los k subconjuntos de datos. Los k modelos se evalúan y comparan para definir el modelo final basándose en la totalidad de los datos (138).

1.2.6.2.d. Evaluación mediante simulaciones de Monte Carlo

1.2.6.2.d.1. Validación predictiva posterior (PPC, *Posterior Predictive Check*)

Los PPC fueron descritos por Yano y cols. (139) y es una metodología basada en simulaciones de Monte Carlo que evalúa si un descriptor o parámetro de interés PK (E_{max} , EC_{50} , C_{max} , ABC) es calculado adecuadamente con los datos observados y su distribución posterior de predicción generada de acuerdo con el modelo basado en las simulaciones. En estas simulaciones, la distribución del parámetro seleccionado para la comparación y el correspondiente p-valor son derivados de replicados de simulación (124,127). Una vez identificado los parámetros de interés, se estiman sus distribuciones en los replicados generados y se comparan con los de los datos originales.

Los PPC precisan simulaciones de las distribuciones posteriores de los parámetros estimados por el modelo, las cuales no están disponibles a menos que se haya utilizado un modelo bayesiano completo. Girard y cols. (140) sugieren utilizar un *bootstrap* paramétrico para solventar dicha limitación y simular las distribuciones posteriores de los parámetros del siguiente modo (106,121):

- Simular un nuevo conjunto de observaciones con un diseño idéntico al original utilizando el modelo final.
- Ajustar el modelo final al nuevo conjunto de observaciones y obtener nuevas estimaciones de los parámetros de efectos fijos y aleatorios.
- Simular un nuevo conjunto de observaciones a partir de los parámetros estimados con la base de datos simulada.
- Ajustar el modelo final al nuevo conjunto de observaciones y obtener nuevas estimaciones de todos los parámetros.
- Repetir estos pasos al menos 200 veces.

1.2.6.2.d.2. Exploración Predictiva Visual (VPC) y Numérica (NPC, *Numerical Predictive Check*)

El VPC y los NPC son procedimientos basados en simulaciones de Monte Carlo a partir del modelo desarrollado y cuyos datos deben seguir una distribución y características similares a los datos originales con los que fue desarrollado el modelo siempre y cuando este caracterice los datos de manera adecuada (141).

Esta metodología evalúa gráficamente si el modelo poblacional reproduce la tendencia central y la variabilidad de los datos observados mediante simulaciones (141-143). El VPC describe las observaciones que se esperarían para un conjunto de individuos que utilizan la misma estructura del conjunto de entrada (registros de dosificación, tiempo, COV) de los datos reales del modelo siendo así un método descriptivo, pero no proporciona una distribución predictiva. Los gráficos obtenidos mediante el VPC permiten mostrar si un modelo es adecuado cuando la mayoría de los datos experimentales se encuentran distribuidos aleatoriamente a lo largo del tiempo entre los intervalos de predicción definidos.

Estos análisis gráficos son frecuentemente utilizados tanto en las etapas de desarrollo como en la evaluación del modelo. El número de ensayos de simulación depende del propósito del VPC aunque se asume que 1000 simulaciones pueden ser suficientes (124). Los percentiles y las agrupaciones de los datos (*bins*) dependen de la riqueza de los mismos. Los datos deben ser agrupados buscando la homogeneidad de los mismos en cada división manteniendo un equilibrio entre el número de agrupaciones y el número de datos en cada una de ellas para poder describir adecuadamente la distribución de los mismos (142,144). Los percentiles 90 ó 95, tanto de los datos simulados como los originales, son los comúnmente estimados para cada división con el objetivo de comparar la distribución de los mismos pudiendo disminuirse al percentil 80 cuando no se dispone de un número elevado de datos por agrupación (inferior a 100) (107). Los VPC estratificados por COV relevantes (grupos de edad o peso), dosis o rutas de administración son habitualmente empleados para demostrar el rendimiento del modelo en estos grupos de población (103).

Post y cols. (145) han desarrollado extensiones del VPC, tales como el VPC cuantificado (QVPC, *Quantified VPC*) y el *bootstrap* VPC (BVPC), para poder solventar las limitaciones de los análisis que incluyen datos no especificados (perdidos o no observados). Los VPC corregidos por predicciones (pcVPC, *prediction-corrected VPC*) mitigan la pérdida de sensibilidad del VPC típico (146). Por último, la metodología de los VPC estandarizados (SVPC, *Standardized VPC*) es una alternativa para identificar la mala especificación del modelo estructural o la estimación inadecuada de efectos aleatorios (147).

Los NPC comparan, al igual que los VPC, los datos simulados con el modelo desarrollado a partir de los datos originales. En contraposición, al análisis gráfico previamente descrito se establece la comparación estadística de las expectativas de los datos simulados con las basados en los datos observados (124,148).

1.2.6.3. Evaluación externa

La evaluación externa es un procedimiento que se realiza utilizando datos procedentes de un estudio diferente al utilizado para construir el modelo (base de datos de evaluación). En este tipo de evaluación se comparan los datos predichos por el modelo final (desarrollado con la base de datos original) con las observaciones de la base de datos de evaluación. De hecho, la capacidad del modelo final desarrollado sobre un conjunto determinado de datos cuando se proyecta sobre otros datos diferentes constituye la forma más fiable y segura de establecer la verosimilitud de un modelo desarrollado para su posterior recomendación y utilización en clínica. El procedimiento de comparación es similar al que se realiza en la evaluación interna utilizando, entre otras metodologías, técnicas de remuestreo, simulaciones de Monte Carlo, evaluación de la incertidumbre en la estimación de los parámetros, *shrinkage*, etc. (121,123).

1.2.7. Software

1.2.7.1. Software de análisis

El *software* utilizado en el análisis PK de poblaciones ha sido revisado de manera pormenorizada por diferentes autores debido a la gran relevancia que tiene en este tipo de análisis computacionales (90,123,149-152). Todos los métodos y alternativas de *software* están basados en una aproximación jerárquica del modelo de efectos mixtos no lineal y se diferencian en la forma en la que estiman los parámetros del mismo. La mayoría de los programas incluyen librerías de modelos estructurales y de error, que están predefinidos, aunque, en ocasiones, puede ser preciso definir modelos más complejo.

La selección del *software* utilizado en el análisis poblacional exige la consideración de factores como la facilidad de manejo (interfaz intuitiva, plataforma nativa, *clusters*, coste, etc.), el contenido (algoritmos de estimación implementados) y el soporte (clínico y técnico) (151). A continuación se muestran los programas más ampliamente utilizados en el análisis poblacional basados en una aproximación jerárquica del modelo de efectos mixtos no lineal.

- NONMEM (*Non-Linear Mixed Effects Modeling*)

NONMEM v.7.3. (ICON Development Solutions, Hanover, EEUU) es el programa más utilizado en la actualidad, tanto en el ámbito académico como en la industria farmacéutica, para el desarrollo de análisis PK/PD. Este programa fue desarrollado por Beal y Sheiner en la Universidad de California San Francisco en la década de los 70. A pesar de carecer de una interfaz "amigable" o intuitiva y la necesidad de codificar las subrutinas en FORTRAN 77, su diseño le confiere gran versatilidad en el modelado y elevada potencia de cálculo lo que le convierten en el *software* de referencia en el análisis PK poblacional.

Existen programas complementarios como PsN, Wings for NONMEM, Census 2, Piraña, NONMEMory, PMx, etc. que facilitan el desarrollo de modelos poblacionales basados en el uso del programa NONMEM (153-157). Estos programas satisfacen desde los requerimientos más simples, como la obtención y

visualización de resultados de un modelo PK, hasta los métodos de evaluación de modelos como el VPC, los métodos de simulación/estimación con reemplazamiento (*bootstrap*), el SCM, etc.

- MONOLIX (*MOdèles NON LINéaires à effets miXtes*)

MONOLIX v.4.3.2. (Lixoft, Orsay, France) es un programa que permite estimar los parámetros y seleccionar el mejor modelo, obtener los GOF y realizar simulaciones. Las principales ventajas de este *software* son la intuitiva interfaz, que además implementa la representación gráfica de los resultados, la característica del código libre y su gratuidad. Por otro lado, el entorno del programa es en si mismo una limitación en la versatilidad del modelado junto con la restricción del método de estimación al previamente descrito SAEM (158).

- Phoenix NLME™

Phoenix NLME™ v.1.1. (Certara, Princeton, USA) permite el tratamiento de los datos, la creación y selección de modelos PK/PD, así como la generación de tablas y gráficos de los resultados.

Existen otros programas utilizados en el desarrollo de modelos de poblaciones como NLINMIX, MIXLIN, SAAMII, WinNonMix, Kinetica™, Winbugs/PKBUGs, etc. Además de los programas basados en modelos de efectos mixtos no lineales cobran especial relevancia el uso de lenguajes de cálculo técnico como MATLAB. También están disponibles otros programas que no asumen distribución definida de los parámetros entre los que destaca el Pmetrics el cual es una actualización del clásico MM-USCPACK (159).

Finalmente, mencionar los programas que desarrollan también modelos PK con base fisiológica (PBPK, *physiologically based pharmacokinetics*), simulaciones, etc. entre los que destaca SimCyp, programa capaz de simular los procesos ADME de los fármacos en distintos grupos poblacionales, de acuerdo con modelos mecanicistas y correlaciones in vitro–in vivo. El programa consta de una librería de sustratos (fármacos) y otra de grupos poblacionales, así como de los algoritmos, subrutinas y otras herramientas matemático-estadísticas que definen los correspondientes modelos cinéticos y que permiten la simulación en diferentes condiciones. Es una herramienta de gran utilidad para los estudios preclínicos y para la predicción e interpretación de los cambios en los perfiles cinéticos que se producen en diversas circunstancias: fisiológicas, patológicas, interacciones, etc.

1.2.7.2. Software de exploración gráfica

La complejidad de los datos y resultados analizados en el desarrollo de modelos poblacionales requiere el uso de programas capaces de generar gráficos de diagnóstico esenciales en este tipo de estudios. Los programas más utilizados son: S-PLUS, lenguaje R, Xpose y RFN (paquete y scripts, respectivamente, implementados en R que utilizan los archivos generados por NONMEM) (112,160), SAS, etc. Algunas de las herramientas mencionadas anteriormente incluyen la representación de los gráficos más habitualmente empleados en el diagnóstico de los modelos poblacionales como MONOLIX, Phoenix NLME, NLINMIX, MIXLIN, WinNonMix, Kinetica™, SAAM II, MATLAB o SimCyp.

