



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

**ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL DE LA
NEVIRAPINA EN LA RATA Y POTENCIALES
INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS CON
FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS**

Tesis Doctoral presentada por
IRIS USACH PÉREZ

Director
JOSÉ ESTEBAN PERIS RIBERA

Valencia, octubre 2015

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

D. **José Esteban Peris Ribera**, Doctor en Farmacia y Profesor Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la Lda. **Iris Usach Pérez**, titulado **“Absorción gastrointestinal de la nevirapina en la rata y potenciales interacciones farmacocinéticas con fármacos antidepresivos”**, ha sido realizado en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Valencia bajo su dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autoriza la presentación de la Tesis para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Lo que suscribe en Valencia en octubre de dos mil quince.

Fdo.: D. José Esteban Peris Ribera



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

La autora de la presente tesis doctoral, Iris Usach Pérez, ha sido beneficiaria de una ayuda predoctoral de investigación del Subprograma “Atracció de Talent” de VLC-Campus. Resolución del 28 de diciembre de 2011 del Vicerrectorado de Investigación y Política Científica de la Universitat de València.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar estas líneas a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han ayudado en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, gracias a mi director José Esteban Peris Ribera por su dedicación y eficaz dirección de este trabajo. Siempre le estaré agradecida por haber apostado por mí desde el primer momento y haberme dado la oportunidad de aprender de él.

Gracias a todos los miembros del departamento de “Farmacia y tecnología farmacéutica” por su compañerismo, amistad y por hacer del laboratorio un lugar de trabajo más agradable, pero sobretodo gracias a mis compañeras de laboratorio, Virginia y Patricia. A ambas gracias por su compañía y por darme ánimo en los momentos más difíciles, me llevo unas amigas para toda la vida de esta experiencia.

Especial agradecimiento le debo a mi familia, especialmente a mis padres ya que sin su esfuerzo, sacrificio y apoyo nunca habría podido llegar hasta aquí. Gracias por respetar mis decisiones y confiar en mí.

Por último, quisiera dedicar estas palabras a Carlos, por su paciencia, comprensión y por haber estado siempre a mi lado apoyándome tanto en los momentos más críticos como en los momentos de felicidad.

ABREVIATURAS

3TC:	Lamivudina
2-,3-,8- y 12-OH-NVP:	2-, 3-, 8- y 12-hidroxinevirapina
ABC:	Abacavir
Ac-VIH:	Anticuerpos específicos del VIH
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADN-c:	ADN copia
ARN:	Ácido ribonucleico
ARN-m:	ARN mensajero
ATC:	Antidepresivo tricíclico
AUC:	Área bajo la curva
AUC_{inf}:	Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta infinito
AUC_{last}:	Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo
BCS:	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
β-NADP⁺:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Cl:	Aclaramiento plasmático total
C_{máx}:	Concentración plasmática máxima
CMC:	Carboximetilcelulosa
C_{mín}:	Concentración plasmática mínima
CYP450:	Citocromo P450
DMSO:	Dimetilsulfóxido
D.S.:	Desviación estándar

EDTA:	Ácido etildiaminotetraacético
E.E.:	Error estándar
EFV:	Efavirenz
EIA:	Enzimoimmunoensayo
FDA:	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos estadounidense)
FLUOX:	Fluoxetina
FLUVOX:	Fluvoxamina
Fmoc-Cl:	9H-fluoren-9-ylmethyl chloroformate
FTC:	Emtricitabina
G6P:	Glucosa-6-Fosfato
G6PDH:	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GeSIDA:	Grupo de estudio del SIDA de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC₅₀:	Concentración del inhibidor requerida para inhibir el metabolismo del sustrato un 50 %
i.c.:	Intracolónica
i.d.:	Intraduodenal
i.d.w.:	Intraduodenal, duodeno lavado
i.d.w.n.:	Intraduodenal, duodeno lavado, colédoco no ligado
IF:	Inhibidores de la fusión/entrada
i.i.:	Intraileal
INI:	Inhibidores de la integrasa
IP:	Inhibidores de la proteasa

ISRS:	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
ITIAN:	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos/nucleótidos
ITINAN:	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos
i.v.:	Intravenosa
K_i:	Constante de inhibición
K_m:	Constante de Michaelis-Menten
LTR:	Repetición terminal larga
MAT:	Tiempo medio de absorción
MRT_{inf}:	Tiempo medio de resistencia o de permanencia del fármaco en el organismo utilizando áreas desde tiempo cero hasta infinito
MRT_{last}:	Tiempo medio de resistencia o de permanencia del fármaco en el organismo utilizando áreas desde tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo
NT:	Nortriptilina
NVP:	Nevirapina
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ONUSIDA:	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
PG:	Propilenglicol
p.o.:	Oral
RPV:	Rilpivirina
s.c.:	Subcutánea
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SRT:	Sertralina

$t_{1/2}$:	Semivida
TARGA:	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
TDF:	Tenofovir
TDI:	Inhibición tiempo-dependiente
$t_{m\acute{a}x}$:	Tiempo hasta alcanzar la concentración plasmática máxima
UE:	Unión Europea
Vd:	Volumen de distribución
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIS:	Virus de la Inmunodeficiencia en Simios
VIS cpz:	VIS de chimpancés
VIS gor:	VIS descubierto en gorilas
VIS smm:	VIS del Mangabeye gris
$V_{m\acute{a}x}$:	Velocidad máxima
Vss:	Volumen de distribución en estado estacionario
WB:	Western Blot

ABBREVIATIONS

3TC:	Lamivudine
2-,3-,8- y 12-OH-NVP:	2-, 3-, 8- y 12-hidroxinevirapine
ABC:	Abacavir
Ac-VIH:	Specific antibodies of HIV
ADN:	Deoxyribonucleic acid (DNA)
ADN-c:	Complementary DNA
ARN:	Ribonucleic acid (RNA)
ARN-m:	Messenger RNA
ATC:	Tricyclic antidepressant
AUC:	Area under the curve
AUC_{inf}:	Area under the concentration-time curve from the time of dosing to infinity
AUC_{last}:	Area under the plasma concentration-time curve from the time of dosing to the last measurable concentration
BCS:	Biopharmaceutics Classification System
β-NADP⁺:	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
Cl:	Total plasma clearance
C_{máx}:	Maximum plasma concentration
CMC:	Carboxymethylcellulose
C_{mín}:	Minimum plasma concentration
CYP450:	Cytochrome P-450
DMSO:	Dimethylsulfoxide
D.S.:	Standard deviation (S.D.)

EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
E.E.:	Standard error (S.E.)
EFV:	Efavirenz
EIA:	Enzyme immunoassay
FDA:	Food and Drug Administration
FLUOX:	Fluoxetine
FLUVOX:	Fluvoxamine
Fmoc-Cl:	9H-fluoren-9-ylmethyl chloroformate
FTC:	Emtricitabine
G6P:	Glucose-6-phosphate
G6PDH:	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GeSIDA:	AIDS Study Group of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology
HDL:	High density lipoprotein
HPLC:	High performance liquid chromatographic assay
IC₅₀:	Concentration of inhibitor required to achieve half maximal inhibition of substrate metabolism
i.c.:	Intracolonic
i.d.:	Intraduodenal
i.d.w.:	Intraduodenal, washed duodenum
i.d.w.n.:	Intraduodenal, washed duodenum, non-ligated bile duct
IF:	Fusion inhibitors
i.i.:	Intraileal
INI:	Integrase inhibitors
IP:	Protease Inhibitors

ISRS:	Selective serotonin reuptake inhibitors
ITIAN:	Nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors
ITINAN:	Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor
i.v.:	Intravenous
K_i:	Inhibition constant
K_m:	Michaelis-Menten constant
LTR:	Long Terminal Repeat
MAT:	Mean absorption time
MRT_{inf}:	Mean residence time estimated using areas extrapolated to infinity
MRT_{last}:	Mean residence time estimated using areas from the time of dosing to the last measurable concentration
NT:	Nortriptyline
NVP:	Nevirapine
OMS:	World Health Organization (WHO)
ONUSIDA:	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)
PG:	Propylene glycol
p.o.:	Oral
RPV:	Rilpivirine
s.c.:	Subcutaneous
SIDA:	Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)
SRT:	Sertraline
t_{1/2}:	Half-life
TARGA:	Highly active antiretroviral therapy
TDF:	Tenofovir
TDI:	Time-dependent inhibition

$t_{\text{m\acute{a}x}}$:	Time to $C_{\text{m\acute{a}x}}$
UE:	European Union
Vd:	Volume of distribution
VIH:	Human immunodeficiency virus (HIV)
VIS:	Simian immunodeficiency virus (SIV)
VIS cpz:	SIV of Chimpanzee
VIS gor:	SIV of Western gorilla
VIS smm:	SIV of Sooty mangabey
$V_{\text{m\acute{a}x}}$:	Maximum rate
Vss:	Steady state volume of distribution
WB:	Western Blot

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Orígenes de virus humanos causantes del SIDA.	11
Figura 2. Evolución de la infección por VIH.	13
Figura 3. Estructura del virus VIH.	17
Figura 4. Fases del ciclo replicativo del virus VIH-1.	18
Figura 5. Estructura química de la nevirapina.	28
Figura 6. Ruta metabólica de la nevirapina.	33
Figura 7. Estructura química de la nortriptilina.	35
Figura 8. Ruta metabólica de la nortriptilina.	38
Figura 9. Estructura química de la sertralina.	40
Figura 10. Estructura química de la fluoxetina.	42
Figura 11. Estructura química de la fluvoxamina.	44
Figura 12. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 11 y 12.	59
Figura 13. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 13 y 14.	60
Figura 14. Tiempos de muestreo sanguíneo en el grupo 15.	60
Figura 15. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 16 y 17.	61
Figura 16. Cromatograma obtenido a partir de una muestra plasmática conteniendo NVP (10 µg/ml, pico a 3,19 min).	75
Figura 17. Cromatogramas correspondientes a un blanco de plasma y plasma adicionado con NT (50 ng/ml, pico a 10,82 min).	76
Figura 18. Cromatogramas representativos del metabolismo de NVP (5 µg/ml) en microsomas hepáticos de rata. A: Patrón de NVP (sin metabolismo); B: NVP tras 30 minutos a 37 °C; C: NVP y NT (1 µg/ml) tras 30 minutos a 37 °C.	77

Figura 19. Cromatogramas representativos del metabolismo de NVP (5 µg/ml) en microsomas hepáticos humanos. A: Patrón de NVP (sin metabolismo); B: NVP tras 30 minutos a 37 °C; C: NVP y NT (10 µg/ml) tras 30 minutos a 37 °C.	78
Figura 20. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa, oral y subcutánea (normalizados para una dosis de 8 mg).	79
Figura 21. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa en ausencia (grupo 1) o en presencia (grupo 4) de anestesia.	81
Figura 22. Concentraciones plasmáticas de NVP (media ± D.E.) obtenidas tras su administración oral e intrainestinal.	83
Figura 23. Porcentaje remanente de NVP (media ± D.E.) en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal a las 4 horas de la administración.	84
Figura 24. Concentraciones plasmáticas de NVP (media ± D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal en ratas anestesiadas con el colédoco ligado (grupos 6 y 9) o no ligado (grupo 10) y con el duodeno lavado antes de la administración (grupos 9 y 10) o no lavado (grupo 6).	86
Figura 25. Porcentaje remanente (media ± D.E.) de NVP en el duodeno de los animales (grupos 6, 9 y 10) a las 4 horas de la administración.	87
Figura 26. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración oral con o sin NT.	89
Figura 27. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intraduodenal con o sin NT.	92
Figura 28. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa con o sin NT.	94
Figura 29. Niveles plasmáticos medios de NT obtenidos tras su administración intraduodenal con o sin NVP.	97

Figura 30. Niveles plasmáticos medios de NT obtenidos tras su administración intravenosa con o sin NVP.	99
Figura 31. Representación de la cinética de Michaelis-Menten correspondiente a la desaparición de NVP y a la formación de sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata.	101
Figura 32. Inhibición concentración-dependiente del metabolismo de NVP en microsomas hepáticos de rata en función de la concentración del inhibidor.	103
Figura 33. Inhibición concentración-dependiente de la formación de los metabolitos 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) y 12-OH-NVP (C), en función de la concentración de los distintos inhibidores, en microsomas hepáticos de rata.	106
Figura 34. Representación de las cinéticas de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) correspondientes a la desaparición de NVP en microsomas hepáticos de rata.	107
Figura 35. Representación de la cinética de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk correspondiente a la formación de 2-OH-NVP (A, B), 3-OH-NVP (C, D) y 12-OH-NVP (E, F) en microsomas hepáticos de rata.	109
Figura 36. Representación de las pendientes obtenidas utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk en función de la concentración de NT. A: valores correspondientes a la desaparición de NVP. B, C y D: valores correspondientes a la formación de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP, respectivamente.	112
Figura 37. Representación gráfica del porcentaje del control (sin NT) de los metabolitos de NVP obtenidos en presencia de NT, con y sin sistema enzimático generador de NADPH durante la preincubación.	113