1.2.7.3. Software de simulación

Existen numerosos programas que permiten realizar simulaciones como pueden ser los previamente citados NONMEM, MONOLIX, Phoenix NLME™, S-PLUS, SAS, MATLAB, R-Language, SAAM II, PK-Sim®, etc. Entre las alternativas al *software* más enfocado al modelado poblacional están Simulo, GoldSim o GastroPlus™, siendo este último un programa con base mecanicista de modelado y simulaciones PK, PK/PD y PBPK utilizado tanto en fases preclínicas y clínicas. Una alternativa todavía en fase precomercial en la simulación PBPK es PhysPK® que aporta potentes herramientas de simulación en un entorno de programación orientado a iconos.

2.- OBJETIVOS

Objetivos

- Poner a punto una técnica analítica de cromatografía líquida ultrarrápida para cuantificar concentraciones en plasma de doxorubicina y su principal metabolito activo, doxorubicinol, que permita su utilización en la práctica clínica.
- Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional en pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkin para doxorubicina y doxorubicinol.
- Evaluar la capacidad descriptiva y predictiva del modelo poblacional desarrollado mediante técnicas de evaluación interna basadas en simulaciones de Monte Carlo (*Visual Predictive Check* y *Normalized Prediction Distribution Error*) y de *bootstrap*.
- Realizar un análisis farmacocinético/farmacodinámico entre parámetros cinéticos que reflejen el grado de exposición del paciente al fármaco y metabolito y parámetros de toxicidad hematológica.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. TÉCNICA ANALÍTICA

Se describe a continuación de manera resumida los aspectos más relevantes de la técnica analítica puesta a punto para la cuantificación de DOX y DOXol en plasma humano (anexo I).

3.1.1. Reactivos

- DOX (Eveve Pharma, Unterach, Austria).
- DOXol (Toronto Research Chemicals Inc., Ontario, Canadá).
- DAU, daunoblastina, (Pfizer GEP S.L. Madrid, España).
- Metanol y acetronitrilo grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Agua ultra pura obtenida por un sistema MiliQ Milipore®.
- Ácido ortofosfórico, sulfato de zinc y trietilamina (TEA) (Panreac, Barcelona, España).
- Filtros de nylon de 0,2 µm (Cronus Filter, Reino Unido).

3.1.2. Equipo

Se utilizó un equipo Shimadzu de UHPLC constituido por los siguientes componentes:

- Inyector automático modelo SIL-20A XR y número de serie L20444670007.
- Dos bombas de gradiente binario modelo LC-20AD XR, números de series L20434770094 US y L20434770096 US.
- Horno modelo CTO-10AS VP y número de serie C21044636319 CS.
- Desgasificador de membrana modelo DGU-20A5 y número de serie SEG-5-0224.
- Detector de fluorescencia modelo RF-10A XL y número de serie C20953501406 S1.
- Programa LCSolution v.1.24. SP1 como sistema de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos (Shimadzu Corporation, Tokio, Japón).

La figura MM-1 muestra el equipo utilizado junto con las condiciones cromatográficas empleadas.

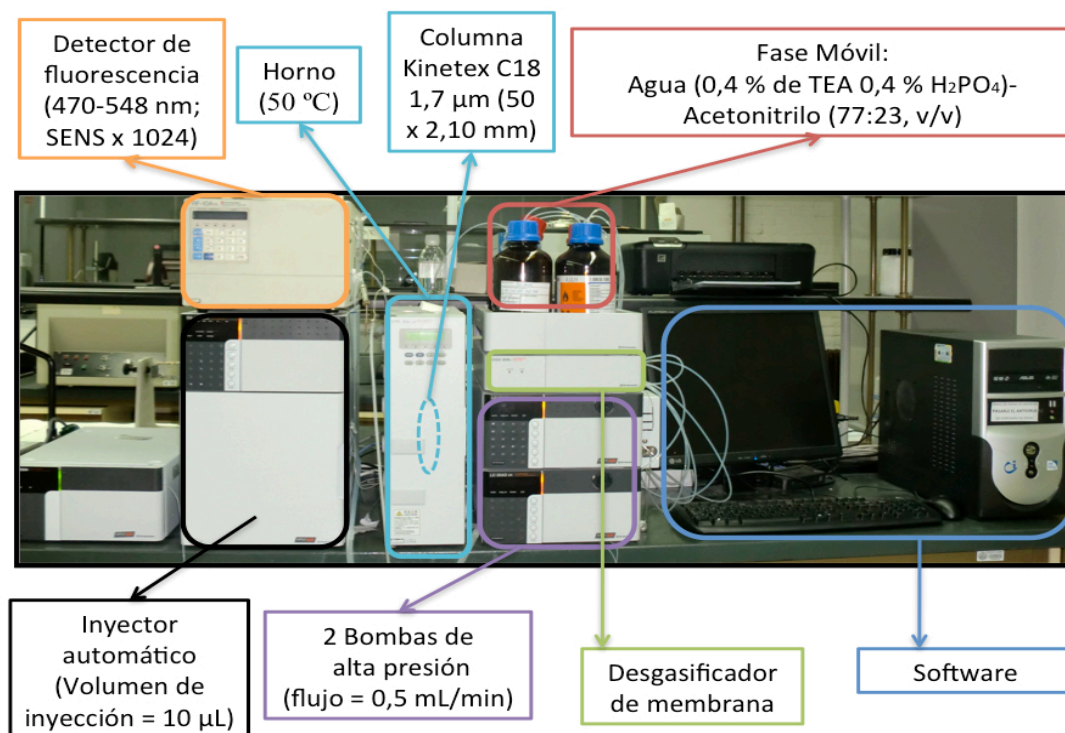


Figura MM-1. Equipo y condiciones cromatográficas de la técnica de UHPLC utilizada para la determinación y cuantificación de doxorubicina y doxorubicinol en muestras de plasma humano.

TEA, trietilamina.

3.1.3. Procedimiento

Los patrones de calibración fueron elaborados en plasma humano en los rangos de 8-3000 ng/mL y de 3-150 ng/mL para el fármaco y metabolito, respectivamente. Las soluciones stock y los patrones de calibrado fueron almacenaron a -80 °C.

Como agente precipitante se utilizó una mezcla metanol/agua (50:50, v/v) al 20 % de sulfato de zinc para la desproteínización de las muestras de plasma sanguíneo. A dicha mezcla se incorporó DAU a una concentración de 150 ng/mL como control de calidad siendo motivo de la repetición del análisis (error en la inyección, en el tratamiento de muestra, etc.) una desviación del valor de la altura del pico cromatográfico superior al 20 % con respecto al valor medio obtenido de los análisis de la recta de calibrado.

El tratamiento de muestras problema y patrones consistió en la adición de 100 μL del agente precipitante previamente especificado a 100 μL de plasma sanguíneo, seguido agitación de la mezcla en el vortex durante 30 segundos y posterior centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. La figura MM-2 muestra un esquema de la elaboración del agente precipitante junto con el tratamiento de muestras empleado.

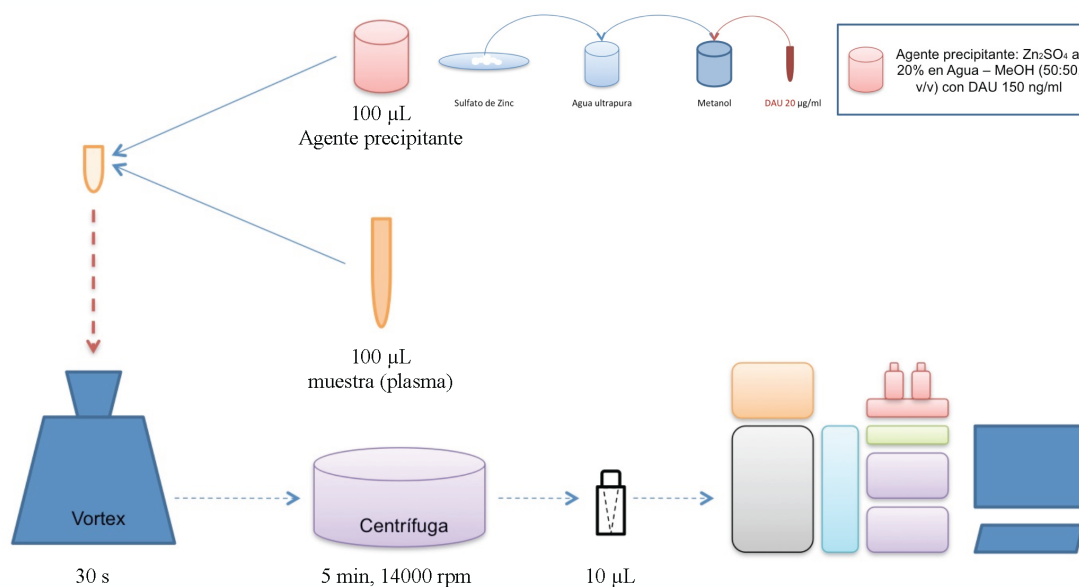


Figura MM-2. Esquema del tratamiento de muestra para el análisis cromatográfico.

DAU: daunorrubicina; MeOH: metanol.

La separación de los analitos a estudio se llevó a cabo mediante la inyección de 10 µL del sobrenadante resultante de la muestra acondicionada en una columna Kinetex® C₁₈ (50 mm x 2,10 mm, tamaño de partícula 1,70 µm, Phenomenex®) para su elución con una fase móvil compuesta por agua (conteniendo 0,4 % de trietilamina y de ácido ortofosfórico) / acetonitrilo (77:23, v/v) a 0,5 mL/min y 50° C.

Las concentraciones de los analitos se cuantificaron utilizando la medida de las alturas de los picos detectados por fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 548 \text{ nm}$; amplificación = x 1024). El análisis de las muestras se realizó por duplicado en los casos en los que la altura de la respuesta de la DAU fue superior al 20 % de la media obtenida con los patrones de calibrado, como se describió previamente.

3.1.4. Validación

La técnica analítica desarrollada fue evaluada de acuerdo con las directrices de las guías de validación para métodos bioanalíticos de la EMA (161) y la FDA (162). Los resultados tuvieron que cumplir los criterios de linealidad, selectividad, exactitud y precisión tanto intra- como interdía. Además, se realizaron ensayos para conocer la estabilidad de las muestras, el fenómeno de *carry-over* y el LLOQ de la técnica para las condiciones de análisis. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS v.21.0 (IBM Corporation, EEUU).

3.2. PACIENTES Y TRATAMIENTO FARMACOTERAPÉUTICO

El estudio fue realizado en el periodo comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 31 de julio de 2015 en pacientes diagnosticados de LNH, tratados con diferentes protocolos antineoplásicos que incluyen DOX. Los pacientes eran procedentes de los siguientes servicios de hematología del territorio nacional:

- Hospital Universitario de Salamanca.
- Hospital Universitario 12 de Octubre.
- Hospital Germans Trias i Pujol.
- Hospital del Mar.
- Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

Los pacientes recibieron DOX dentro del protocolo R-CHOP administrado de forma ambulatoria en ciclos de 21 días hasta un total de seis ciclos o retirada prematura. Dicha pauta consistió en la administración de rituximab por vía iv a una dosis de 375 mg/m² en el día 1 del ciclo y de quimioterapia tipo CHOP (ciclofosfamida 750 mg/m² iv en el día 1 del ciclo + DOX convencional 50 mg/m² iv en el día 1 del ciclo + vincristina 1,4 mg/m² iv en el día 1 del ciclo + prednisona 60 mg/m² por vía oral en los días 1-5 del ciclo). Antes de la infusión de rituximab se administró paracetamol (1000 mg por vía iv), polaramine (5 mg por vía iv) y prednisona el día 1 del ciclo. La dosis de DOX pasó de 50 a 65 mg/m² cuando se recurre al protocolo R-MegaCHOP. En ambos protocolos se administró en perfusión iv de 30 a 60 minutos de duración.

Se recomendó profilaxis primaria de la neutropenia febril con factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF, *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) según la práctica habitual de cada centro.

3.2.1. Criterios de inclusión

- Edad: superior a 18 años.
- Estado funcional ECOG: inferior a 3.
- Función hematológica adecuada: neutrófilos > 1,5 x 10⁹/L y plaquetas > 75 x 10⁹/L; se aceptarán valores inferiores si son debidos a infiltración en médula ósea por el linfoma.
- Función hepática adecuada: ALT y AST < 2,5 x límite superior normal.
- Función renal normal: CREA < 2,5 x límite superior normal y BLR inferior a 1,2 mg/dL salvo que las alteraciones sean secundarias al linfoma.
- FEVI: en reposo ≥ 55 %, sin antecedentes documentados de ICC, arritmias graves o infarto agudo de miocardio.
- Consentimiento informado otorgado voluntariamente por el paciente.

3.2.2. Criterios de exclusión

- Afectación conocida del sistema nervioso central por el linfoma.
- Enfermedad cardiovascular secundaria clínicamente significativa:
 - Hipertensión arterial no controlada (presión arterial sistólica >160 mmHg)

- o presión arterial diastólica > 100 mmHg).
- Arritmias cardíacas ventriculares o supraventriculares no controladas (fibrilación auricular con frecuencia ventricular media >100 lpm en reposo).
- Angina de pecho sintomática (clase II o superior según los criterios de *Canadian Cardiovascular Society*; es decir, con limitación para actividades habituales de la vida diaria).
- ICC previa o actual.
- FEVI < 55 %.
- Hipertrofia ventricular izquierda moderada o severa.
- Alteraciones valvulares significativas (estenosis o regurgitaciones valvulares moderadas o severas).
- Pacientes con mala ventana ecocardiográfica que no permita una cuantificación fiable de la FEVI por ecocardiografía.
- Indicios de cualquier infección grave, aguda o crónica y activa.
- Antecedentes de reacción alérgica a las antraciclinas o antecedentes de una reacción inusual a otros componentes de la pauta terapéutica en investigación o a tratamientos similares.

3.2.3. Criterios de retirada del tratamiento

- Necesidad de interrupción del tratamiento o retraso en su administración durante un periodo superior a dos semanas por motivos de toxicidad.
- Retirada del consentimiento del paciente (por requerimiento del paciente, negación a recibir el tratamiento o por cualquier otro motivo).
- Enfermedad concomitante que haga necesaria la retirada del paciente.
- Desarrollo de alguna reacción adversa grave (compromete la vida del paciente).
- Violaciones mayores al protocolo (errores en el procedimiento de envío o extracción de muestras, tratamiento inadecuado de las mismas, falta de información en el muestreo, pérdida de seguimiento del paciente, etc.).

3.2.4. Recogida de datos y toma de muestra

Se obtuvo información sobre la enfermedad (diagnóstico, centro de tratamiento estado funcional ECOG, IPI, y ciclo de tratamiento), el tratamiento (fecha de administración, dosis, duración infusión y tiempos de muestreo) y el estado del paciente. Además, se revisaron las historias clínicas con objeto de extraer los factores que pudieran afectar a la evolución clínica del paciente como tratamientos concomitantes, factores de riesgo cardiovasculares, etc. Entre las variables recogidas se encuentran los siguientes parámetros:

- Demográficos: AGE (años) y SEX (hombre/mujer).
- Antropométricos: WGT (kg), HGT (cm). Se estimaron la BSA (m²), el BMI (kg/m²) y el peso libre de grasa (LBW, *lean body weight*, kg) a partir de los parámetros demográficos y antropométricos.
- Bioquímicos: aspartato aminotransferasa (AST, UI/L), alanina aminotransferasa (ALT, UI/L), BLR (mg/dL) y CREA (mg/dL). Se estimó el

aclaramiento de creatinina (CL_{CR}) (mL/min) por la ecuación de Cockcroft-Gault.

- Hematológicos: hemoglobina (HB, g/dL), LEU ($\times 10^9/L$), NEU ($\times 10^9/L$), recuento de linfocitos (LIN, $\times 10^9/L$) y PLA ($\times 10^9/L$).
- Cardíacos: FEVI (%) (método Simpson biplanar desde la proyección apical, y la FEVI resultante será la media de 3 determinaciones).

Para los parámetros bioquímicos o hematológicos, en algunos pacientes, solo se recogió el valor numérico cuando este estaba fuera del rango de normalidad. En estos casos, se codificó como el valor medio del rango de valores habituales.

Para estimar los tiempos óptimos para la mejor caracterización de la PK de DOX y DOXol adaptándolos en lo posible a las condiciones del tratamiento ambulatorio y el contexto clínico del paciente se analizaron las gráficas de las derivadas parciales de cada parámetro con respecto al tiempo generadas por el programa Phoenix WinNonlin v.5.3. Además, se tuvieron en cuenta los tiempos de muestreo utilizados en el desarrollo de modelos poblacionales de DOX previamente publicados (40,46-48,50). En base a estas consideraciones los tiempos seleccionados fueron: 0, 30, 90 y 180 minutos después del final de la perfusión de DOX. En los casos que no fuera posible recoger la totalidad de las muestras, se obtuvieron como mínimo la correspondiente al momento final de la infusión (C_{max}) y al mayor periodo de tiempo posible antes de que el paciente abandonara el centro hospitalario. Las muestras de sangre se obtuvieron a partir de una vía no utilizada para la administración del fármaco. Se extrajeron 4 mL de sangre en tubos con EDTA, se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4° C y el plasma se congeló a -80° C. Las muestras, adecuadamente identificadas, se enviaron en hielo seco en un período inferior a cinco meses, junto con el informe de monitorización (anexo II), al laboratorio de análisis para la determinación de las concentraciones de DOX y DOXol.

Este estudio se llevó a cabo en cumplimiento con los principios derivados de la Declaración de Helsinki (Seúl, octubre de 2008). Todos los pacientes fueron informados de los posibles riesgos y beneficios de la participación en el estudio así como de los objetivos del mismo. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado por parte del paciente.

La tabla MM-1 recoge las características de los pacientes y tratamiento con DOX finalmente incluidos en el estudio, 15 de los cuales fueron incluidos en el ensayo clínico GEL-R-COMP (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02012088>).

Tabla MM-1. Características de los pacientes y del tratamiento con doxorubicina.

Covariables (n=45)	Unidades	Media (DE)	Rango	Rango normalidad	Valores perdidos
Edad	años	66 (15)	26 - 84	-	-
Peso	kg	71 (12)	43 - 110	-	-
Altura	cm	164 (11)	143 - 192	-	-
Superficie Corporal	m ²	1,8 (0,2)	1,3 - 2,3	-	-
Índice de Masa Corporal	kg/m ²	26,5 (3,9)	19,9 - 37,6	-	-
Peso libre de grasa	kg	47,9 (10,0)	28,7 - 69,5	-	-
<i>Características de tratamiento</i>					
Dosis/superficie corporal	mg/m ²	51 (7)	25 - 71	-	-
Dosis	mg	89 (14)	53 - 130	-	-
Duración de la infusión	h	0,5 (0,2)	0,2 - 1,3	-	-
Velocidad de la infusión	mg/h	210 (119)	68 - 666	-	-
<i>Parámetros bioquímicos</i>					
Aclaramiento de creatinina	mL/min	91 (40)	40 - 201	90 - 140	2
Bilirrubina	mg/dL	0,44 (0,19)	0,10 - 0,70	0,1 - 1,2	4
ALT	IU/L	23 (18)	7 - 88	1 - 37	3
AST	IU/L	25 (13)	12 - 64	1 - 41	3
<i>Parámetros hematológicos</i>					
Hemoglobina	g/dl	11,6 (1,6)	8,5 - 15,2	13 - 18	2
Leucocitos	x 10 ⁹ /L	6,3 (2,7)	2,5 - 15,5	4,5 - 10,8	2
Neutrófilos	x 10 ⁹ /L	4,1 (2,4)	1,0 - 14,1	1,4 - 6,5	3
Linfocitos	x 10 ⁹ /L	1,4 (0,8)	0,3 - 4,0	1,2 - 3,5	2
Plaquetas	x 10 ⁹ /L	280 (118)	52 - 648	7,2 - 11,1	2

DE: desviación estándar; AST: aspartato amino transferasa; ALT: alanino amino transferasa.

3.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

3.4. ANÁLISIS PK/PD

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

4.- RESULTADOS

4.1. TÉCNICA ANALÍTICA

Se ha puesto a punto una técnica analítica para la determinación y cuantificación de DOX y DOXol en plasma humano, la cual ha sido validada de acuerdo con las recomendaciones de la FDA y la EMA (161,162). Este trabajo ha sido publicado en el *Journal of Chromatography B* y el artículo completo se recoge en el anexo I (163).

4.1.1. Validación de la técnica analítica

4.1.1.1. Linealidad y límite de cuantificación

Se demostró la linealidad de la técnica analítica para el fármaco y el metabolito en los rangos de 8-3000 ng/mL y 3-150 ng/mL, respectivamente, siendo los coeficientes de correlación lineal superiores a 0,99 para las rectas de calibrado de ambos analitos. Los errores de los valores de concentración recalculada fueron en todos los casos inferiores al 15 % (20 % para el LLOQ). Los LLOQ de la técnica para el DOX y DOXol fueron de 8 ng/mL (CV=10,9 %) y 3 ng/mL (CV=8,5 %), respectivamente. Los datos fueron ponderados por el factor $1/x^2$ debido al amplio rango de concentraciones evaluado.