Figura 38. Representación gráfica de la inhibición de la formación de los metabolitos 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) y 12-OH-NVP (C), en presencia y ausencia de sistema enzimático generador de NADPH durante la preincubación, en función de la concentración de NT. 115

Figura 39. Representación gráfica de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos humanos. 117

LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1. Origins of human AIDS viruses.	11
Figure 2. Evolution of HIV infection.	13
Figure 3. Structure of HIV.	17
Figure 4. HIV replication cycle	18
Figure 5. Chemical structure of nevirapine.	28
Figure 6. Metabolic routes of nevirapine.	33
Figure 7. Chemical structure of nortriptyline.	35
Figure 8. Metabolic routes of nortriptyline.	38
Figure 9. Chemical structure of sertraline.	40
Figure 10. Chemical structure of fluoxetine.	42
Figure 11. Chemical structure of fluvoxamine.	44
Figure 12. Sampling times in groups 11 and 12.	59
Figure 13. Sampling times in groups 13 and 14.	60
Figure 14. Sampling times in group 15.	60
Figure 15. Sampling times in groups 16 and 17.	61
Figure 16. Chromatogram obtained from a plasma sample containing NVP (10 µg/ml, peak at 3.19 min).	75
Figure 17. Chromatograms corresponding to blank plasma and plasma spiked with NT (50 ng/ml, peak at 10.82 min).	76
Figure 18. Representative chromatograms of NVP metabolism in rat liver microsomes (NVP 5 µg/ml). A: Standard of NVP (no metabolism); B: NVP after 30 minutes at 37 °C; C: NVP and NT (1 µg/ml) after 30 minutes at 37 °C.	77

Figure 19. Representative chromatograms of NVP metabolism in human liver microsomes (NVP 5 µg/ml). A: Standard of NVP (no metabolism); B: NVP after 30 minutes at 37 °C; C: NVP and NT (10 µg/ml) after 30 minutes at 37 °C.	78
Figure 20. Plasma NVP concentrations following intravenous, oral and subcutaneous administration (normalized for an 8-mg dose).	79
Figure 21. Plasma NVP concentrations following intravenous administration in absence (group 1) or presence (group 4) of anesthesia.	81
Figure 22. Plasma NVP concentrations (mean ± S.D.) following intrainstestinal and oral administration.	83
Figure 23. Percentage (mean ± S.D.) of NVP administered dose remaining in different segments of the gastrointestinal tract of rats after 4 h of drug administration.	84
Figure 24. Plasma NVP concentrations (mean ± S.D.) after intraduodenal administration in anesthetized rats with ligated (groups 6 and 9) and non-ligated (group 10) bile duct. The duodenum of rats (groups 9 and 10) was washed with serum prior to drug administration.	86
Figure 25. Percentage (mean ± S.D.) of NVP administered dose remaining in the duodenum of rats (groups 6, 9 and 10) after 4 h of drug administration.	87
Figure 26. NVP plasma concentrations following oral administration with and without NT co-administration.	89
Figure 27. NVP plasma concentrations following intradoudenal administration with and without NT co-administration.	92
Figure 28. NVP plasma concentrations following intravenous administration with and without NT co-administration.	94
Figure 29. NT plasma concentrations following intradoudenal administration with and without NVP co-administration.	97

Figure 30. NT plasma concentrations following intravenous administration with and without NVP co-administration.	99
Figure 31. Michaelis-Menten plots corresponding to the disappearance of NVP and the formation of its metabolites in rat liver microsomes.	101
Figure 32. Concentration-dependent inhibition of NVP metabolism in rat liver microsomes by different inhibitors.	103
Figure 33. Concentration-dependent inhibition of 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) and 12-OH-NVP (C) formation in rat liver microsomes by different inhibitors.	106
Figure 34. Michaelis-Menten (A) and Lineweaver-Burk (B) plots corresponding to the disappearance of NVP in rat liver microsomes.	107
Figure 35. Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk plots corresponding to the formation of 2-OH-NVP (A, B), 3-OH-NVP (C, D) and 12-OH-NVP (E, F) in rat liver microsomes.	109
Figure 36. Graphical representation of the slopes corresponding to the Lineweaver-Burk plots of NVP metabolism data versus NT concentrations. A: disappearance of NVP. B, C and D: formation of metabolites 2-, 3- and 12-OH-NVP, respectively.	112
Figure 37. Graphical representation of the percent of control (without NT) of NVP metabolites obtained in presence of NT, with and without NADPH generator system during preincubation.	113
Figure 38. Graphical representation of inhibition of 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) and 12-OH-NVP (C) formation, in presence and absence of NADPH generator system during preincubation, as a function of the NT concentration.	115
Figure 39. Inhibition of NVP metabolism by NT in human liver microsomes.	117

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Fármacos antirretrovirales comercializados actualmente para el tratamiento del SIDA, aprobados por la Unión Europea (UE) y/o por la FDA (US Food and Drug Administration).	22
Tabla 2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH, según GeSIDA (2015).	26
Tabla 3. ITINAN aprobados por la UE y/o por la FDA.	29
Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la nevirapina en humanos.	31
Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas de la nortriptilina en humanos.	36
Tabla 6. Grupos de ratas empleados para el estudio la farmacocinética y la biodisponibilidad de la NVP en la rata (n =5-6).	55
Tabla 7. Grupos de ratas empleados para el estudio de la absorción de NVP en los distintos segmentos gastrointestinales de la rata (n = 4-6).	56
Tabla 8. Grupos de ratas empleados para el estudio de la interacción <i>in vivo</i> entre NVP y NT (n = 6).	58
Tabla 9. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP, expresadas como media \pm desviación estándar (D.E.), obtenidas tras su administración por vía intravenosa, oral y subcutánea (n = 6). Valores normalizados para una dosis de 8 mg.	79
Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 1, 2 y 3. Los valores de AUC y $C_{\text{máx}}$ fueron normalizados para una dosis de 8 mg.	80

Tabla 11. Valores promedios \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de NVP, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, obtenidas tras su administración por vía intravenosa en ausencia (grupo 1) o en presencia de anestesia (grupo 4) ($n = 5-6$). Valores normalizados para una dosis de 8 mg.	81
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 1 y 4. Los valores de AUC fueron normalizados para una dosis de 8 mg.	82
Tabla 13. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración oral e intraintestinal ($n = 4-6$). Valores expresados en $\mu\text{g/ml}$.	83
Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 5-8.	85
Tabla 15. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal en ratas anestesiadas con el colédoco ligado (grupos 6 y 9) o no ligado (grupo 10) y con el duodeno lavado antes de la administración (grupos 9 y 10) o no lavado (grupo 6) ($n = 4-6$). Valores expresados en $\mu\text{g/ml}$.	85
Tabla 16. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 6, 9 y 10.	87
Tabla 17. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración oral con (grupo 12) o sin (grupo 11) NT ($n = 6$).	88
Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración oral con (grupo 12) o sin (grupo 11) NT.	90
Tabla 19. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 15) o sin (grupo 13) NT ($n = 6$).	91

Tabla 20. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 15) o sin (grupo 13) NT.	93
Tabla 21. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intravenosa con (grupo 17) o sin (grupo 16) NT (n = 6).	94
Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intravenosa con (grupo 17) o sin (grupo 16) NT.	95
Tabla 23. Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de NT (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 17) o sin (grupo 18) NVP (n = 6).	96
Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos de NT (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 17) o sin (grupo 18) NVP.	98
Tabla 25. Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de NT (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intravenosa con (grupo 15) o sin (grupo 19) NVP (n = 6).	99
Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos de NT (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intravenosa con (grupo 15) o sin (grupo 19) NVP.	100
Tabla 27. Velocidades de desaparición de NVP y de formación de sus metabolitos (media \pm D.E.) obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).	101
Tabla 28. Parámetros cinéticos de NVP y sus metabolitos (valor estimado \pm error estándar (E.E.)) obtenidos tras el ajuste de la cinética de Michaelis-Menten a los datos experimentales mostrados en la Figura 31.	102
Tabla 29. Metabolismo de NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).	103

Tabla 30. Formación del metabolito 2-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).	104
Tabla 31. Formación del metabolito 3-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).	104
Tabla 32. Formación del metabolito 12-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).	105
Tabla 33. Valores de IC ₅₀ de NT, SRT, FLUVOX y FLUOX correspondiente a la desaparición de NVP y formación de metabolitos en microsomas hepáticos de rata (valor estimado, (intervalo de confianza del 95 %)).	105
Tabla 34. Velocidades de desaparición de NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).	107
Tabla 35. Velocidades de formación de 2-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).	108
Tabla 36. Velocidades de formación de 3-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).	108
Tabla 37. Velocidades de formación de 12-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).	109
Tabla 38. Parámetros cinéticos de NVP y sus metabolitos (valor estimado \pm E.E.) correspondientes a los ajustes mostrados en las Figuras 34 y 35. Valores expresados en μ M (K _m) y nmoles/(min/mg de proteína) (V _{máx}).	111
Tabla 39. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT: pendientes correspondientes a las representaciones de Lineweaver-Burk.	111

Tabla 40. Inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.) en los ensayos de punto único en presencia y en ausencia de enzimas durante la preincubación (n = 4). En la última columna se muestra el porcentaje de inhibición tiempo-dependiente (% TDI) obtenido con la Ec. 1. 113

Tabla 41. Porcentaje de inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los ensayos de desplazamiento de IC₅₀ en presencia y en ausencia de enzimas durante la preincubación (n = 4). 114

Tabla 42. Valores de IC₅₀ de NT en relación a los distintos metabolitos de NVP (valor estimado, (intervalo de confianza del 95 %)). 114

Tabla 43. Porcentaje de inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.), en microsomas hepáticos humanos, en presencia de distintas concentraciones de NT (n = 4). 117

LIST OF TABLES

	Page
Table 1. Antiretroviral drugs currently marketed for AIDS treatment approved by EU and/or FDA.	22
Table 2. Combination regimen of antiretroviral drugs recommended in patients who start HIV treatment, according to GeSIDA (2015).	26
Table 3. ITINAN approved by EU and/or FDA.	29
Table 4. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of nevirapine in humans.	31
Table 5. Pharmacokinetic properties of nortriptyline in humans.	36
Table 6. Animal groups used to study the pharmacokinetics and bioavailability of NVP in rats (n = 5-6).	55
Table 7. Animal groups used to study the absorption of NVP from gastrointestinal segments (n = 4-6).	56
Table 8. Animal groups used to study the <i>in vivo</i> interaction between NVP and NT (n = 6).	58
Table 9. NVP plasma concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$), expressed as mean \pm standard deviation (S.D.) obtained after intravenous, oral and subcutaneous administration (n = 6). Parameter values normalized for an 8-mg dose.	79
Table 10. Pharmacokinetic parameters for NVP (mean \pm S.D.) in rats obtained in groups 1, 2 and 3. AUC y C_{max} values normalized for an 8-mg dose.	80
Table 11. Mean values \pm S.D. of NVP plasma concentrations, expressed in $\mu\text{g}/\text{ml}$, obtained after intravenous administration to anesthetized or unanesthetized rats (n = 5-6). Data normalized for an 8 mg dose.	81

Table 12. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean ± S.D.) obtained in groups 1 and 4. AUC values normalized for an 8-mg dose.	82
Table 13. NVP plasma concentrations (mean ± S.D.) following oral and intrainestinal administration (n = 4-6). Values expressed as µg/ml.	83
Table 14. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean ± S.D.) obtained in groups 5-8.	85
Table 15. NVP plasma concentrations (mean ± S.D.) following intraduodenal administration in anesthetized rats with ligated (groups 6 and 9) and non-ligated (group 10) bile duct (n = 4-6). The duodenum was washed with serum prior to drug administration in groups 9 and 10. Values expressed as µg/ml.	85
Table 16. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean ± S.D.) obtained in groups 6, 9 and 10.	87
Table 17. NVP plasma concentrations (µg/ml, mean ± S.D.) following oral administration in the presence (group 12) or absence (group 11) of NT (n = 6).	88
Table 18. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean ± S.D.) obtained after oral administration in the presence (group 12) or absence (group 11) of NT.	90
Table 19. NVP plasma concentrations (µg/ml, mean ± S.D.) following intraduodenal administration in the presence (groups 14 and 15) or absence (group 13) of NT (n = 6).	91
Table 20. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean ± S.D.) obtained after intraduodenal administration in the presence (groups 14 and 15) or absence (group 13) of NT.	93
Table 21. NVP plasma concentrations (µg/ml, mean ± S.D.) following intravenous administration in the presence (group 17) or absence (group 16) of NT (n = 6).	94

Table 22. Pharmacokinetic parameters of NVP (mean \pm S.D.) obtained after intravenous administration in the presence (group 17) or absence (group 16) of NT.	95
Table 23. NT plasma concentrations (ng/ml, mean \pm S.D.) following intraduodenal administration in the presence (groups 14 and 17) or absence (group 18) of NVP (n = 6).	96
Table 24. Pharmacokinetic parameters of NT (mean \pm S.D.) obtained after intraduodenal administration in the presence (groups 14 and 17) or absence (group 18) of NVP.	98
Table 25. NT plasma concentrations (ng/ml, mean \pm S.D.) following intravenous administration in the presence (group 15) or absence (group 19) of NVP (n = 6).	99
Table 26. Pharmacokinetic parameters of NT (mean \pm S.D.) obtained after intravenous administration in the presence (group 15) or absence (group 19) of NVP.	100
Table 27. NVP disappearance and metabolite appearance rates (mean \pm S.D.) obtained in rat hepatic microsomes (n = 4).	101
Table 28. Kinetic parameters of NVP and its metabolites (estimated value \pm standard error (S.E.)) obtained after fitting the Michaelis-Menten equation to experimental data shown in Figure 31.	102
Table 29. NVP metabolism, expressed as percentage of control, as a function of inhibitor concentration (mean \pm S.D., n = 4).	103
Table 30. 2-OH-NVP formation, expressed as percentage of control, as a function of inhibitor concentration (mean \pm S.D., n = 4).	104
Table 31. 3-OH-NVP formation, expressed as percentage of control, as a function of inhibitor concentration (mean \pm S.D., n = 4).	104

Table 32. 12-OH-NVP formation, expressed as percentage of control, as a function of inhibitor concentration (mean \pm S.D., n = 4).	105
Table 33. IC ₅₀ values of NT, SRT, FLUVOX and FLUOX corresponding to NVP disappearance and metabolite appearance in rat hepatic microsomes (estimated value, (95 % confidence interval)).	105
Table 34. NVP disappearance rates (mean \pm S.D.) in the presence of different concentrations of NT, obtained in rat liver microsomes (n = 4).	107
Table 35. 2-OH-NVP formation rates (mean \pm S.D.) in the presence of different concentrations of NT, obtained in rat liver microsomes (n = 4).	108
Table 36. 3-OH-NVP formation rates (mean \pm S.D.) in the presence of different concentrations of NT, obtained in rat liver microsomes (n = 4).	108
Table 37. 12-OH-NVP formation rates (mean \pm S.D.) in the presence of different concentrations of NT, obtained in rat liver microsomes (n = 4).	109
Table 38. Kinetic parameters of NVP and its metabolites (estimated value \pm S.E.) corresponding to the fitting shown in Figures 34 and 35. Values expressed as μ M (K _m) and nmoles/(min/mg of protein) (V _{max}).	111
Table 39. NVP metabolism inhibition by NT: slopes corresponding to Lineweaver-Burk plots.	111
Table 40. Inhibition of NVP metabolites formation (mean \pm S.D.), in the single point assays, in the presence and absence of NADPH generator system during preincubation (n = 4). The last column shows the percentage of time-dependent inhibition (% TDI) obtained with Eq. 1.	113
Table 41. Inhibition of the formation of NVP metabolites (mean \pm S.D.) obtained in IC ₅₀ shift assays in the presence and absence of NADPH generator system during preincubation (n = 4).	114

Table 42. IC₅₀ values of NT for the formation of NVP metabolites (estimated value, (95 % confidence interval)). 114

Table 43. Inhibition of the formation of NVP metabolites (mean ± S.D.) in human hepatic microsomes at different NT concentrations (n = 4). 117

RESUMEN/ABSTRACT

INTRODUCCIÓN

1. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	9
2. Estructura y ciclo replicativo del VIH.....	16
3. Tratamiento Antirretroviral.....	20
4. Nevirapina	28
5. Nortriptilina	35
6. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.....	39
6.1. Sertralina	39
6.2. Fluoxetina	41
6.3. Fluvoxamina.....	44

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Fármacos y reactivos	53
2. Ensayos <i>in vivo</i>	53
2.1. Animales de experimentación	53
2.2. Grupos de ensayo	54
2.2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina: Grupos 1-4.....	55
2.2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales: Grupos 5-10	56
2.2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT: Grupos 11-19	58
3. Ensayos <i>in vitro</i>	62

3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata	62
3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomas hepáticos de rata	63
3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata	64
3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de humanos	66
4. Métodos analíticos	67
4.1. Nevirapina.....	67
4.2. 2-, 3- y 12-hidroxinevirapina.....	68
4.3. Nortriptilina	69
5. Métodos farmacocinéticos y estadísticos	70

RESULTADOS

1. Evaluación del método analítico	75
1.1. Nevirapina.....	75
1.2. Nortriptilina	76
1.3. 2-, 3-, y 12-hidroxinevirapina.....	77
2. Ensayos <i>in vivo</i>	78
2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina..	78
2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales	82
2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT	88
2.3.1. Niveles plasmáticos y parámetros farmacocinéticos de NVP	88
2.3.1.1. Administración oral de NVP (grupos 11 y 12).....	88
2.3.1.2. Administración intraduodenal de NVP (grupos 13-15).....	90
2.3.1.3. Administración intravenosa de NVP (grupos 16 y 17).....	93

2.3.2. Niveles plasmáticos y parámetros farmacocinéticos de NT	95
2.3.2.1. Administración intraduodenal de NT (grupos 14, 17 y 18).....	96
2.3.2.2. Administración intravenosa de NT (grupos 15 y 19).....	98
3. Ensayos <i>in vitro</i>	100
3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata.....	100
3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomas hepáticos de rata	102
3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata	107
3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de humanos	116

DISCUSIÓN

1. Métodos analíticos.....	121
2. Ensayos <i>in vivo</i>	122
2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina	122
2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales	125
2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT	127
2.3.1. Elección de las dosis ensayadas.....	127
2.3.2. Administración oral de NVP.....	128
2.3.3. Administración intraduodenal de NVP	129
2.3.4. Administración intravenosa de NVP	130
2.3.5. Administración intraduodenal de NT.....	131
2.3.6. Administración intravenosa de NT.....	131
3. Ensayos <i>in vitro</i>	132

3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata	132
3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomas hepáticos de rata	133
3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata	136
3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de humanos	140

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN/ABSTRACT

En la actualidad, el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad incurable. Sin embargo, el uso de una adecuada terapia antirretroviral reduce la morbilidad y la mortalidad relacionadas con esta enfermedad y permite retrasar su progresión clínica. El tratamiento de elección consiste en la combinación de, al menos, tres fármacos antirretrovirales, estando presente en muchas de estas combinaciones la nevirapina (NVP), un inhibidor no nucleósido de la transcriptasa inversa del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). En los pacientes VIH-positivos, la depresión es una de las comorbilidades psicosociales más comunes, presentando una prevalencia del 20-45 %.

En este trabajo se han realizado dos tipos de estudios: ensayos *in vivo*, en los que se han utilizado ratas como animal de experimentación, y ensayos *in vitro*, realizados con microsomas hepáticos de rata y de humanos.

En los ensayos *in vivo* se estudió la farmacocinética, la biodisponibilidad oral y subcutánea, y la absorción de la NVP en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal de la rata. Asimismo, se estudió la posible interacción farmacocinética entre NVP y el antidepresivo tricíclico nortripilina (NT).

Los ensayos *in vivo* mostraron que los procesos de distribución y absorción de la NVP en ratas y en humanos siguen pautas similares. El volumen de distribución obtenido en ratas (1,6-1,8 L/Kg) fue ligeramente superior al valor descrito en humanos (1,21 L/Kg) y la biodisponibilidad de la NVP administrada por vía oral y por vía subcutánea fue, en ambos casos, del 91 %, prácticamente igual a la biodisponibilidad oral descrita en humanos (91-93 %). La velocidad de absorción de la NVP siguió el orden duodeno > íleon > colon > estómago, de forma semejante a lo descrito en humanos. Estos resultados indican que la rata constituye un animal de laboratorio adecuado para efectuar estudios

farmacocinéticos y biofarmacéuticos con distintas formas farmacéuticas de NVP con una elevada probabilidad de que los resultados obtenidos sean extrapolables a la especie humana. En los estudios realizados con tramos intestinales se observó que la presencia de bilis favorece la absorción de la NVP en el duodeno.

La coadministración de NVP y NT dio lugar a concentraciones plasmáticas de NVP significativamente mayores que las obtenidas en el grupo control (animales administrados solo con NVP), obteniéndose concentraciones plasmáticas máximas 2-5 veces mayores y un aclaramiento 7 veces menor. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros farmacocinéticos de NT obtenidos en ausencia y presencia de NVP.

En los ensayos *in vitro* se estudió la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas de rata y humanos. Además, se determinó la posible interacción de la NVP con otros fármacos antidepresivos pertenecientes al grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.

Los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* mostraron una inhibición del metabolismo hepático de la NVP por la NT de tipo competitivo y tiempo-dependiente, siendo la inhibición más intensa en los microsomas de rata que en los de humanos. Al comparar el efecto inhibidor de la NT con otros fármacos antidepresivos se observó que la NT posee una potencia inhibitoria similar a la fluoxetina (valores de IC_{50} : 3,37 y 3,88 μ M, respectivamente) y superior a la sertralina y fluvoxamina (valores de IC_{50} : 38,09 y 16,15 μ M, respectivamente). Se precisan estudios *in vivo* en humanos para evaluar la relevancia clínica de la interacción detectada en ratas entre NVP y NT.

Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is, at present, an incurable disease. However, the administration of an adequate antiretroviral therapy has resulted in a dramatic reduction of AIDS-related morbidity and mortality, delaying its clinical progression. Highly active antiretroviral therapy consist of the combination of at least three active drugs of multiple drug classes, nevirapine (NVP) frequently being one of them. NVP is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). One of the most frequent comorbidities in individuals with HIV infection is depression, with a lifetime prevalence of 22 to 45 %.

In this work, two types of studies have been performed: *in vivo* assays, using rats as experimental animals, and *in vitro* assays, using rat and human liver microsomes.

In the *in vivo* assays, oral and subcutaneous pharmacokinetics and bioavailability of NVP and its absorption in the different segments of the rat gastrointestinal tract were studied. The potential pharmacokinetic interaction between NVP and the tricyclic antidepressant nortripyline (NT) was also studied.

The *in vivo* results showed that the processes of distribution and absorption of NVP in rats and humans follow similar patterns. The volume of distribution obtained in rats (1.6-1.8 L/kg) was slightly higher than the value reported in humans (1.21 L/kg) and the bioavailability estimated in rats (91 % for oral and subcutaneous administration routes) was practically equal to that reported in humans (91-93 %) after oral administration of therapeutic doses. The absorption rate of NVP followed the order duodenum > ileum > colon > stomach, similar to that described in humans. These results indicate that the rat

is a suitable laboratory animal to perform pharmacokinetic and biopharmaceutical studies with different pharmaceutical forms of NVP, in such a way that the obtained results could be extrapolated to humans. In the studies with the intestinal sections of rats it was observed that the presence of bile in the duodenum increased the absorption rate of NVP.

NVP plasma concentrations were significantly higher when this drug was coadministered with NT in the rats. The maximum plasma concentration of NVP increased 2-5 times, and total plasma clearance decreased 7-fold in the presence of NT. However, statistically significant differences were not found between the pharmacokinetic parameters of NT obtained in absence and presence of NVP.

The *in vitro* assays were performed to evaluate the inhibitory effect of NT on the NVP metabolism in rat and human hepatic microsomes. In addition, potential interactions between NVP and other antidepressant drugs belonging to the group of selective serotonin reuptake inhibitors were also studied.