4.1.1.2. Selectividad

La selectividad de la técnica obtenida para DOX, DOXol y DAU se puso de manifiesto en los picos del cromatograma mostrado en la figura R-1. El tiempo total de análisis de la técnica cromatográfica fue de 3,5 minutos y los tiempos de retención de los analitos problema fueron de 0,8 y 1,3 minutos para DOXol y DOX, respectivamente.

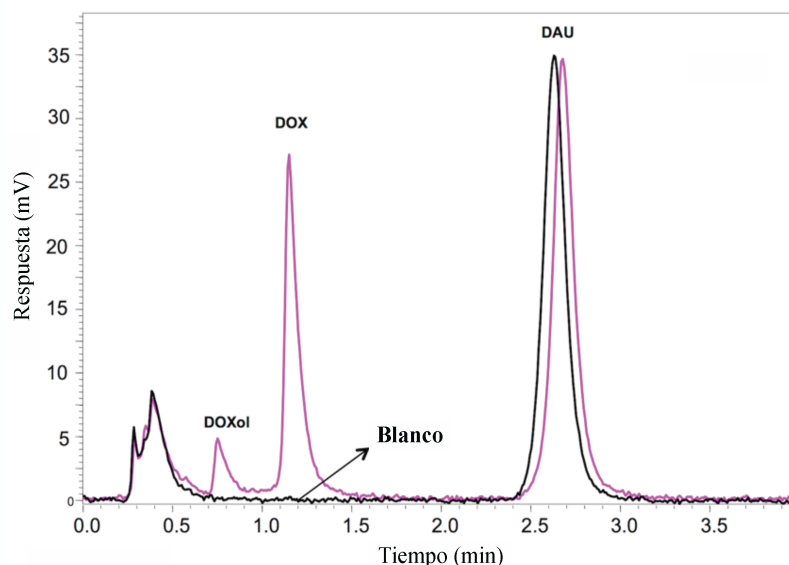


Figura R-1. Cromatograma correspondiente a un muestra de plasma con 150 ng/mL de daunorubicina (DAU), blanco, superpuesta con una muestra patrón de 200 ng/mL de doxorubicina (DOX), 20 ng/mL de doxorubicinol (DOXol) y 150 ng/mL de DAU.

Reproducido (adaptado) con el permiso de Pérez-Blanco JS y cols. (163). Copyright Elsevier B.V. (2014).

4.1.1.3. Precisión y Exactitud

La totalidad de los CV estimados para la precisión intra- e interdía fueron inferiores al 15 % tanto para el fármaco como para el metabolito. Los porcentajes de recuperación, expresados como media \pm SD, fueron del $100,30 \pm 8,10$ % para la DOX y de $99,49 \pm 6,42$ % para el DOXol. Estos datos, junto con los resultados favorables de la prueba *t de student* para muestras apareadas (asumiendo varianzas desiguales), pusieron de manifiesto la adecuada precisión y exactitud de la técnica analítica desarrollada en el rango de concentraciones estudiado.

4.1.1.4. Carry-over

La transferencia entre dos muestras analizadas de manera consecutiva, fenómeno denominado *carry-over*, fue inferior al 20 % del límite de cuantificación de la técnica analítica.

4.1.1.4. Estabilidad

La degradación los analitos estudiados fue inferior al 15 % en todos los estudios realizados, con lo que se demostró la estabilidad:

- Corto plazo: 6 horas en las condiciones de trabajo.
- Post-preparativa: 12 horas posteriores al tratamiento de muestra.
- Congelación-descongelación: 3 ciclos en 72 horas.

Todos los estudios fueron realizados en las muestras analizadas. El análisis de los ciclos de congelación-descongelación adicionalmente se evaluó en las soluciones stock.

4.2. PACIENTES Y TRATAMIENTO FARMACOTERAPÉUTICO

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

4.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

4.4. ANÁLISIS PK/PD

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

5.- DISCUSIÓN

En oncología, la TDM es una estrategia de optimización posológica, cuya utilización debe estar justificada para su aplicación en la práctica clínica. La disponibilidad de una técnica analítica adecuada es un requisito esencial para abordarla y en ocasiones constituye una importante limitación (165). Las técnicas cromatográficas precisan de tiempo y personal altamente cualificado, recursos no siempre disponibles en la práctica asistencial. Sin embargo, debido a sus adecuadas características de especificidad y sensibilidad, así como la ausencia de alternativas analíticas, un gran número de fármacos empleados en el tratamiento del cáncer son habitualmente cuantificados por esta metodología. Este hecho justifica la necesidad de desarrollar y optimizar métodos cromatográficos rápidos y sencillos para su aplicación en el contexto clínico.

En comparación con las técnicas previamente desarrolladas de HPLC, las de UHPLC, como la optimizada en este trabajo para la determinación y cuantificación de DOX y DOXol en plasma, permiten reducir los tiempos, solventes y volúmenes de muestra requeridos en la cuantificación de los analitos así como mejorar la resolución y sensibilidad del análisis (166).

El tratamiento de muestra es un proceso clave en la cuantificación de los analitos y condiciona los resultados en numerosos aspectos. En esta técnica se emplea la desproteínización, procedimiento que presenta numerosas ventajas en comparación con otros métodos alternativos que utilizan la extracción líquido-líquido o en fase sólida. Entre las ventajas que presenta esta metodología podemos destacar las siguientes:

- Precisa cantidades considerablemente inferiores de disolventes.
- No necesita la utilización de cartuchos de extracción (fase sólida).
- Requiere un tiempo de preparación de la muestra notablemente inferior.
- Es mucho más sencilla de realizar.
- Tiene un menor coste.

Sin embargo, este acondicionamiento de muestra presenta algunos inconvenientes derivados de la dilución de la muestra, con la consecuente pérdida de sensibilidad, y la posible inestabilidad de los analitos en presencia de los agentes precipitantes. Estas potenciales limitaciones, implícitas en este tipo de tratamiento de muestra, no plantearon problemas importantes ya que se ha conseguido un LLOQ adecuado para cuantificar DOX y DOXol a los tiempos de muestreo diseñados en el estudio PK y la técnica ha mostrado resultados satisfactorios de estabilidad postpreparativa de las muestras durante seis horas.

El reducido volumen de inyección (10 μ L), requisito de la metodología UHPLC, disminuye el volumen de extracción de sangre necesaria y hacen de esta técnica una buena alternativa para modelos animales en los que el volumen de sangre extraído puede ser una limitación en el diseño experimental.

El tiempo de análisis es de 3,5 minutos y los tiempos de retención se establecieron en 0,8, 1,2 y 2,5 minutos para DOXol, DOX y DAU, respectivamente. En la actualidad se han desarrollado numerosos métodos con una buena precisión y exactitud para la cuantificación de antraciclinas en fluidos biológicos (4,12,13,167-173) de las que solo cinco consiguen tiempos de análisis inferiores a cinco minutos

utilizándose en todas ellas detectores de masas (MS/MS) aspecto que incrementa considerablemente no solo el coste del análisis sino la infraestructura necesaria para su realización. De hecho, la mayoría de los métodos descritos en la literatura científica han sido desarrollados con objeto de ser aplicados en investigación, mientras que el método puesto a punto en este trabajo resulta mucho más fácil de implementar en el análisis rutinario de muestras de pacientes oncológicos.

La técnica ha sido validada en los rangos de concentración de 3-150 ng/mL y 8-3000 ng/mL para DOXol y DOX, respectivamente, siguiendo las guías de las agencias reguladoras las cuales recomiendan la evaluación de la linealidad, sensibilidad, precisión (inter- e intradía), exactitud y estabilidad de acuerdo con criterios específicos. Adicionalmente se ha estudiado el fenómeno de cesión o *carry-over* siendo inferior al 20 % como recomiendan las guías previamente mencionadas.

En el desarrollo de una técnica analítica resulta esencial que el LLOQ se adapte a las necesidades de cuantificación esperadas en el estudio que se pretende realizar teniendo en cuenta el margen de concentraciones que alcanza habitualmente el fármaco y su metabolito cuando se administran en dosis terapéuticas. Los mínimos valores que permite cuantificar con fiabilidad la técnica desarrollada han resultado ser de 8 ng/mL y 3 ng/mL para fármaco y metabolito, respectivamente. Estos resultados son del mismo orden de magnitud que los que presentan la mayoría de técnicas previamente publicadas (2,5,7,9,170-172,174). No obstante, es preciso considerar que aquellos métodos, que emplean detectores de masas o acondicionamientos más complejos, presentaron límites de cuantificación entre cinco y diez veces inferiores a los determinados con esta técnica (8,11,12,167,173,175). Teniendo en cuenta las concentraciones que previsiblemente pueden obtenerse de fármaco y metabolito con las dosis administradas en los pacientes oncológicos incluidos en nuestro estudio, los LLOQ conseguidos con este método son suficientes para afrontar su adecuada cuantificación en los márgenes de tiempo post-administración diseñados.

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.