The *in vitro* results showed an inhibition of the hepatic metabolism of NVP by NT, being more intense in rat- than in human microsomes. Moreover, the interaction between NVP and NT involved both competitive and time-dependent inhibition. When comparing the inhibitory effect of NT with other antidepressant drugs, it was observed that NT had a similar inhibitory potency as fluoxetine (IC₅₀ values: 3.37 and 3.88 μM, respectively) but higher than fluvoxamine and sertraline (IC₅₀ values: 38.09 and 16.15 μM, respectively). However, *in vivo* studies in humans are required to evaluate the clinical relevance of the pharmacokinetic interaction between NVP and NT detected in rats before it can be taken into account in patients receiving NVP.

INTRODUCCIÓN

1. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad causada por la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus ataca al sistema inmunitario, concretamente a las células que expresan el receptor CD4, provocando su destrucción progresiva. Se considera que una persona padece SIDA cuando el nivel de linfocitos T CD4+ es inferior a 200 células por microlitro de sangre (1). Sin embargo, no todos los pacientes infectados con el virus VIH tienen SIDA. Ser portador del virus, VIH-positivo o seropositivo significa que el paciente presenta anticuerpos específicos contra el VIH, por tanto puede transmitir la enfermedad, pero que todavía no la ha desarrollado. Por el contrario, los enfermos de SIDA desarrollan la enfermedad.

Existen dos tipos de VIH, el VIH-1, descubierto en 1983, y el VIH-2, descubierto en 1986. Ambos pertenecen a la familia *Retroviridae*, subfamilia *Lentivirinae*, y dan lugar al SIDA. Se considera que el VIH-1 es el responsable de la pandemia a nivel mundial, mientras que el VIH-2 se localiza principalmente en África occidental aunque actualmente se ha extendido hasta ciertas partes de Europa (Portugal mayoritariamente) y la región suroeste de la India (2). Estudios filogenéticos sugieren que el VIH evolucionó a partir de un *lentivirus* que de manera natural infecta a primates africanos: el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). Los datos actuales indican que la epidemia por VIH-1 surgió por la transmisión del VIS de una subespecie de chimpancé a los seres humanos, mientras que el VIH-2 fue transmitido desde el mono Mangabeye gris al ser humano (3). El VIH-2 tiene una mayor similitud genética con el VIS que con el VIH-1 (2).

El VIH-1 y el VIH-2 producen enfermedades con distintas características; la enfermedad producida por el VIH-2 es menos agresiva y deteriora al sistema inmunitario de forma más lenta. Sin embargo, a pesar de ser dos virus diferentes, comparten ciertas características biológicas, tales como: mismo tropismo celular, mismo modo de transmisión, mecanismos de replicación similares y producción de estados de inmunodeficiencia (4).

Dentro del VIH-1 existen cuatro grandes grupos genéticamente distintos: grupo M (*main* o principal), grupo O (*outlier*), grupo N (no-M, no-O) y grupo P (con sólo dos casos documentados, pendiente de identificar en más casos en humanos). El grupo M fue el primer grupo descubierto y representa la forma pandémica del VIH-1, siendo el responsable de más de un 90 % de las infecciones por VIH-1 en todo el mundo, y está subdividido a su vez en 8 subtipos genéticos distintos (A-H). El grupo O, descubierto en 1990, es mucho menos común que el grupo M (5,6) ya que representa menos de un 1 % de las infecciones globales por VIH-1, restringiéndose a Camerún, Gabón y países vecinos (7). El grupo N fue identificado en 1998 (8) y es incluso menos prevalente que el grupo O ya que hasta ahora sólo se han documentado 13 casos en individuos cameruneses (9). Finalmente, en 2009 fue identificado en una mujer camerunés un nuevo VIH estrechamente relacionado con el VIS descubierto en gorilas (VIS gor), el grupo P (10). Hasta el momento, este grupo sólo se ha identificado en otra persona también procedente de Camerún (11).

Por otra parte, el VIH-2 consta de ocho subtipos (A-H) raramente identificados fuera de África. Tan sólo el subtipo A, y en menor medida el B, tienen importancia epidemiológica.

Los orígenes de los virus VIH-1 y VIH-2 que infectan a la especie humana se han vinculado con varias especies de primates (Figura 1). Por una parte, se ha establecido que los grupos M y N del VIH-1 se han originado directamente del VIS de chimpancés (VIS cpz) del centro y oeste de África. Mientras que los grupos O y P, se ha confirmado que están relacionados con el VIS gor de la zona de Camerún. Por otra parte, el origen del VIH-2 parece estar en el VIS del Mangabeye gris (VIS smm).

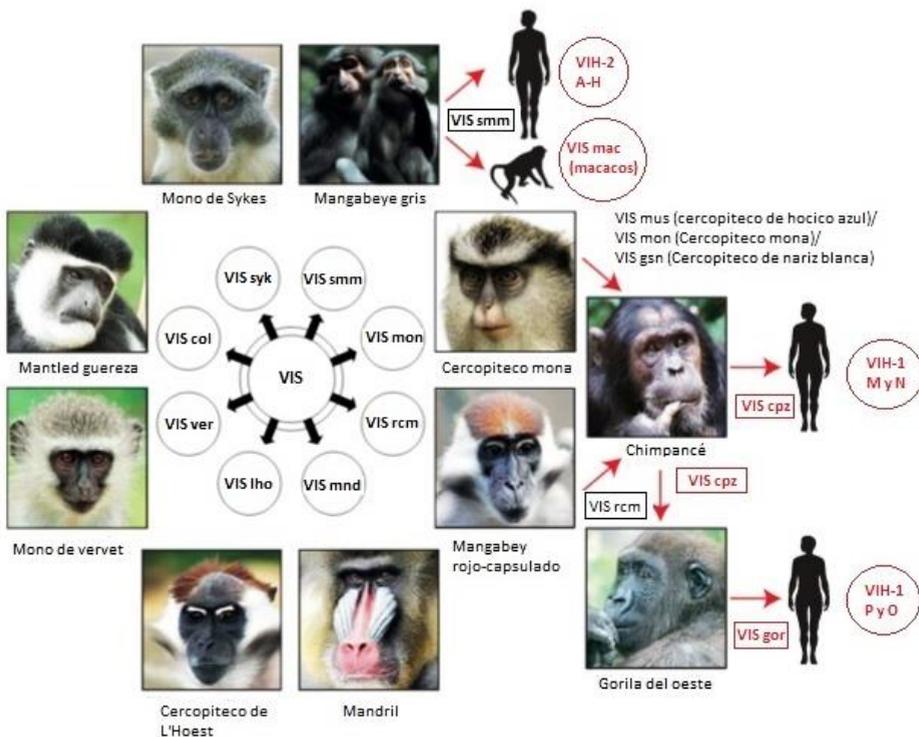


Figura 1. Orígenes de virus humanos causantes del SIDA. Los virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) se acompañan de un sufijo identificativo de la especie de primates de origen. Las transmisiones cruzadas entre especies, así como los virus resultantes, están resaltados en rojo. Figura adaptada de Sharp *et al.* (12).

La infección por el VIH se ha diseminado por todos los países del planeta. Los datos estadísticos mundiales publicados por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) reflejan que, en 2013, había 35 millones de personas infectadas por el VIH y un 73 % vivía en el África subsahariana. Además, se estima que, en el mismo año, unos 2,1 millones de personas contrajeron SIDA y 1,5 millones de personas fallecieron como consecuencia de esta enfermedad (13).

Las principales vías de transmisión del VIH son la parenteral, la perinatal y el contacto sexual. Se puede contagiar el VIH a través de jeringas, agujas, material de inyección, tijeras o instrumentos cortantes contaminados con sangre y hemoderivados. También se puede contagiar a través de pequeñas heridas en la piel o en las mucosas. La mayor parte de las transmisiones parenterales ocurren como consecuencia del uso de equipos de inyección contaminados para el consumo de drogas intravenosas. Por otra parte, la transmisión vertical de madre a hijo puede producirse durante el embarazo, el parto o la lactancia. Sin embargo, las relaciones sexuales son, a escala mundial, el principal modo de transmisión del VIH, teniendo las mujeres más probabilidad de contraer el SIDA a través de los varones que a la inversa (14).

La principal causa de la progresión del SIDA en pacientes VIH-positivos es la destrucción de los linfocitos T CD4+, que constituyen el objetivo principal del virus y que son fundamentales para la activación de la respuesta inmune específica humoral y celular. La pérdida progresiva de estas células daña al sistema inmunitario, lo que ocasiona una mayor susceptibilidad del organismo a las infecciones oportunistas.

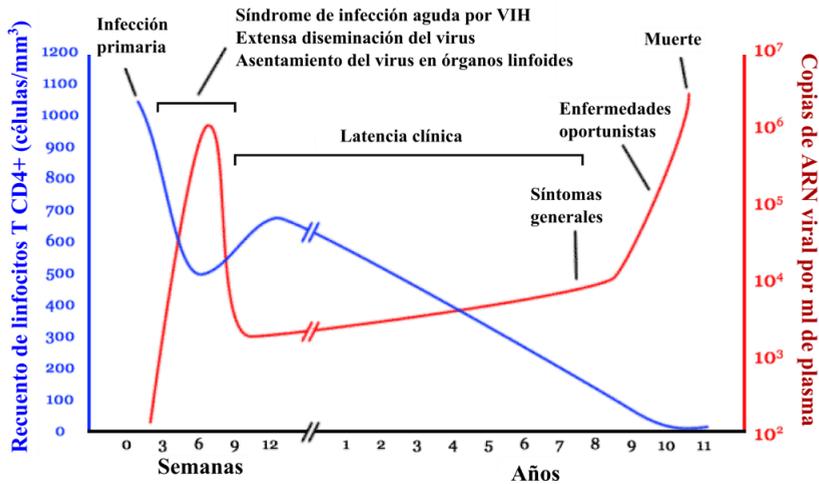


Figura 2. Evolución de la infección por VIH. En azul, evolución del recuento de linfocitos T CD4+. En rojo, evolución de la carga viral.

(<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hiv-timecourse-es.png>)

El curso de la infección por el VIH-1 se puede dividir en tres fases, definidas principalmente mediante la combinación del número de linfocitos T CD4+ y la carga viral plasmática (Figura 2):

1. La primera fase es la **infección aguda o infección primaria**, que puede extenderse de cuatro a ocho semanas abarcando dos etapas. La primera etapa de diseminación viral ocurre durante las dos o tres semanas posteriores a la infección y culmina con el pico de viremia. En este período no se detectan anticuerpos específicos contra el VIH-1 (período ventana). Además, se observa un descenso transitorio en el número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y altos niveles de carga viral plasmática (15). La segunda etapa se caracteriza por el descenso brusco de la viremia (16) y la detección de anticuerpos específicos contra el virus (período de seroconversión) que se acompaña con un aumento de los linfocitos T CD4+ que, generalmente,

- no retornan a los niveles previos a la infección. El riesgo de transmisión del VIH es mayor durante esta primera fase aguda que en las fases posteriores. La respuesta inmune celular comienza en 1-2 semanas desde la infección, mientras que la respuesta inmune humoral aparece entre las 2 semanas y los 3 meses posteriores a la infección (17).
2. La siguiente fase es la **infección crónica** por el VIH (también llamada infección asintomática por el VIH o fase de latencia clínica), la cual puede durar entre 1 a 15 años o más. Esta etapa asintomática se caracteriza por una eficaz respuesta celular específica y la síntesis de anticuerpos. El VIH sigue reproduciéndose en el cuerpo pero en concentraciones muy bajas, confinando la replicación viral a los órganos linfáticos (sobre todo ganglios linfáticos y bazo, que constituyen el principal reservorio del virus). Por otra parte, el número de linfocitos T CD4+ se reduce lenta y progresivamente.
 3. La tercera fase es la **fase final** de la infección por el VIH y se corresponde con las manifestaciones clínicas del SIDA propiamente dicho. En esta fase, los linfocitos T CD4+ disminuyen drásticamente (< 200 células/mm³), aparecen altos niveles de viremia plasmática los cuales aumentan con las infecciones oportunistas concomitantes que conducen finalmente a la muerte. Sin tratamiento, las personas con SIDA sobreviven generalmente unos tres años.

En la primera fase de la infección, el recuento de linfocitos T CD4+ es superior a 1.000/mm³ de sangre, tanto en los sujetos seronegativos como en los seropositivos (en un sujeto sano se sitúa entre 500 y 1.600/mm³). Cuando dicho recuento cae por debajo de 500/mm³ pueden comenzar a aparecer las infecciones, clásicas y oportunistas, relacionadas con el SIDA y por debajo de

200/mm³ el riesgo es máximo (18,19). Respecto a la carga viral plasmática, niveles de ARN viral inferiores a 1.000 copias por mililitro de plasma suponen un bajo riesgo de progresión de la infección, mientras que niveles superiores a 100.000 copias/ml implican un alto riesgo de progresión (20).