6.- CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto una técnica analítica de cromatografía líquida ultrarrápida (UHFLC) acoplada a un detector de fluorescencia para cuantificar concentraciones en plasma humano de doxorubicina y su principal metabolito activo, doxorubicinol. Su simplicidad, rapidez, bajo coste y volumen de muestra requerido, así como su adecuado límite de cuantificación la convierten en un método analítico adecuado para la monitorización en la práctica clínica de dichas entidades farmacológicamente activas.
- Se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional en pacientes diagnosticados de linfoma no Hodgkin para doxorubicina y doxorubicinol. El modelo estructural incluye tres compartimentos para el fármaco y dos para el metabolito, con distribución y eliminación de primer orden.
- Ninguna de las covariables analizadas (peso, altura, superficie corporal, peso libre de grasa, aclaramiento de creatinina, bilirrubina, sexo y aspartato amino transferasa) ha mostrado influencia significativa sobre el aclaramiento plasmático del fármaco.
- Los parámetros farmacocinéticos del modelo final propuesto presentan valores del mismo orden de magnitud que los previamente publicados en poblaciones diferentes.
- La evaluación interna del modelo utilizando técnicas basadas en simulaciones de Monte Carlo (*Visual Predictive Check* y *Normalized Prediction Distribution Error*) y de *bootstrap* ha sido satisfactoria, garantizando la adecuada capacidad descriptiva y predictiva del mismo. En consecuencia, el modelo puede ser utilizado en la optimización posológica de doxorubicina en este tipo de pacientes utilizando algoritmos bayesianos.
- No se encontraron relaciones con significación estadística entre los parámetros farmacocinéticos que reflejan el grado de exposición del paciente al fármaco y metabolito (área bajo la curva y concentración máxima de doxorubicina y doxorubicinol así como área bajo la curva total de fármaco más metabolito) y los parámetros de toxicidad hematológica, neutropenia y leucopenia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang J, Reijmers T, Chen L, Van Der Heijden R, Wang M, Peng S, et al. Systems toxicology study of doxorubicin on rats using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry based metabolomics. *Metabolomics*. 2009 Dec;5(4):407–18.
2. Urva SR, Shin BS, Yang VC, Balthasar JP. Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Mar 15;877(8-9):837–41.
3. Wei G, Xiao S, Si D, Liu C. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. *Biomed Chromatogr*. 2008 Nov 1;22(11):1252–8.
4. Fahmy OT, Korany MA, Maher HM. High performance liquid chromatographic determination of some co-administered anticancer drugs in pharmaceutical preparations and in spiked human plasma. *J Pharm Biomed Anal*. 2004 Mar 10;34(5):1099–107.
5. Kümmerle A, Krueger T, Dusmet M, Vallet C, Pan Y, Ris HB, et al. A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements. *J Pharm Biomed Anal*. 2003 Oct 15;33(3):475–94.
6. Maudens KE, Stove CP, Cocquyt VFJ, Denys H, Lambert WE. Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Nov 15;877(30):3907–15.
7. Gilbert CM, McGeary RP, Filippich LJ, Norris RLG, Charles BG. Simultaneous liquid chromatographic determination of doxorubicin and its major metabolite doxorubicinol in parrot plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Nov 5;826(1-2):273–6.
8. Arnold RD, Slack JE, Straubinger RM. Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 Sep 5;808(2):141–52.
9. Zhou Q, Chowbay B. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*. 2002 Nov 7;30(4):1063–74.
10. Chin DL, Lum BL, Sikic BI. Rapid determination of PEGylated liposomal doxorubicin and its major metabolite in human plasma by ultraviolet-visible high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002 Nov 5;779(2):259–69.

11. de Bruijn P, Verweij J, Loos WJ, Kolker HJ, Planting AS, Nooter K, et al. Determination of doxorubicin and doxorubicinol in plasma of cancer patients by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1999 Jan 15;266(2):216–21.
12. Sottani C, Poggi G, Melchiorre F, Montagna B, Minoia C. Simultaneous measurement of doxorubicin and reduced metabolite doxorubicinol by UHPLC-MS/MS in human plasma of HCC patients treated with TACE. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013 Feb 1;915-916:71–8.
13. Maudens KE, Stove CP, Lambert WE. Quantitative liquid chromatographic analysis of anthracyclines in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 Sep 1;879(25):2471–86.
14. Young RC, Ozols RF, Myers CE. The anthracycline antineoplastic drugs. *N Engl J Med.* 1981 Jul 16;305(3):139–53.
15. Rodríguez C. Antineoplásicos activos sobre el ADN (II): agentes intercalantes, inhibidores de las topoisomerasas y desnaturalizantes. En: *Terapéutica farmacológica de los trastornos neoplásicos e inmunológicos.* Edita: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid: BGA Asesores; 2011. p. 43-54.
16. Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospitales. Doxorubicina. En: *Medicamentos citostáticos.* 4ª ed. Madrid: SL Gamonal, 2005. 109-17.
17. Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 1997;54 Suppl 4:1–7.
18. Injac R, Strukelj B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat.* 2008 Dec;7(6):497–516.
19. Ficha técnica de Doxorubicina. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2010.
20. Speth PA, van Hoesel QG, Haanen C. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin Pharmacokinet.* 1988 Jul 1;15(1):15–31.
21. Tchambaz L, Schlatter C, Jakob M, Krähenbühl A, Wolf P, Krähenbühl S. Dose adaptation of antineoplastic drugs in patients with liver disease. *Drug Saf.* 2006;29(6):509–22.
22. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(6):431–44.
23. Swenson CE, Bolcsak LE, Batist G, Guthrie TH, Tkaczuk KH, Boxenbaum H, et al. Pharmacokinetics of doxorubicin administered i.v. as Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with

- conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer drugs*. 2003 Mar;14(3):239–46.
24. Rigacci L, Mappa S, Nassi L, Alterini R, Carrai V, Bernardi F, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin in combination with cyclophosphamide, vincristine, prednisone and rituximab in patients with lymphoma and concurrent cardiac diseases or pre-treated with anthracyclines. *Hematol Oncol*. 2007 Dec;25(4):198–203.
 25. Rahman AM, Yusuf SW, Ewer MS. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):567–83.
 26. Ewer MS, Martin FJ, Henderson C, Shapiro CL, Benjamin RS, Gabizon AA. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. *Semin Oncol*. 2004 Dec;31(6 Suppl 13):161–81.
 27. Rafiyath SM, Rasul M, Lee B, Wei G, Lamba G, Liu D. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis. *Exp Hematol Oncol*. 2012;1(1):1–9.
 28. van Dalen EC, van der Pal HJH, Caron HN, Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(4):CD005008.
 29. Lu P. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Semin Nucl Med*. 2005 Jul;35(3):197–201.
 30. Legha SS, Benjamin RS, Mackay B, Ewer M, Wallace S, Valdivieso M, et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann Intern Med*. 1982 Feb;96(2):133–9.
 31. Chlebowski RT, Paroly WS, Pugh RP, Hueser J, Jacobs EM, Pajak TF, et al. Adriamycin given as a weekly schedule without a loading course: clinically effective with reduced incidence of cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep*. 1980 Jan;64(1):47–51.
 32. Weiss AJ, Metter GE, Fletcher WS, Wilson WL, Grage TB, Ramirez G. Studies on adriamycin using a weekly regimen demonstrating its clinical effectiveness and lack of cardiac toxicity. *Cancer Treat Rep*. 1976 Jul;60(7):813–22.
 33. Keefe DL. Anthracycline-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol*. 2001 Aug;28(4 Suppl 12):2–7.
 34. Lenzhofer R. [Selective toxicity of cytostatic agents: studies on the cardiotoxicity of doxorubicin, its pathogenesis and contraindications] [abstract]. *Wien Klin Wochenschr Suppl*. 1983;144:3–31.

35. Pérez C, Agustí MA, Tornos P. Cardiotoxicidad tardía inducida por antraciclina. *Med Clin*. 2009 Sep;133(8):311-3.
36. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? *Int J Cardiol*. 2007 Apr 12;117(1):6-15.
37. Rushing DA, Raber SR, Rodvold KA, Piscitelli SC, Plank GS, Tewksbury DA. The effects of cyclosporine on the pharmacokinetics of doxorubicin in patients with small cell lung cancer. *Cancer*. 1994 Aug 1;74(3):834-41.
38. Sledge GW. Doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy for metastatic breast cancer: the Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Semin Oncol*. 1995 Oct;22(5 Suppl 12):123-5-discussion126-9.
39. Holmes FA, Madden T, Newman RA, Valero V, Theriault RL, Fraschini G, et al. Sequence-dependent alteration of doxorubicin pharmacokinetics by paclitaxel in a phase I study of paclitaxel and doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996 Oct;14(10):2713-21.
40. Wilde S, Jetter A, Rietbrock S, Kasel D, Engert A, Josting A, et al. Population pharmacokinetics of the BEACOPP polychemotherapy regimen in Hodgkin's lymphoma and its effect on myelotoxicity. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(4):319-33.
41. Joerger M, Huitema ADR, Meenhorst PL, Schellens JHM, Beijnen JH. Pharmacokinetics of low-dose doxorubicin and metabolites in patients with AIDS-related Kaposi sarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 May 1;55(5):488-96.
42. Wong AL, Seng KY, Ong EM, Wang LZ, Oscar H, Cordero MT, et al. Body fat composition impacts the hematologic toxicities and pharmacokinetics of doxorubicin in Asian breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014. Feb;144(1):143-52.
43. Piscitelli SC, Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with small cell lung cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 1993 May;53(5):555-61.
44. Benjamin RS, Riggs CE, Bachur NR. Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1973 Jul;14(4):592-600.
45. Wilde S, Jetter A, Zaigier M, Rietbrock S, Menzel H, Sieber M, et al. Population pharmacokinetics of cyclophosphamide, doxorubicin and etoposide in 30 patients with BEACOPP chemotherapy. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002 Dec 1;40(12):586-8.
46. Joerger M, Huitema ADR, Richel DJ, Dittrich C, Pavlidis N, Briasoulis E, et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of

- doxorubicin and cyclophosphamide in breast cancer patients: a study by the EORTC-PAMM-NDDG. *Clin Pharmacokinet.* 2007;46(12):1051–68.
47. Callies S, de Alwis DP, Wright JG, Sandler A, Burgess M, Aarons L. A population pharmacokinetic model for doxorubicin and doxorubicinol in the presence of a novel MDR modulator, zosuquidar trihydrochloride (LY335979). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Feb;51(2):107–18.
 48. Kontny NE, Würthwein G, Joachim B, Boddy AV, Krischke M, Fuhr U, et al. Population pharmacokinetics of doxorubicin: establishment of a NONMEM model for adults and children older than 3 years. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Jan 13;71(3):749–63.
 49. Völler S, Boos J, Krischke M, Würthwein G, Kontny NE, Boddy AV, et al. Age-Dependent Pharmacokinetics of Doxorubicin in Children with Cancer. *Clin Pharmacokinet.* Springer International Publishing; 2015 Apr 28;:1–11.
 50. Escudero-Ortiz V, Ramón-López A, Duart MAJ, Pérez-Ruixo JJ, Valenzuela B. Farmacocinética poblacional de doxorubicina aplicada a la personalización de su dosificación en pacientes oncológicos. *Farm Hosp.* 2012 Jul;36(4):282–91. Spanish.
 51. Thompson PA, Rosner GL, Matthay KK, Moore TB, Bomgaars LR, Ellis KJ, et al. Impact of body composition on pharmacokinetics of doxorubicin in children: a Glaser Pediatric Research Network study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009 Jul;64(2):243–51.
 52. Robert J, Bui NB, Vrignaud P. Pharmacokinetics of doxorubicin in sarcoma patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 1987;31(6):695–9.
 53. Robert J, Illiadis A, Hoerni B, Cano JP, Durand M, Lagarde C. Pharmacokinetics of adriamycin in patients with breast cancer: correlation between pharmacokinetic parameters and clinical short-term response. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1982 Aug;18(8):739–45.
 54. Freyer G, Tranchand B, Ligneau B, Ardiet C, Souquet PJ, Court-Fortune I, et al. Population pharmacokinetics of doxorubicin, etoposide and ifosfamide in small cell lung cancer patients: results of a multicentre study. *Br J Clin Pharmacol.* 2000 Oct;50(4):315–24.
 55. Greene RF, Collins JM, Jenkins JF, Speyer JL, Myers CE. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer Res.* 1983 Jul 1;43(7):3417–21.
 56. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeos H, E TK, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics.* 2011 Sep 14;(21):440–6.
 57. Cerqueira BB, Lasham AH, Shelling AN, Al-Kassas R. Nanoparticle

- therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Nov;97(Pt A):140-51.
58. Milla P, Dosio F, Cattel L. PEGylation of proteins and liposomes: a powerful and flexible strategy to improve the drug delivery. *Curr Drug Metab.* 2012 Jan;13(1):105-19.
59. Cote B, Carlson LJ, Rao DA, Alani AWG. Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *J Control Release.* Elsevier B.V; 2015 Sep 10;213(C):128-33.
60. Marchal S, Hor El A, Millard M, Gillon V, Bezdetsnaya L. Anticancer Drug Delivery: An Update on Clinically Applied Nanotherapeutics. *Drugs.* Springer International Publishing; 2015 Aug 30;:1-11.
61. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov Today Biosilico;* 2010 Oct 1;15(19-20):842-50.
62. Petschauer JS, Madden AJ, Kirschbrown WP, Song G, Zamboni WC. The effects of nanoparticle drug loading on the pharmacokinetics of anticancer agents. *Nanomedicine.* 2015 Feb;10(3):447-63.
63. Boucek RJ, Olson RD, Brenner DE, Ogunbunmi EM, Inui M, Fleischer S. The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem.* 1987 Nov 25;262(33):15851-6.
64. Olson RD, MUSHLin PS, Brenner DE, Fleischer S, cusack BJ, Chang BK, et al. Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988 May;85(10):3585-9.
65. P S Mushlin, Cusack BJ, Boucek RJ, Andrejuk T, Li X, Olson RD. Time-related increases in cardiac concentrations of doxorubicinol could interact with doxorubicin to depress myocardial contractile function. *Br J Pharmacol.* 1993 Nov 1;110(3):975.
66. Lal S, Sandanaraj E, Wong ZW, Ang PCS, Wong NS, Lee EJD, et al. CBR1 and CBR3 pharmacogenetics and their influence on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2008 Oct;99(10):2045-54.
67. Lal S, Wong ZW, Sandanaraj E, Xiang X, Ang PCS, Lee EJD, et al. Influence of ABCB1 and ABCG2 polymorphisms on doxorubicin disposition in Asian breast cancer patients. *Cancer Sci.* 2008 Apr;99(4):816-23.
68. Rudek MA, Sparreboom A, Garrett-Mayer ES, Armstrong DK, Wolff AC, Verweij J, et al. Factors affecting pharmacokinetic variability following

- doxorubicin and docetaxel-based therapy. *Eur J Cancer*. 2004 May;40(8):1170–8.
69. Sparreboom A, Planting AS, Jewell RC, van der Burg ME, van der Gaast A, de Bruijn P, et al. Clinical pharmacokinetics of doxorubicin in combination with GF120918, a potent inhibitor of MDR1 P-glycoprotein. *Anticancer drugs*. 1999 Sep;10(8):719–28.
70. Benjamin RS, Riggs CE, Bachur NR. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Res*. 1977 May;37(5):1416–20.
71. Toffoli G, Corona G, Cattarossi G, Boiocchi M, Di Gennaro G, Tirelli U, et al. Effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) on pharmacokinetics and pharmacodynamics of doxorubicin in patients with HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2004 Dec;15(12):1805–9.
72. Ryu RJ, Eyal S, Kaplan HG, Akbarzadeh A, Hays K, Puhl K, et al. Pharmacokinetics of doxorubicin in pregnant women. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2014 Apr;73(4):789–97.
73. Dobbs NA, Twelves CJ, Gillies H, James CA, Harper PG, Rubens RD. Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36(6):473–6.
74. Chan KK, Cohen JL, Gross JF, Himmelstein KJ, Bateman JR, Tsu-Lee Y, et al. Prediction of adriamycin disposition in cancer patients using a physiologic, pharmacokinetic model. *Cancer Treat Rep*. 1978 Aug;62(8):1161–71.
75. Jacquet JM, Bressolle F, Galtier M, Bourrier M, Donadio D, Jourdan J, et al. Doxorubicin and doxorubicinol: intra- and inter-individual variations of pharmacokinetic parameters. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1990;27(3):219–25.
76. Stewart DJ, Grewaal D, Green RM, Mikhael N, Goel R, Montpetit VA, et al. Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues. *Anticancer Res*. 1993 Oct;13(6A):1945–52.
77. Palle J, Frost B-M, Peterson C, Gustafsson G, Hellebostad M, Kanerva J, et al. Doxorubicin pharmacokinetics is correlated to the effect of induction therapy in children with acute myeloid leukemia. *Anticancer drugs*. 2006 Apr 1;17(4):385–92.
78. Speyer J, Wasserheit C. Strategies for reduction of anthracycline cardiac toxicity. *Semin Oncol*. 1998 Oct;25(5):525–37.
79. El-Kareh AW, Secomb TW. A mathematical model for comparison of bolus injection, continuous infusion, and liposomal delivery of doxorubicin to tumor cells. *Neoplasia*. 2000 Jun;2(4):325–38.

80. Burton M, Shaw L, Schentag J, Evans W. Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics. fourth edition. Baltimore, Maryland; 2006.
81. Eksborg S. Anthracycline pharmacokinetics. Limited sampling model for plasma level monitoring with special reference to epirubicin (Farmorubicin). *Acta Oncol.* 1990;29(3):339-42.
82. Jiménez Torres V. Bases posológicas en oncología. Instituto de España Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid; 2007 Mar 1;:1-91.
83. Leca FR, Marchiset-Leca D, Galeani A, Noble A, Catalin J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships between pirarubicin exposure and hematotoxicity: clinical application using only one blood sample. *Anticancer drugs.* 1998 Jul;9(6):503-9.
84. Elis A, Lishner M, Walker S, Atias D, Korenberg A, Koren G. Doxorubicin in lymphoma: association between pharmacokinetic variability and clinical response. *Ther Drug Monit.* 2010 Feb 1;32(1):50-2.
85. Brünen S, Vincent PD, Baumann P, Hiemke C, Havemann-Reinecke U. Therapeutic drug monitoring for drugs used in the treatment of substance-related disorders: literature review using a therapeutic drug monitoring appropriateness rating scale. *Ther Drug Monit.* 2011 Oct;33(5):561-72.
86. Samara E, Granneman R. Role of population pharmacokinetics in drug development. A pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Apr;32(4):294-312.
87. Yukawa E. Population-based investigations of drug relative clearance using nonlinear mixed-effect modelling from information generated during the routine clinical care of patients. *J Clin Pharm Ther.* 1999 Apr;24(2):103-13.
88. Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1977 Oct;5(5):445-79.
89. Sheiner LB, Rosenberg B, Melmon KL. Modelling of individual pharmacokinetics for computer-aided drug dosage. *Comput Biomed Res.* 1972 Oct;5(5):411-59.
90. Mould DR, Upton RN. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacol.* 2012 Sep;1(9):e6.
91. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry. population pharmacokinetics. [Internet]. 1999. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/WomensHealthResearch/UCM133184.pdf>. Accessed: 8th November 2015.

92. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analyses. [Internet]. 2007. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003067.pdf. Accessed: 8th November 2015.
93. Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol*. 1991 Dec;32(6):669–70.
94. Ette EI. Population Pharmacokinetics II: Estimation Methods. *Annals of Pharmacotherapy*. 2004 Sep 14;38(11):1907–15.
95. Sheiner LB, Beal SL. Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters. II. Biexponential model and experimental pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981 Oct;9(5):635–51.
96. Dartois C, Brendel K, Comets E, Laffont CM, Laveille C, Tranchand B, et al. Overview of model-building strategies in population PK/PD analyses: 2002–2004 literature survey. *Br J Clin Pharmacol*. 2007 Nov;64(5):603–12.
97. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1993 Dec;21(6):735–50.
98. Sheiner LB. Analysis of pharmacokinetic data using parametric models. II. Point estimates of an individual's parameters. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1985 Oct;13(5):515–40.
99. Johansson ÅM, Ueckert S, Plan EL, Hooker AC, Karlsson MO. Evaluation of bias, precision, robustness and runtime for estimation methods in NONMEM 7. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2014 May 7;41(3):223–38.
100. 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 Feb;19(1):87–112.
101. Beal SL, Sheiner LB, Boeckmann A, Bauer RJ. NONMEM user's guides (1989–2009). Icon Development Solutions, Ellicott City, MD. 2009 Jan.
102. Ludden TM, Beal SL, Sheiner LB. Comparison of the Akaike Information Criterion, the Schwarz criterion and the F test as guides to model selection. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1994 Sep 30;22(5):431–45.
103. Mould DR, Upton RN. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development—Part 2: Introduction to Pharmacokinetic Modeling Methods. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013 Apr;2(4):e38.
104. Hutmacher MM, Kowalski KG. Covariate selection in pharmacometric

- analyses: a review of methods. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Dec 19;79(1):132–47.
105. Ette EI, Howie CA, Kelman AW, Whiting B. Experimental design and efficient parameter estimation in preclinical pharmacokinetic studies. *Pharm Res*. 1995 May;12(5):729–37.
106. Ette EI. Population Pharmacokinetics III: Design, Analysis, and Application of Population Pharmacokinetic Studies. *Annals of Pharmacotherapy*. 2004 Oct 26;38(12):2136–44.
107. Byon W, Smith MK, Chan P, Tortorici MA, Riley S, Dai H, et al. Establishing Best Practices and Guidance in Population Modeling: An Experience With an Internal Population Pharmacokinetic Analysis Guidance. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2013 Jul;2(7):e51.
108. Johansson ÅM, Karlsson MO. Comparison of methods for handling missing covariate data. *AAPS J*. 2013 Sep 30;15(4):1232–41.
109. Johansson. Methodology for Handling Missing Data in Nonlinear Mixed Effects Modelling [dissertation]. Uppsala, Sweden: Acta Universitatis Upsaliensis Upsala; 2014..
110. Maitre PO, Bühner M, Thomson D, Stanski DR. A three-step approach combining Bayesian regression and NONMEM population analysis: application to midazolam. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1991 Aug;19(4):377–84.
111. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1992 Oct;20(5):511–28.
112. Jonsson E, Karlsson MO. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*. 1999 Jan;58(1):51–64.
113. Jonsson EN, Karlsson MO. Automated covariate model building within NONMEM. *Pharm Res*. 1998 Aug 31;15(9):1463–8.
114. Khandelwal A, Harling K, Jonsson EN, Hooker AC, Karlsson MO. A fast method for testing covariates in population PK/PD Models. *AAPS J*. 2011 Sep;13(3):464–72.
115. Ribbing J, Nyberg J, Caster O, Jonsson EN. The lasso--a novel method for predictive covariate model building in nonlinear mixed effects models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2007 Jul 31;34(4):485–517.
116. Yun H-Y, Niebecker R, Svensson EM, Karlsson MO. Evaluation of FREM and FFEM including use of model linearization. In: Annual meeting of the Population Approach Group in Europe 22 (2013) Abstr 2900. [Internet]. 2013. Available from: www.page-meeting.org/?abstract=2900.