Los síntomas de la infección por el VIH varían en función del estadio en que se encuentre la infección. En las primeras semanas que siguen al contagio, los individuos infectados pueden no manifestar ningún síntoma o bien síntomas inespecíficos: fiebre, fatiga, erupción cutánea maculopapular, dolor de cabeza, linfadenopatía, faringitis, mialgia, artralgia, meningitis aséptica, dolor retro-orbital, pérdida de peso, depresión, trastornos gastrointestinales, sudoración nocturna y úlceras orales o genitales (21). Generalmente, estos síntomas perduran durante menos de 14 días (22). Cuanto más sintomática sea la infección, más rápida será la progresión de la enfermedad (23,24). En ausencia de tratamiento, los pacientes VIH-positivos pueden desarrollar enfermedades graves como tuberculosis, meningitis por criptococos o diversos tipos de cáncer, como por ejemplo linfomas o sarcoma de Kaposi entre otros (4).

La depresión es una de las comorbilidades psicosociales más comunes entre los pacientes VIH-positivos, presentando una prevalencia del 20-45 % (25). Esta comorbilidad aparece a medida que los pacientes asumen las consecuencias del diagnóstico de la infección y afrontan las dificultades de vivir con una enfermedad crónica potencialmente mortal. Como consecuencia, la depresión dificulta la adherencia de los pacientes al tratamiento antirretroviral (26). Otras de las comorbilidades más comunes entre los pacientes infectados por VIH son las co-infecciones por el virus de la hepatitis C, la hipertensión, la diabetes y la enfermedad obstructiva crónica (27).

En cuanto al diagnóstico de la infección por el VIH en adultos, el único método homologado es la detección de anticuerpos específicos (Ac-VIH). Por el contrario, en los recién nacidos la detección de los ácidos nucleicos del virus es el método diagnóstico más eficaz. La detección de Ac-HIV se lleva a cabo mediante técnicas de enzoinmunoensayo (EIA). Las pruebas de tercera generación utilizan como antígeno proteínas recombinantes o péptidos sintéticos capaces de detectar anticuerpos frente al VIH-2 y los grupos M y O del VIH-1. Sin embargo, estos reactivos dan lugar a falsos negativos cuando el enfermo se encuentra en el período ventana, es decir, entre las 2 y las 8 primeras semanas tras el contagio. Con el fin de reducir este período, se han desarrollado recientemente las pruebas de cuarta generación, que permiten además la detección simultánea del antígeno p24-VIH-1. En el caso de que una prueba de EIA resulte positiva para anticuerpos frente al VIH-1 será necesario llevar a cabo una prueba de confirmación mediante Western Blot (WB). Según la Organización mundial de la Salud (OMS), un suero es considerado positivo cuando presenta reactividad al menos frente a 2 de las tres glucoproteínas de envoltura que posee el virus (gp160, gp120 y gp41) (28).

2. Estructura y ciclo replicativo del VIH

El VIH es un retrovirus con forma de esfera con un diámetro de 100-120 nm. El núcleo interno contiene dos moléculas de ARN monocatenario, acompañadas por proteínas de la nucleocápsida (p6/p7) y algunas enzimas tales como transcriptasa inversa, proteasa e integrasa. En cada extremidad del genoma del virus se sitúan dos secuencias de nucleótidos llamadas LTR o repetición terminal larga (del inglés, *Long Terminal Repeat*), que están implicadas en el

proceso de integración en la célula huésped. El núcleo se encuentra rodeado de una cápside cónica constituida por la proteína vírica p24 y una matriz compuesta por p17 que protege la cápside. Ésta, a su vez, está rodeada por una bicapa lipídica que deriva de la membrana celular de la célula hospedadora en la que el virus previamente se replicó. Atravesando esta membrana se encuentran las glicoproteínas virales (gp120 y gp41) que actúan en el momento de la unión del virus a la célula hospedadora (Figura 3).

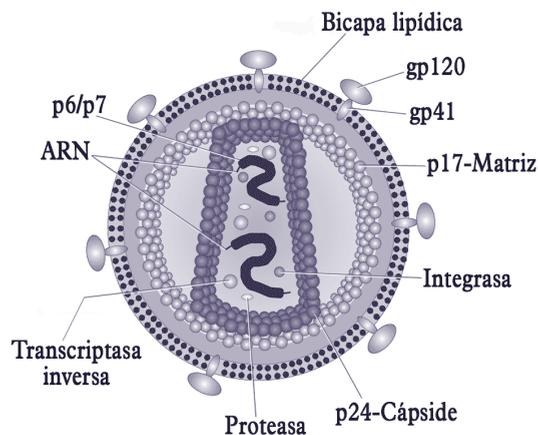


Figura 3. Estructura del virus VIH.

(<http://www.dicyt.com/noticias/disenan-una-herramienta-para-estimar-el-bienestar-de-las-personas-con-vih>)

Las proteínas estructurales son codificadas por los genes *gag* (*group specific antigen*), *env* (*envelope*) y *pol* (*polymerase*). El gen *gag* codifica las principales proteínas estructurales, la proteína de matriz p17 y la proteína de la cápside p24. El gen *env* codifica las proteínas de la envoltura viral (gp120 y gp41), necesarias para la fusión del VIH con la membrana de los linfocitos T CD4+. Por último, el gen *pol* codifica las tres enzimas necesarias para el ciclo infeccioso del virus: la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa. La transcriptasa inversa

es la enzima que transcribe el ARN del virus en ADN, una vez el núcleo viral penetra en el citoplasma de la célula huésped. La integrasa cataliza la inserción del ADN viral en los cromosomas celulares y la proteasa lleva a cabo la maduración del precursor proteico p55 procedente del gen gag, que es cortado en cuatro fragmentos correspondientes a las proteínas p24, p17, p6 y p7 (29).

El ciclo de replicación del VIH comprende varias fases (Figura 4) (30):

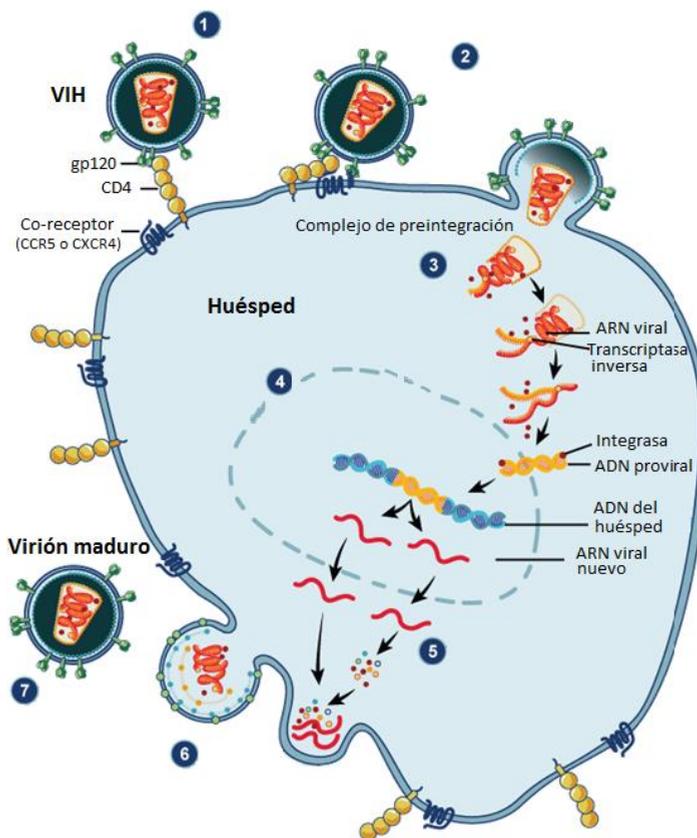


Figura 4. Fases del ciclo replicativo del virus VIH-1.
(http://www.daviddarling.info/images/HIV_replication_cycle.gif)

- 1. Fusión.** La internalización de las partículas virales en las células huésped es un fenómeno complejo, determinado en primera instancia por la unión entre la glicoproteína gp120 viral y el receptor CD4 de los linfocitos T CD4+. La unión del VIH al receptor CD4 da lugar a cambios conformacionales en la glicoproteína gp120 provocando la exposición y activación de la glicoproteína gp41, que a su vez interactúa con otros co-receptores, como los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, expresados en la célula huésped.
- 2 Entrada.** Las interacciones descritas anteriormente determinan la fusión de la envoltura viral con la membrana celular de la célula infectada, lo que resulta en la liberación del ARN viral, la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa en el citoplasma de la célula.
- 3 Transcripción inversa.** Se obtiene una copia de ADN a partir del ARN viral. El genoma viral es transportado en dos cadenas de ARN, mientras que el material genético de las células huésped se encuentra como ADN. La transcriptasa inversa transcribe el ARN viral en una cadena doble de ADN complementario o ADN copia (ADNc) denominado ADN proviral.
- 4. Integración.** El ADN proviral es transportado al núcleo celular y se integra en el ADN de la célula huésped por acción de otra enzima viral: la integrasa. Así, cuando la célula trata de sintetizar nuevas proteínas crea accidentalmente nuevos virus VIH.
- 5. Transcripción y Traducción.** Las cadenas del ADN proviral se transcriben por la ARN polimerasa II celular, dando lugar a diferentes transcritos de ARN mensajero (ARNm) que codifican para las proteínas estructurales y reguladoras del virus.

6. **Ensamblaje viral.** Las largas cadenas de proteínas son cortadas en pequeñas proteínas individuales por la enzima proteasa. Las proteínas migran entonces hacia la membrana citoplasmática de la célula huésped donde se ensambla el ARN, las enzimas virales y las proteínas estructurales. Además, algunas proteínas virales se incorporan a la membrana plasmática de la propia célula huésped para formar la envoltura viral.
7. **Gemación.** Una vez que las nuevas partículas virales son ensambladas, se liberan de la célula huésped por gemación de la membrana. Las nuevas copias del VIH pueden ahora infectar a otras células.

3. Tratamiento Antirretroviral

En la actualidad no existe cura para el SIDA, pero sí varios fármacos que permiten retrasar la progresión clínica de la enfermedad, aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida de las personas infectadas (31). El tratamiento con antirretrovirales debe iniciarse antes de que el riesgo de infecciones oportunistas o progresión de la enfermedad sean inminentes, recomendándose su inicio con la mayor brevedad posible en todos los casos con enfermedad crónica sintomática. Para pacientes asintomáticos, se recomienda el inicio del tratamiento siempre que presenten un recuento de linfocitos T CD4+ inferior a 350 células/ μ l (32). En cualquier caso, el tratamiento debería recomendarse en pacientes con una carga viral elevada (100.000 copias/ml), en pacientes con enfermedades hepáticas (cirrosis o hepatitis C) o edad avanzada (mayores de 55 años) (33). Además, existen determinadas circunstancias en las que el inicio del tratamiento farmacológico está

recomendado independientemente de la carga viral o los niveles de T CD4+ del paciente, como son el embarazo o las parejas serodiscordantes (34).

El objetivo del tratamiento antirretroviral es reducir la carga viral plasmática por debajo de los límites detectables (50 copias/ml) y mantenerla durante el mayor tiempo posible con el fin de detener el deterioro del sistema inmunológico y recuperar la respuesta inmune, reducir la morbilidad y la mortalidad asociada, y prevenir la transmisión del VIH. La terapia actual con antirretrovirales debe mantenerse de por vida, ya que con ella no se logra erradicar el genoma viral de los tejidos reservorio (34).

El mecanismo de acción de los fármacos antirretrovirales consiste en impedir la entrada del virus en la célula o su replicación en el interior de la misma, al actuar en alguna etapa del ciclo vital del virus (35). Según su lugar de acción, los fármacos antirretrovirales se clasifican en:

- 1. Inhibidores de la fusión/entrada (IF).** Impiden o dificultan la entrada del virus a la célula CD4+, bloqueando la unión del virus a los receptores localizados en la superficie de los linfocitos.
- 2. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos/nucleótidos (ITIAN).** Interfieren en la segunda etapa del ciclo replicativo del VIH, inhibiendo competitivamente la transcriptasa inversa (el antirretroviral imita estructuralmente los sustratos naturales para la síntesis del ADN) o impidiendo que se añadan nuevos nucleótidos a la cadena de ADN durante el proceso de transcripción.
- 3. Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de los nucleósidos (ITINAN).** Actúan en la misma etapa que los ITIAN, pero inhibiendo la

transcriptasa inversa de manera no competitiva, ya que se unen a un punto de la enzima distinto al de unión de los nucleótidos naturales.