Accesed: 7th october 2015.

117. Karlsson MO. A full model approach based on the covariance matrix of parameters and covariates. In: Annual meeting of the Population Approach Group in Europe 21 (2012) Abstr 2455. [Internet]. Available from: www.page-meeting.org/?abstract=2455. Accesed: 7th october 2015.
118. Kowalski KG, Hutmacher MM. Efficient screening of covariates in population models using Wald's approximation to the likelihood ratio test. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001 Jun;28(3):253-75.
119. Beal SL. Ways to fit a PK model with some data below the quantification limit. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001 Oct;28(5):481-504.
120. Box GEP. Robustness in the Strategy of Scientific Model Building. Wisconsin-Madison, USA: Mathematics Research Center, Center WU-MMR; 1979. Technical Summary Report: 1954.
121. Brendel K, Dartois C, Comets E, Lemenuel-Diot A, Laveille C, Tranchand B, et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(3):221-34.
122. Sheiner LB, Beal SL. Some suggestions for measuring predictive performance. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1981 Aug;9(4):503-12.
123. Trocóniz I, Cendrós JM, Colom H. Farmacocinética poblacional. En: Doménech Berrozpe J, Marínez Lanao J, Peraire Guitart C, Editores. Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II: Vías de administración de fármacos: aspectos biofarmacéuticos, Farmacocinética no lineal y clínica. Madrid: editorial síntesis, SA, 2013. p 319-366.
124. Graaf PH. Introduction to population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacol*. 2014 Dec 22;3:e153.
125. Vozech S, Maitre PO, Stanski DR. Evaluation of population (NONMEM) pharmacokinetic parameter estimates. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1990 Apr;18(2):161-73.
126. Mentré F, Escolano S. Prediction discrepancies for the evaluation of nonlinear mixed-effects models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2006 Jun;33(3):345-67.
127. Brendel K, Comets E, Laffont C, Laveille C, Mentré F. Metrics for external model evaluation with an application to the population pharmacokinetics of gliclazide. *Pharm Res*. 2006 Sep;23(9):2036-49.
128. Brendel K, Comets E, Laffont C, Mentré F. Evaluation of different tests

- based on observations for external model evaluation of population analyses. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2010 Feb;37(1):49–65.
129. Comets E, Brendel K, Mentré F. Computing normalised prediction distribution errors to evaluate nonlinear mixed-effect models: The npde add-on package for R. *Comput Methods Programs Biomed*. 2008 May;90(2):154–66.
130. Bonate PL. *Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation*. 1st ed. New York, Springer Science & Business Media; 2011.
131. Simon N. *Analyse pharmacocinétique et pharmacodynamique par approche de population*. Solal Editeurs; 2006.
132. Roecker EB. *Prediction Error and Its Estimation for Subset-Selected Models*. Taylor & Francis, Ltd. on behalf of American Statistical Association and American Society for Quality. Quality ASF, editor. *Technometrics*; [Internet]. 1991. Available from: <http://www.jstor.org/stable/1269417>. Accessed: 10th January 2016.
133. Efron B. *Bootstrap Methods*. Stanford, California, USA: Stanford University, . Division of Biostatistics, Service USPH. 1977.
134. Henderson AR. The bootstrap: A technique for data-driven statistics. Using computer-intensive analyses to explore experimental data. *Clinica Chimica Acta*. 2005 Sep;359(1-2):1–26.
135. Efron B, Tibshirani RJ. *An Introduction to the Bootstrap*. Chapman and Hall/CRC; 1994.
136. Ette EI. Stability and performance of a population pharmacokinetic model. *J Clin Pharmacol*. 1997 Jun;37(6):486–95.
137. Hunt CA, Givens GH, Guzy S. Bootstrapping for pharmacokinetic models: visualization of predictive and parameter uncertainty. *Pharm Res*. 1998 May;15(5):690–7.
138. Efron, B. Estimating the Error Rate of a Prediction Rule: Improvement on Cross- validation. *J Am Stat Assoc*. 1983; 78:316-331.
139. Yano Y, Beal SL, Sheiner LB. Evaluating pharmacokinetic/pharmacodynamic models using the posterior predictive check. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001 Apr;28(2):171–92.
140. Girard P, Blaschke TF, Kastrissios H, Sheiner LB. A Markov mixed effect regression model for drug compliance. *Stat Med*. 1998 Oct 30;17(20):2313–33.
141. Karlsson MO, Savic RM. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007 Jul;82(1):17–20.

142. Karlsson MO, Holford N. A tutorial on visual predictive checks. In: Annual meeting of the Population Approach Group in Europe 17 (2008) Abstr 1434. [Internet]. 2008. Available from: www.page-meeting.org/?abstract=1434. Accessed: 9th November 2015.
143. Holford N. The Visual Predictive Check - Superiority to Standard Diagnostic (Rorschach) Plots. In: Annual meeting of the Population Approach Group in Europe 14 (2005) Abstr 738. [Internet]. 2005. Available from: www.page-meeting.org/?abstract=738. Accessed: 15th December 2015.
144. Lavielle M, Bleakley K. Automatic data binning for improved visual diagnosis of pharmacometric models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2011 Dec;38(6):861–71.
145. Post TM, Freijer JI, Ploeger BA, Danhof M. Extensions to the Visual Predictive Check to facilitate model performance evaluation. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008 Jan 16;35(2):185–202.
146. Bergstrand M, Hooker AC, Wallin JE, Karlsson MO. Prediction-Corrected Visual Predictive Checks for Diagnosing Nonlinear Mixed-Effects Models. *AAPS J*. 2011 Feb 8;13(2):143–51.
147. Wang DD, Zhang S. Standardized Visual Predictive Check Versus Visual Predictive Check for Model Evaluation. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2013 Mar 7;52(1):39–54.
148. Baverel PG, Savic RM, Wilkins JJ, Karlsson MO. Evaluation of the nonparametric estimation method in nonmem VI: application to real data. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2009 Jul 2;36(4):297–315.
149. Aarons L. Software for population pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*. 1999 Apr;36(4):255–64.
150. Charles BG, Duffull SB. Pharmacokinetic software for the health sciences: choosing the right package for teaching purposes. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(6):395–403.
151. Kiang TKL, Sherwin CMT, Spigarelli MG, Ensom MHH. Fundamentals of population pharmacokinetic modelling: modelling and software. *Clin Pharmacokinet*. 2012 Aug 1;51(8):515–25.
152. Bauer RJ, Guzy S, Ng C. A survey of population analysis methods and software for complex pharmacokinetic and pharmacodynamic models with examples. *AAPS J*. 2007;9(1):E60–83.
153. Wilkins JJ. NONMEMory: A run management tool for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*. 2005 Jun;78(3):259–67.
154. Keizer RJ, van Benten M, Beijnen JH, Schellens JHM, Huitema ADR. Pirana and PCluster: A modeling environment and cluster infrastructure

- for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* Elsevier Ireland Ltd; 2011 Jan 1;101(1):72–9.
155. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson N. PsN-Toolkit—A collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* 2005 Sep;79(3):241–57.
156. Keizer RJ, Karlsson MO, Hooker A. Modeling and Simulation Workbench for NONMEM: Tutorial on Pirana, PsN, and Xpose. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacol.* 2013;2:e50.
157. Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN. Perl-speaks-NONMEM (PsN)—a Perl module for NONMEM related programming. *Comput Methods Programs Biomed.* 2004 Aug;75(2):85–94.
158. Lavielle M, Mentré F. MONOLIX Version 4.3.2 User Guide [Internet]. 2014. Available from: <http://www.monolix.org>. Accessed: 5th November 2015.
159. Neely MN, van Guilder MG, Yamada WM, Schumitzky A, Jelliffe RW. Accurate Detection of Outliers and Subpopulations With Pmetrics, a Nonparametric and Parametric Pharmacometric Modeling and Simulation Package for R. *Ther Drug Monit.* 2012 Aug;34(4):467–76.
160. Urien S. RfN, R for Nonmem: A graphical interface for Nonmem outputs. 2008. In: *Annual meeting of the Population Approach Group in Europe 17 (2008) Abstr 1424* [Internet]. 2008. Available from: www.page-meeting.org/?abstract=1424. Accessed: 16th December 2015.
161. European Medicines Agency (EMA). Guideline on bioanalytical method validation. [Internet]. 2011. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Accessed: 10th June 2015.
162. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. [Internet]. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. Accessed: 10th June 2015.
163. Pérez-Blanco JS, del Mar Fernández de Gatta M, Hernández-Rivas JM, Sánchez MJG, Marinero MLS, López FG. Validation and clinical evaluation of a UHPLC method with fluorescence detector for plasma quantification of doxorubicin and doxorubicinol in haematological patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014 Apr 1;955-956:93–7.
164. Janmahasatian S, Duffull SB, Ash S, Ward LC, Byrne NM, Green B. Quantification of lean bodyweight. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(10):1051–65.

165. de Jonge ME, Huitema ADR, Schellens JHM, Rodenhuis S, Beijnen JH. Individualised cancer chemotherapy: strategies and performance of prospective studies on therapeutic drug monitoring with dose adaptation: a review. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(2):147–73.
166. Cielecka-Piontek J, Zalewski P, Jelińska A, Garbacki P. UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography. *Chromatographia.* 2013;76:1429-1437.
167. Baumgarten S, Gaba RC, van Breemen RB. Confirmation of drug delivery after liver chemoembolization: direct tissue doxorubicin measurement by UHPLC-MS-MS. *Biomed Chromatogr.* 2012 Mar 27;26(12):1529–33.
168. Badea I, Lazăr L, Moja D, Nicolescu D, Tudose A. A HPLC method for the simultaneous determination of seven anthracyclines. *J Pharm Biomed Anal.* 2005 Sep 1;39(1-2):305–9.
169. Zhao P, Dash AK. A simple HPLC method using a microbore column for the analysis of doxorubicin. *J Pharm Biomed Anal.* 1999 Jul;20(3):543–8.
170. Álvarez-Cedrón L, Sayalero ML, Lanao JM. High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Jan 14;721:271–8.
171. Alhareth K, Vauthier C, Gueutin C, Ponchel G, Moussa F. HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Mar 1;887-888:128–32.
172. Daeihamed M, Haeri A, Dadashzadeh S. A Simple and Sensitive HPLC Method for Fluorescence Quantitation of Doxorubicin in Micro-volume Plasma: Applications to Pharmacokinetic Studies in Rats. *Iran J Pharm Res.* 2015;14(Suppl):33–42.
173. Mahnik SN, Rizovski B, Fuerhacker M, Mader RM. Development of an analytical method for the determination of anthracyclines in hospital effluents. *Chemosphere.* 2006 Nov;65(8):1419–25.
174. Andersen A, Warren DJ, Slørdal L. A sensitive and simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxorubicin and its metabolites in plasma. *Ther Drug Monit.* 1993 Oct 1;15(5):455–61.
175. Fogli S, Danesi R, Innocenti F, Di Paolo A, Bocci G, Barbara C, et al. An improved HPLC method for therapeutic drug monitoring of daunorubicin, idarubicin, doxorubicin, epirubicin, and their 13-dihydro metabolites in human plasma. *Ther Drug Monit.* 1999 Jun;21(3):367–75.