4. **Inhibidores de la integrasa (INI).** Impiden la integración del ADN proviral en el ADN de la célula CD4+.
5. **Inhibidores de la proteasa (IP).** Intervienen inhibiendo la proteasa vírica. El bloqueo de esta enzima impide la fragmentación de la cadena proteica obtenida como consecuencia de la expresión del ADN proviral, obteniéndose copias defectuosas del VIH, que aunque son capaces de destruir la célula infectada, carecen de capacidad para infectar otras células.

Tabla 1. Fármacos antirretrovirales comercializados actualmente para el tratamiento del SIDA, aprobados por la Unión Europea (UE) y/o por la FDA (US Food and Drug Administration).

Nombre genérico (Abreviatura)	Nombre comercial	Laboratorio Titular	Presentación
Inhibidores de la fusión/entrada (IF)			
Enfuvirtida (ENF)	Fuzeon®	Roche	Polvo y disolvente 90 mg/ml para solución inyectable
Maraviroc (MRC)	Selzentry®(FDA) Celsentri® (UE)	Viiv Healthcare Uk Limited	Comprimidos 150 y 300 mg
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN)			
Zidovudina (AZT o ZDV)	Retrovir®, genéricos	Viiv Healthcare Uk Limited	Cápsulas 250 mg Solución oral 100 mg/10 ml

Didanosina (ddl)	Videx®, genéricos	Bristol Myers Squibb	Comprimidos masticables 25, 50, 100 y 150 mg Cápsulas gastroresistentes 125, 200, 250 y 400 mg Polvo para solución oral 2 g
Estavudina (d4T)	Zerit®	Bristol Myers Squibb	Cápsulas de 15, 20, 30 y 40 mg Polvo para solución oral 1 mg/ml
Lamivudina (3TC)	Epivir®, genéricos	Viiv Healthcare Uk Limited	Comprimidos de 150 y 300 mg Solución oral de 10 mg/ml
Sulfato de Abacavir (ABC)	Ziagen®	Viiv Healthcare Uk Limited	Comprimidos de 300 mg Solución oral de 20 mg/ml
Emtricitabina (FTC)	Emtriva®	Gilead Sciences	Cápsulas de 200 mg Solución oral de 10 mg/ml
Tenofovir disoproxil fumarato (TDF)	Viread®	Gilead Sciences	Comprimidos de 123, 163, 204 y 245 mg Gránulos de 33 mg/g

Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN)

Nevirapina (NVP)	Viramune®, Viramune XR®, genéricos	Boehringer Ingelheim	Comprimidos 200 mg Suspensión oral 50 mg/5 mL Comprimidos liberación prolongada 100 y 400 mg
Delavirdina (DLV)	Rescriptor® (FDA)	Pfizer	Comprimidos 100 y 200 mg
Efavirenz (EFV)	Sustiva® (FDA y UE), Stocrin® (UE), genéricos	Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp And Dohme Ltd.	Cápsulas 50, 100 y 200 mg Comprimidos 600 mg Solución oral 30 mg/mL
Etravirina (ETR)	Intelence®	Janssen-Cilag	Comprimidos 100 y 200 mg

Rilpivirina (RPV)	Edurant®	Janssen-Cilag	Comprimidos 25 mg
Inhibidores de la integrasa (INI)			
Dolutegravir (DTG)	Tivicay®	Viiv Healthcare UK Limited	Comprimidos 50 mg
Elvitegravir (EVG)	Vitekta®	Gilead Sciences	Comprimidos 85 mg
Raltegravir (RAL)	Isentress®	Merck Sharp And Dohme Ltd.	Comprimidos masticables 25 y 100 mg Comprimidos 400 mg
Inhibidores de la proteasa (IP)			
Saquinavir (SQV)	Invirase®	Roche	Cápsulas 200 mg Comprimidos 500 mg
Ritonavir (RTV)	Norvir®, genéricos	Abbvie	Cápsulas 100 mg Comprimidos 100 mg Solución oral 80 mg/mL
Sulfato de Indinavir (IDV)	Crixivan®	Merck Sharp And Dohme Ltd.	Cápsulas 200 y 400 mg
Lopinavir (LPV)/ritonavir	Kaletra®, genéricos	Abbvie	Cápsulas blandas 133,3/33,3 mg Comprimidos 200/50 mg, 100/25 mg Solución oral 400/100mg/5 ml
Sulfato de Atazanavir (ATV)	Reyataz®	Bristol Myers Squibb	Cápsulas 100, 150, 200, 300 mg
Fosamprenavir (FPV o fAPV)	Lexiva® (FDA), Telzir® (UE)	Viiv Healthcare	Comprimidos 700 mg Suspensión oral 50 mg/ml
Tipranavir (TPV)	Aptivus®	Boehringer Ingelheim	Cápsulas 200 mg Solución oral 100 mg/ml

Etanolato de Darunavir (DRV)	Prezista®	Janssen-Cilag	Comprimidos 75, 150, 400, 600 y 800 mg Suspensión oral 100 mg/ml
Combinaciones			
TDF+FTC	Truvada®	Gilead Sciences	Comprimidos (TDF 245 mg + FTC 200 mg)
TDF+FTC+EFV	Atripla®	Gilead Sciences	Comprimidos (TDF 300 mg + FTC 200 mg + EFV 600 mg)
TDF+FTC+RPV	Complera® (FDA), Eviplera® (UE)	Gilead Sciences	Comprimidos (TDF 300 mg + FTC 200 mg + RPV 25 mg)
TDF+FTC+EVG+COBI	Stribild®	Gilead Sciences	Comprimidos (TDF 245 mg + FTC 200 mg + EVG 150 mg + COBI 150 mg)
AZT+3TC	Combivir®, genéricos	ViiV Healthcare UK Limited	Comprimidos (AZT 300 mg + 3TC 150 mg)
AZT+3TC+ABC	Trizivir®, genéricos	ViiV Healthcare UK Limited	Comprimidos (AZT 300 mg + 3TC 150 mg + ABC 300 mg)
3TC+ABC	Kivexa®	ViiV Healthcare UK Limited	Comprimidos (3TC 300 mg + ABC 600 mg)
3TC+ABC+DTG	Triumeq®	ViiV Healthcare UK Limited	Comprimidos (3TC 300 mg + ABC 600 mg +DTG 50 mg)

Los fármacos antirretrovirales administrados individualmente no suprimen la infección por VIH a largo plazo, por lo que deben usarse en combinaciones. Las denominadas pautas preferentes son aquellas avaladas por un número elevado de ensayos clínicos con eficacia y durabilidad óptimas, tolerancia aceptable y fáciles de usar. Generalmente, los regímenes típicos iniciales de la denominada terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) consisten en combinaciones

de tres fármacos, que incluyen dos ITIAN (TDF y FTC, o ABC y 3TC) asociados a un INI, un ITINAN o un IP con un potenciador farmacocinético (cobicistat o ritonavir) (Tabla 2). Con estas combinaciones se puede conseguir una carga viral plasmática inferior a 50 copias/ml, en más del 75 % de los casos, a las 48 semanas (34).

Tabla 2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales recomendadas en pacientes que inician el tratamiento anti-VIH, según GeSIDA (2015).

Pautas preferentes	
3^{er} fármaco	Combinaciones
INI	ABC+3TC+DTG
	TDF+FTC+DTG
	TDF+FTC+RAL
Pautas alternativas	
3^{er} fármaco	Combinaciones
INI	TDF+FTC+EVG+COBI
	ABC+3TC+RAL
ITINAN	TDF+FTC+NVP
	TDF+FTC+EFV
	ABC+3TC+EFV
	TDF+FTC+RPV
IP/r	TDF+FTC+ATV/r o ATV/COBI
	ABC+3TC+ATV/r o ATV/COBI
	TDF+FTC+DRV/r o DRV/COBI

ABC: Abacavir; 3TC: Lamivudina; DTG: Dolutegravir; TDF: Tenofovir; FTC: Emtricitabina; RAL: Raltegravir; EVG: Elvitegravir; COBI: Cobicistat; NVP: Nevirapina; EFV: Efavirenz; RPV: Rilpivirina; ATV: Atazanavir; r: ritonavir; DRV: Darunavir.

Las pautas preferentes son aquellas que, en ensayos clínicos aleatorizados, han mostrado una eficacia superior frente a otras y que presentan un bajo riesgo de interacciones farmacológicas. Sin embargo, las pautas alternativas, aun siendo también eficaces, no se consideran preferentes bien porque su eficacia ha resultado inferior a las pautas preferentes o porque tienen desventajas potenciales o restricciones en su indicación.

La elección entre un INI, un ITINAN o un IP como tercer fármaco debe individualizarse en cada paciente, teniendo en cuenta sus preferencias (vía de administración y pauta posológica), comorbilidades, medicación concomitante, eficacia del tratamiento, barrera genética a la resistencia, perfil de efectos adversos y potenciales interacciones farmacológicas.

Los INI son los fármacos de elección, ya que presentan alta eficacia virológica, buena tolerabilidad, un perfil de seguridad favorable y ausencia de interacciones significativas con otros medicamentos (36). Respecto a los fármacos utilizados como alternativos en el tratamiento antirretroviral, se ha observado que tanto los regímenes basados en ITINAN como los basados en IP presentan potencia virológica y durabilidad. Sin embargo, los IP muestran anomalías metabólicas, tales como dislipidemias y resistencia a la insulina, mientras que los ITINAN no alteran los niveles de lípidos e, incluso, pueden tener un efecto beneficioso sobre algún componente lipídico, particularmente sobre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (37,38). En pacientes tratados con IP que presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa o dislipidemias se recomienda sustituir el IP por EFV o NVP, siendo recomendable NVP en el caso de las dislipidemias (39). Sin embargo, a pesar de las ventajas de los ITINAN, estos fármacos muestran baja barrera genética para el desarrollo de resistencias, especialmente en pacientes con adherencia subóptima.

4. Nevirapina

La nevirapina (NVP) es una dipiridodiazepinona (11-ciclopropil-5,11-dihidro-4-metil-6H-dipirido [3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona) de bajo peso molecular. Es un compuesto lipófilo ($\log P = 2,05$ en octanol/agua), poco soluble en agua (0,1 mg/ml) y cuya solubilidad depende del pH, ya que es una base débil ($pK_a = 2,8$). La NVP es muy soluble a $pH < 3$, pero su solubilidad disminuye hasta aproximadamente 0,1 mg/ml a pH neutro. A pH fisiológico, la NVP se encuentra esencialmente en forma no ionizada (40,41).

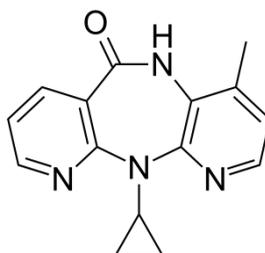


Figura 5. Estructura química de la nevirapina.

La NVP pertenece al grupo de los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINAN) y actúa inhibiendo de forma no competitiva la transcripta inversa del VIH-1, pero no la del VIH-2 debido a su estructura diferente (42). Actualmente, existen cinco fármacos comercializados pertenecientes al grupo ITINAN (Tabla 3), pero sólo tres de ellos se encuentran presentes en las combinaciones recomendadas para el tratamiento de inicio anti-VIH: NVP, EFV y RPV.

Tabla 3. ITINAN aprobados por la UE y/o por la FDA.

Nombre genérico	Fecha de aprobación por la UE	Fecha de aprobación por la FDA
NVP	5/2/1998 21/9/2011 (XR)	21/6/1996 25/3/2011 (XR)
DLV	---	4/4/1997
EFV	28/5/1999	17/9/1998
ETR	28/8/2008	18/1/2008
RPV	28/11/2011	20/5/2011

NVP: Nevirapina; DLV: Delavirdina; EFV: Efavirenz; ETR: Etravirina; RPV: Rilpivirina.