176. Schott B, Robert J. Comparative activity of anthracycline 13-dihydrometabolites against rat glioblastoma cells in culture. *Biochem Pharmacol.* 1989 Nov 15;38(22):4069–74.
177. Wang GX, Wang YX, Zhou XB, Korth M. Effects of doxorubicinol on excitation--contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jul 6;423(2-3):99–107.
178. Del Tacca M, Danesi R, Ducci M, Bernardini C, Romanini A. Might adriamycinol contribute to adriamycin-induced cardiotoxicity? *Pharmacol Res Commun.* 1985 Nov;17(11):1073–84.
179. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA, Guchelaar H-J. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev.* 2004 Apr;30(2):181–91.
180. Mita MM, Natale RB, Wolin EM, Laabs B, Dinh H, Wieland S, et al. Pharmacokinetic study of aldorubicin in patients with solid tumors. *Invest New Drugs.* 2015 Apr;33(2):341-8.
181. Senkus E, Jassem J. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2011 Jun 1;37(4):300–11.
182. Frost B-M, Eksborg S, Björk O, Abrahamsson J, Behrendtz M, Castor A, et al. Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study. *Med Pediatr Oncol.* 2002 May;38(5):329–37.
183. Sparreboom A, Wolff AC, Mathijssen RHJ, Chatelut E, Rowinsky EK, Verweij J, et al. Evaluation of Alternate Size Descriptors for Dose Calculation of Anticancer Drugs in the Obese. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 20;25(30):4707–13.
184. Gao B, Klumpen H-J, Gurney H. Dose calculation of anticancer drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Oct;4(10):1307–19.
185. Rosner GL, Hargis JB, Hollis DR, Budman DR, Weiss RB, Henderson IC, et al. Relationship between toxicity and obesity in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer: results from cancer and leukemia group B study 8541. *J Clin Oncol.* 1996 Nov;14(11):3000–8.
186. McMahon G, O'Connor R. Therapeutic drug monitoring in oncology: does it have a future? *Bioanalysis.* 2009 Jun;1(3):507–11.
187. Felici A, Verweij J, Sparreboom A. Dosing strategies for anticancer drugs: the good, the bad and body-surface area. *Eur J Cancer.* 2002 Sep;38(13):1677–84.
188. Dunleavy K, Pittaluga S, Shovlin M, Steinberg SM, Cole D, Grant C, et al. Low-Intensity Therapy in Adults with Burkitt's Lymphoma. *N Engl J Med.* 2013 Nov 14;369(20):1915–25.

189. Rodvold KA, Rushing DA, Tewksbury DA. Doxorubicin clearance in the obese. *J Clin Oncol*. 1988 Aug;6(8):1321-7.
190. Savic RM, Karlsson MO. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J*. 2009 Sep;11(3):558-69.
191. Ackland SP, Ratain MJ, Vogelzang NJ, Choi KE, Ruane M, Sinkule JA. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of long-term continuous-infusion doxorubicin. *Clin Pharmacol Ther*. 1989 Apr;45(4):340-7.
192. Shivva V, Korell J, Tucker IG, Duffull SB. An Approach for Identifiability of Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Models. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacol*. 2013 Jun;2(6):e49.
193. Gisleskog PO, Karlsson MO, Beal SL. Use of prior information to stabilize a population data analysis. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2002 Dec;29(5-6):473-505.
194. Shivva V, Korell J, Tucker IG, Duffull SB. Parameterisation affects identifiability of population models. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2013 Dec 31;41(1):81-6.
195. Mross K, Maessen P, van der Vijgh WJ, Gall H, Boven E, Pinedo HM. Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol*. 1988 Mar;6(3):517-26.
196. Speth PA, Linssen PC, Boezeman JB, Wessels HM, Haanen C. Cellular and plasma adriamycin concentrations in long-term infusion therapy of leukemia patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20(4):305-10.
197. Eksborg S, Strandler HS, Edsmyr F, Näslund I, Tahvanainen P. Pharmacokinetic study of i.v. infusions of adriamycin. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985;28(2):205-12.
198. Gil P, Favre R, Durand A, Iliadis A, Cano JP, Carcassonne Y. Time dependency of adriamycin and adriamycinol kinetics. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1983;10(2):120-4.
199. Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*. 1987 Oct 22;317(17):1098.

ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva
ABC _{DOX}	Área Bajo la Curva de Doxorubicina
ABC _{DOXol}	Área Bajo la Curva de Doxorubicinol
ABS	Albúmina Sérica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGE	Edad
AIC	Criterio de Akaike
ALT	Alanino Amino Transferasa
AST	Aspartato Amino Transferasa
BIC	Criterio de Información Bayesiana o de Schwarz
BLQ	Valores por debajo del límite de cuantificación
BLR	Bilirrubina
BMI	Índice de Masa Corporal
BSA	Superficie Corporal
BVPC	Exploración Predictiva Visual <i>Bootstrap</i>
CL	Aclaramiento Plasmático
CL _{CR}	Aclaramiento de Creatinina
CL _{DOX}	Aclaramiento de Doxorubicina
CL _{DOXol}	Aclaramiento de Doxorubicinol
CLM	Aclaramiento de Metabolito (Doxorubicinol)
C _{max}	Concentración Máxima
C _{max,DOX}	Concentración Máxima de Doxorubicina
C _{max,DOXol}	Concentración Máxima de Doxorubicinol
COV	Covariable
CREA	Creatinina Sérica
CRO	Organizaciones de Investigación por Contrato
CTS	Simulación de Ensayos Clínicos
CV	Coefficiente de Variación
CWRES	Residuales Ponderados Condicionales
DAU	Daunorubicina
DOX	Doxorubicina
DOXol	Doxorubicinol
EBE	Estimaciones Empíricas Individuales Bayesianas
ECG	Electrocardiograma
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EC ₅₀	Concentración que origina la mitad del efecto máximo
EM	Expectación-Maximización
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
E _{MAX}	Efecto Máximo
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEVI	Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo
FFME	Método de Estimación Completo de Efectos Fijos
FM	Fracción de Conversión a Metabolito (Doxorubicinol)
FO	Método de Primer Orden

FOCE	Método de Primer Orden con Estimación Condicional
FOCEI	Método de Primer Orden con Estimación Condicional con Interacción
FRME	Método de Estimación Completo de Efectos Aleatorios
GAM	Modelo Aditivo Generalizados
GCSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
GOF	Gráficos de Bondad de Ajuste
HB	Hemoglobina
HGT	Altura
HOSP	Hospital
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC	Intervalo de Confianza
IIV	Variabilidad Inter-Individual
IMP	<i>Monte Carlo Importance Sampling</i>
IMPMAP	<i>Importance Sampling Assisted by Mode A Posteriori</i>
IOV	Variabilidad Inter-Ocasión
IPI	Índice Pronóstico Internacional
IPRED	Predicciones Individuales
ITS	<i>Iterative Two Stage</i>
iv	Vía Intravenosa
IWRES	Residuales Individuales Ponderados
LADME	Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo, Eliminación
LBW	Peso Libre de Grasa (equivale a LBWJ)
LBWJ	Peso Libre de Grasa (ecuación de Janmahasatian) (164)
LEU	Recuento de Leucocitos
LIN	Recuento de Linfocitos
LLOQ	Límite de Cuantificación
LNH	Linfoma No Hodgkin
LRT	Prueba de Razón de Verosimilitud
MAPE	Media del Error de Predicción Absoluto
MAR	Datos Perdidos Aleatoriamente
MCAR	Datos Perdidos Completamente Aleatorios
MD	Datos Perdidos
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MNAR	Datos Perdidos No Aleatoriamente
MPE	Media del Error de Predicción
MS/MS	Masas/Masas
NEU	Recuento de Neutrófilos
NPC	Exploración Predictiva Numérica
NPDE	Distribución de los Errores de Predicción Normalizados
OFV	Valor de la Función Objetivo
P-gp	P-Glicoproteína
PBPK	Modelos Farmacocinéticos con Base Fisiológica
pcVPC	Exploración Predictiva Visual Corregida por la Predicción
PD	Farmacodinamia

Abreviaturas

pd	Discrepancias de Predicción
PK	Farmacocinética
PK/PD	Farmacocinética/Farmacodinamia
PLA	Recuento de Plaquetas
PRED	Predicciones Poblacionales
PsN	<i>Pearl-Speaks For NONMEM</i>
Q_n	Aclaramiento Intercompartimental del Compartimento n
QVPC	Exploración Predictiva Visual Cuantificada
r	Coefficiente de Correlación Lineal de Pearson
RMSE	Media de la Raíz Cuadrada del Error
RSE	Error Relativo de Estimación
SAEM	<i>Stochastic Approximation Expectation-Maximization</i>
SCM	Modelo De Covariables en Dos Etapas
SD	Desviación Estándar
SE	Error Estándar
SEX	Sexo
SVPC	Exploración Predictiva Visual Estandarizada
$t_{1/2}$	Semivida de Eliminación
TAD	Tiempo Tras la Administración
TDM	Monitorización de Fármacos
UHFLC, UPLC, UFLC	<i>Ultra Fast/High Performance Liquid Chromatography</i>
V_c	Volumen de distribución en el compartimento Central
V_d	Volumen aparente de Distribución
V_n	Volumen de distribución del compartimento N
VPC	Exploración Predictiva Visual
V_{ss}	Volumen aparente de distribución en el Estado de Equilibrio
WGT	Peso
WRES	Residuales Ponderados

ANEXOS

El contenido de este apartado ha sido eliminado por conflictos de intereses.