En general, se recomienda el uso de EFV frente a RPV y NVP debido al mayor número de ensayos y experimentos existentes; sin embargo, los efectos adversos relacionados con el sistema nervioso central hacen menos tolerables los regímenes basados en EFV. RPV tiene menos efectos adversos que EFV y un perfil lipídico más favorable; no obstante, presenta menor eficacia virológica en pacientes con una carga viral plasmática elevada (> 100.000 copias/ml) y un recuento de CD4+ bajo (< 200 células/mm³) (43). Por último, no se han encontrado diferencias en la eficacia de EFV y NVP asociándose NVP con una mayor toxicidad (44). Sin embargo, debido a que EFV presenta efectos teratógenos (categoría D) y que RPV carece de estudios sobre su uso durante el embarazo (categoría B) (45), NVP es el ITINAN de elección en mujeres embarazadas, con amplia experiencia probada durante la gestación, sin observarse una mayor aparición de efectos adversos en mujeres gestantes. Además, se ha descrito un mayor riesgo de hepatotoxicidad en aquellas mujeres con niveles de linfocitos T CD4+ superiores a 250 células/ μ l que no tomaban NVP antes del inicio de la gestación, sobre todo en aquellas con coinfección por el virus de la hepatitis B o C (46). NVP y EFV poseen resistencia

cruzada, es decir, una única mutación de resistencia a uno de estos dos fármacos causa resistencia al otro fármaco. Esto es debido a que ambos ITINAN tienen distinta estructura química pero el mismo mecanismo de acción (47).

Las principales reacciones adversas de la NVP tienen lugar a nivel hepático y cutáneo, y se requiere una monitorización estrecha al inicio del tratamiento con este fármaco. Las reacciones hepáticas que puede producir la NVP son aumento de las transaminasas y hepatitis aguda. Por ello, se debe prestar una especial atención a los pacientes con hepatopatía crónica y transaminasas elevadas (si están por encima de cinco veces el límite superior de la normalidad, la NVP está totalmente contraindicada). En mujeres con recuento de linfocitos CD4+ > 250 células/ μ l, y en varones con linfocitos CD4+ > 400 células/ μ l, se desaconseja la NVP debido a una mayor frecuencia de eventos hepáticos en comparación con otros antirretrovirales. Entre las reacciones adversas cutáneas, el exantema es la más frecuente, aunque también se han descrito otras como el síndrome de Stevens-Johnson o la necrólisis epidérmica clásica, que pueden suponer un peligro para la vida del paciente.

Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de la NVP en humanos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la nevirapina en humanos.

	NEVIRAPINA
Dosis	200 mg QD x 14 días seguido de 200 mg BID
F	> 90 %
C_{máx}	2 µg/ml (DU de 200 mg)
T_{máx}	4 horas
CL	1,5 L/h (DU); 3,3 L/h (DM)
Vd	1,2 L/kg
Unión a proteínas plasmáticas	62 %
Niveles de LCR	45 % de la concentración plasmática
t_{1/2}	45 horas (DU); 25-30 horas (DM)
Metabolización	Hepática CYP450 (Inducción)
Excreción	Renal 80 %. Heces 10 %
Cl₅₀	0,0026-0,026 µg/ml (0,01-0,1 µM)

QD: Pauta de tratamiento administrada una vez al día; BID: Pauta de tratamiento administrada dos veces al día; F: Biodisponibilidad; T_{máx}: Tiempo al que se alcanza la concentración máxima (C_{máx}); CL: aclaramiento plasmático aparente; DU: Dosis única; DM: Dosis múltiples; Vd: Volumen de distribución aparente; LCR: Líquido cefalorraquídeo; t_{1/2}: tiempo de vida media; CYP450: citocromo P450; Cl₅₀: Concentración inhibitoria del 50 %.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) clasifica a la NVP como un compuesto de Clase II, debido a su baja solubilidad y alta permeabilidad intestinal (48). De hecho, su biodisponibilidad oral es superior al 90 % (49). Su régimen de dosificación habitual consiste en 200 mg administrados una vez al día durante 14 días, seguidos de 200 mg administrados dos veces al día o 400 mg una vez al día en el caso de los comprimidos de liberación prolongada. Después de varias dosis, las concentraciones máximas de NVP aumentan linealmente en el intervalo de dosis de 200-400 mg/día (50). En un estudio realizado con 20 pacientes infectados por el VIH y administrados con 200 mg de NVP dos veces al día, se obtuvieron concentraciones plasmáticas máximas

($C_{m\acute{a}x}$) y mínimas ($C_{m\acute{i}n}$) en estado estacionario de 5,74 $\mu\text{g/ml}$ y 3,73 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y un área bajo la curva (AUC) de 109 $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ (51).

La NVP se distribuye ampliamente en los tejidos, atraviesa la placenta y también accede a la leche materna. El volumen de distribución (Vd) es de, aproximadamente, 1,21 L/kg y la unión a proteínas plasmáticas es de, aproximadamente, un 60 %. Las concentraciones en líquido cefalorraquídeo representan el 45 % de las concentraciones en plasma; esta proporción es semejante a la fracción no unida a proteínas plasmáticas (52).

Tanto en humanos como en otros animales de experimentación (rata, ratón, conejo, perro y chimpancé), la NVP sufre biotransformación hepática por el citocromo P450 (CYP450) a varios metabolitos hidroxilados: 2-, 3-, 8- y 12-hidroxinevirapina (2-, 3-, 8- y 12-OH-NVP), seguido de glucuronidación (53) (Figura 6). El metabolito 2-OH-NVP es formado exclusivamente por la subfamilia CYP3A, predominantemente por la isoenzima 3A4. La isoforma CYP2B6 es la encargada de la formación del metabolito 3-OH-NVP, mientras que la formación del metabolito 8-OH-NVP es debida a múltiples enzimas (CYP3A4, CYP2B6 y CYP2D6). Respecto al metabolito 12-OH-NVP, el CYP3A4 es el principal responsable de su formación, sin embargo se ha descrito la posibilidad de que CYP2D6 y CYP2C9 también pudieran estar implicados. Tanto en ensayos realizados con microsomas hepáticos humanos como con microsomas hepáticos de ratas, el metabolito mayoritario es el 12-OH-NVP y el minoritario el 8-OH-NVP (54). La excreción es principalmente por vía renal en forma de metabolitos glucurnicos. Menos del 3 % de la dosis administrada se elimina en orina como fármaco inalterado. En humanos, los principales metabolitos identificados en la orina son los siguientes: 2-OH-NVP glucurónico (18,6 %), 3-OH-NVP glucurónico (25,7 %), 12-OH-NVP glucurónico (23,7 %), 8-

OH-NVP glucurónido (1,3 %), 3-OH-NVP (1,2 %), 12-OH-NVP (0,6 %) y 4-carboxinevirapina (2,4 %) (50). En ratas, ratones, conejos, perros, monos y chimpancés las proporciones son distintas (53).

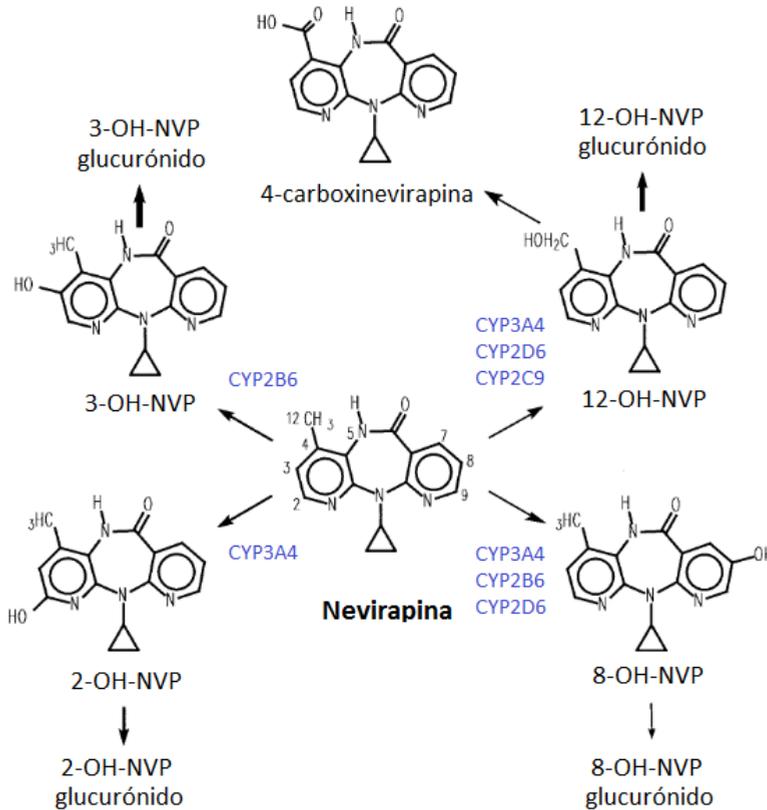


Figura 6. Ruta metabólica de la nevirapina.

La NVP es sustrato e inductor enzimático del CYP450, lo que provoca un aumento de su propio metabolismo y múltiples interacciones fármaco-fármaco. Así, sustancias que son sustratos de algunas de las isoformas del CYP450 que intervienen en el metabolismo de la NVP son susceptibles de reducir sus niveles. Por ejemplo, el ketoconazol es un fármaco sustrato de CYP2B6 y

CYP3A4 que sufre una reducción en sus valores de AUC y $C_{m\acute{a}x}$ en estado estacionario de un 63 % y 40 %, respectivamente, cuando se administra con NVP (55). Del mismo modo, la metadona y anticonceptivos orales esteroides como etinilestradiol/noretindrona sufren una reducción de sus niveles plasmáticos cuando se administran con NVP (56,57). Sin embargo, los fármacos que inducen estas isoenzimas pueden reducir las concentraciones plasmáticas de NVP. Por ejemplo, rifampicina y rifabutina, dos inductores potentes del CYP3A, causan reducciones significativas de las concentraciones plasmáticas de NVP (54). La hierba de San Juan es otro inductor del CYP3A4 que disminuye los niveles de NVP cuando se administran de forma concomitante (58). Por el contrario, fármacos que posean una actividad inhibidora sobre alguna isoenzima del CYP450, como el fluconazol, provocarán un aumento sobre los niveles de NVP, lo que lleva a la aparición de más reacciones adversas (59). Las variaciones en los niveles plasmáticos de NVP pueden afectar a la eficacia, la resistencia viral y a la toxicidad del propio fármaco (60-63).

Existen diferencias significativas entre los niveles plasmáticos y la farmacocinética de la NVP obtenidos en hombres y en mujeres. La Porte *et al.* (64) estimó una concentración plasmática media de NVP 22 % mayor en mujeres que en hombres y un aclaramiento un 25 % menor en mujeres en comparación con los hombres. Regazzi *et al.* (65) confirmó estas diferencias obteniendo valores de $C_{m\acute{a}x}$ un 44 % mayor en las mujeres. Por otro lado, la farmacocinética de NVP no parece cambiar con la edad (intervalo 18-68 años), aunque no ha sido investigada de forma específica en pacientes mayores de 65. Sin embargo, las concentraciones de NVP se asocian significativamente con la raza, siendo mayores (39 %) en pacientes negros que en blancos (66).

5. Nortriptilina

La nortriptilina (NT) es un antidepresivo tricíclico (ATC) de segunda generación que actúa inhibiendo la recaptación de neurotransmisores, principalmente de la norepinefrina y, en menor medida, la serotonina, aumentando la concentración en la hendidura sináptica de estos neurotransmisores. Es un compuesto ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol y en diclorometano. Es una base fuerte ($pK_a = 10,5$) y su estructura química se muestra en la Figura 7.

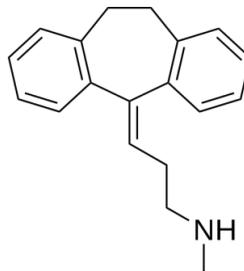


Figura 7. Estructura química de la nortriptilina.

Las principales indicaciones de la NT comprenden los tratamientos de: la depresión mayor, la enfermedad bipolar de tipo depresivo, la distimia y las depresiones atípicas. También se emplea en el tratamiento de la incontinencia nocturna en niños (67), el déficit de atención e hiperactividad en niños (68), los ataques de pánico (69), el síndrome de intestino irritable (70), la profilaxis de la migraña (71) y el tratamiento del dolor neuropático (72). En general, el tratamiento de elección para la depresión son los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) ya que producen menos efectos adversos que los ATCs. Sin embargo, no se han observado diferencias clínicamente significativas entre la eficacia de los ISRS y de los ATCs en el tratamiento de la

depresión (73-75). Además, ambos grupos de antidepresivos son eficaces en pacientes depresivos VIH-positivos sin afectar a su estado inmune (76). Por otro lado, la NT ha demostrado propiedades farmacológicas superiores y menor toxicidad que otros ATCs (77).

Las características farmacocinéticas de la NT en humanos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Propiedades farmacocinéticas de la nortriptilina en humanos.

	NORTRIPTILINA
Dosis	25 mg 3 o 4 veces al día
F	51 %
T_{máx}	5 horas
CL	31 L/h
Vd	21 L/kg
Unión a proteínas plasmáticas	93 %
t_{1/2}	26 horas
Metabolización	Hepática CYP450
Excreción	Renal

F: Biodisponibilidad; T_{máx}: Tiempo al que se alcanza la concentración máxima; CL: aclaramiento plasmático aparente; Vd: Volumen de distribución aparente; t_{1/2}: tiempo de vida media; CYP450: citocromo P450.

La NT está comercializada como nortriptilina clorhidrato. La dosis habitual en adultos es de 25 mg 3 o 4 veces al día y su biodisponibilidad oral es del 51 %. La NT se absorbe por vía oral, alcanzando niveles plasmáticos máximos tras aproximadamente 5 horas y su semivida plasmática es de, aproximadamente, 26 horas. Las concentraciones plasmáticas de NT que dan lugar a una respuesta terapéutica óptima para conseguir el efecto antidepresivo se encuentran en el intervalo de concentración de 50-150 ng/ml (78).

La NT se distribuye ampliamente en los tejidos, atraviesa la placenta y también accede a la leche materna, con una unión a proteínas plasmáticas del 93 %.

La principal ruta metabólica implicada en el metabolismo de la NT es la hidroxilación a E-10-hidroxinortriptilina (79). Rutas minoritarias son la N-desmetilación y la 10-hidroxilación al isómero Z de 10-hidroxinortriptilina. La E-10-hidroxilación es mediada principalmente por la isoforma 2D6 del CYP450 (CYP2D6), aunque se ha descrito que el CYP3A4 también podría estar implicado (80) (Figura 8). La implicación del CYP3A4 en el metabolismo de la NT parece muy probable ya que se han descrito casos en los que se ha observado un aumento de su metabolismo al coadministrarse con fármacos inductores del CYP3A4, como pentobarbital, carbamacepina y rifampicina (81-84), y casos en los que se ha descrito la inhibición de su metabolismo por fármacos inhibidores del CYP3A4, como fluconazol y cimetidina (85,86). Respecto a la N-desmetilación, la principal isoenzima responsable es también la 2D6, aunque parece ser que las isoformas 1A2 y la 2C19 también podrían estar implicadas (80).

La excreción de la NT se produce mayoritariamente con la orina en forma de metabolitos, eliminándose sólo el 2 % como fármaco inalterado.

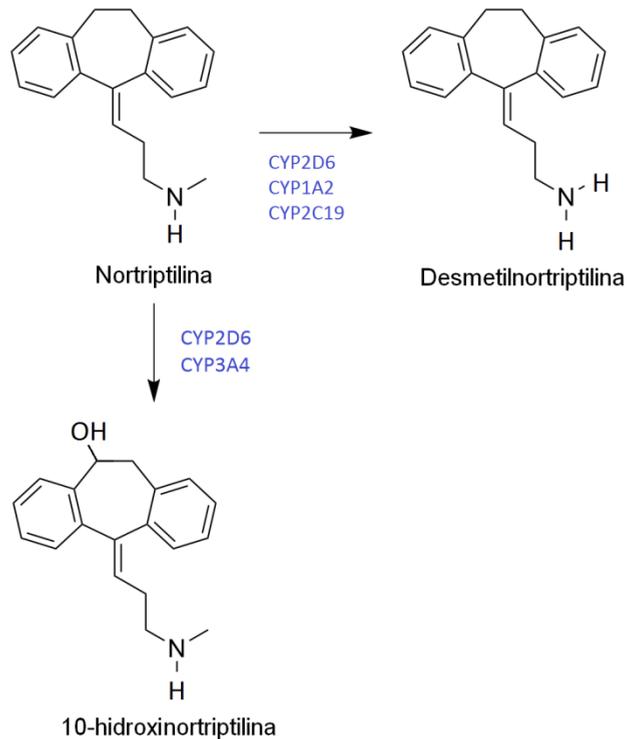


Figura 8. Ruta metabólica de la nortriptylina.

La NT es sustrato e inhibidor débil de CYP2D6, siendo uno de los ATCs que menos interacciones produce. Sin embargo, se han descrito algunas interacciones clínicamente significativas entre NT y otros fármacos. Terapias concomitantes con fármacos que inhiben el CYP2D6, tales como terbinafina, fluoxetina, norfluoxetina, sertralina y paroxetina, provocan un aumento de las concentraciones de NT debido a la disminución de su aclaramiento, mientras que el volumen de distribución no se ve afectado (87-89). Por otra parte, las concentraciones plasmáticas de otros fármacos pueden verse afectadas por la coadministración de NT, como sucede en el caso de la clorpromacina, cuyas concentraciones plasmáticas aumentan en presencia de NT como consecuencia de una disminución en el aclaramiento (90).

La NT inhibe ligeramente el CYP2C9 ($IC_{50} = 600 \mu M$), pudiendo incrementar los niveles plasmáticos de fármacos metabolizados por esta isoenzima, como es el caso de la fenitoína (91).

Hasta el momento, no se ha descrito ninguna interacción entre NT y el fármaco antirretroviral NVP.

Los efectos adversos más comunes asociados al uso de la NT son los efectos de tipo anticolinérgico tales como sequedad de boca, sedación, estreñimiento y aumento del apetito, retención urinaria, visión borrosa, trastornos de la acomodación, glaucoma e hipertermia. La NT ha sido considerada por la FDA como fármaco perteneciente a la categoría D de medicamentos de riesgo durante el embarazo. Algunos estudios controlados y observacionales realizados en mujeres embarazadas han mostrado un cierto riesgo para el feto, aunque puede aceptarse su uso en aquellos casos en los que se considere que el beneficio sea mayor que el riesgo para el feto (92).

6. Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina

6.1. Sertralina

La sertralina (SRT) es un potente inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS) comercializado inicialmente para en el tratamiento de la depresión. Posteriormente, se aprobó su uso en el tratamiento de los ataques de pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo y el trastorno por estrés post-traumático (93). También, se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la fobia

social (94), el desorden disfórico premenstrual (95) y en el tratamiento del hipo (96).

La SRT (Figura 9) es una base fuerte, con pKa 9,5, comercializada en forma de sal clorhidrato. Es un compuesto poco soluble en agua (aproximadamente 3 mg/ml), etanol y alcohol isopropílico.

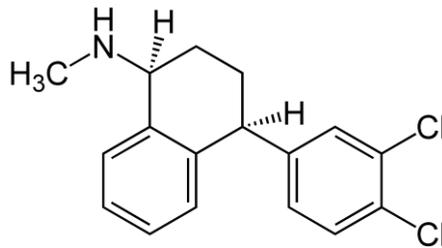


Figura 9. Estructura química de la sertralina.

La dosis terapéutica inicial de SRT es de 50 mg/día administrada, generalmente, como dosis única. A diferencia de otros ISRS, no es necesario modificar la dosis de SRT en los ancianos (97). La biodisponibilidad oral de la SRT es del 54 %. Su farmacocinética es lineal en las dosis comprendidas entre 50 y 200 mg. Tras la administración oral de una dosis de 100 mg, se alcanza un valor de $C_{m\acute{a}x}$ de 20-55 ng/ml a las 4-8 horas. Por otra parte, la ingesta de alimentos aumenta ligeramente la biodisponibilidad y un 25 % el valor de $C_{m\acute{a}x}$ (98).

La SRT se distribuye extensamente en los tejidos ($V_d > 20$ L/kg) y se encuentra unida a proteínas plasmáticas en un 95 % (98), alcanzándose niveles muy bajos en la leche materna (99).

La SRT se metaboliza principalmente en el hígado a N-desmetilsertralina, que posee una actividad farmacológica muy inferior. La semivida de eliminación de la SRT es de 26-32 horas y la del metabolito N-desmetilsertralina es de 66–80

horas (100,101). Las enzimas hepáticas responsables de la biotransformación de la SRT a su metabolito N-desmetilsertralina son: CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, y CYP3A4 (102,103). Por lo tanto, los niveles plasmáticos de SRT pueden verse aumentados si se coadministran fármacos que inhiban estas isoformas del CYP450 (103). Por otra parte, la SRT es un inhibidor moderado de las isoenzimas 2D6 y 2B6 (104,105) y, por lo tanto, puede dar lugar a un incremento en los niveles plasmáticos de fármacos que sean sustratos de 2D6, como desipramina, imipramina y desimipramina (106,107), o fármacos que sean sustratos de 2B6, como la metadona (108). Hasta el momento no se ha descrito ninguna interacción entre NVP y SRT.

La SRT se excreta, en forma de metabolitos, en orina y en heces. Sólo una pequeña proporción (0,2 %) se excreta en la orina como fármaco inalterado.

La FDA clasifica a la SRT en la categoría C de medicamentos de riesgo durante el embarazo y solo se recomienda su uso cuando los beneficios potenciales justifican los posibles riesgos para el feto. Los efectos secundarios asociados con el uso de SRT más comunes son: molestias gastrointestinales (náuseas, diarrea, dispepsia), temblor, vértigo, insomnio, somnolencia, aumento de la sudoración, sequedad de boca y disfunción sexual masculina.

6.2. Fluoxetina

La fluoxetina (FLUOX) es un ISRS que, a diferencia de los otros ISRS, aumenta los niveles de norepinefrina y dopamina, así como de serotonina, en la corteza prefrontal (109). Fue descubierta en 1974 y aprobada por la FDA para el tratamiento de la depresión, como fluoxetina clorhidrato (Prozac®), en 1987.

Desde entonces, Prozac® ha sido el antidepresivo más prescrito en todo el mundo y está indicado principalmente en el tratamiento de episodios depresivos mayores, el trastorno obsesivo-compulsivo y la bulimia nerviosa principalmente (110). Además, algunos autores consideran que la FLUOX es efectiva en el tratamiento de la obesidad, el trastorno de ansiedad, el alcoholismo, el estrés post-traumático, la fobia social y el trastorno disfórico premenstrual (110,111). Por otra parte, es el único tratamiento psicofarmacológico cuyo uso está aprobado en niños (112).

La FLUOX clorhidrato es un compuesto altamente soluble en metanol y etanol, soluble en acetona, acetonitrilo y cloroformo, y ligeramente soluble en agua. Su máxima solubilidad en agua es de 14 mg/ml (113). La FLUOX es una base fuerte ($pK_a = 9,1$) cuya estructura química se muestra en la Figura 10.

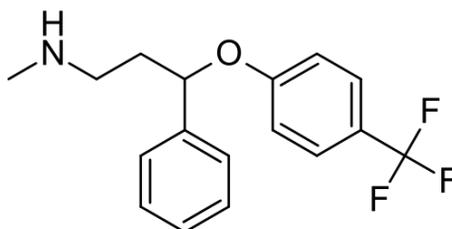


Figura 10. Estructura química de la fluoxetina.

Generalmente, la dosis recomendada de FLUOX es de 20 mg/día, sin embargo, en el tratamiento de la bulimia nerviosa se recomiendan 60 mg/día. La FLUOX se absorbe por vía oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 15-55 ng/ml a las 6-8 horas de una administración de 40 mg (114). Debido al metabolismo de primer paso, la biodisponibilidad oral de la FLUOX es del 60-80 % (115).

La FLUOX se distribuye ampliamente en los tejidos y es capaz de acceder a la leche materna, alcanzando concentraciones que representan el 20-30 % de la concentración plasmática (116). Su Vd es, aproximadamente, de 20- 42 L/Kg y se une a las proteínas plasmáticas en un 94 % (117).

La FLUOX sufre N-desmetilación y se transforma en norfluoxetina, que presenta mayor semivida (1-3 días y 7-15 días, respectivamente) y potencia similar a la FLUOX (118). Múltiples isoformas del CYP450 están involucradas en su metabolismo, sin embargo, su principal metabolito (norfluoxetina) es producido por el CYP2D6 (119). Varios estudios han mostrado que FLUOX y norfluoxetina inhiben las isoenzimas CYP2D6, CYP3A4 y CYP2C19 (120), provocando un incremento en los niveles plasmáticos de algunos fármacos como desipramina (sustrato de 2D6) y lansoprazol (sustrato de 2C19 y 3A4) (121,122). Por otra parte, se ha descrito una interacción farmacocinética entre FLUOX y NVP, en la que los niveles de FLUOX y norfluoxetina se reducen significativamente (123).

La excreción de FLUOX se produce mayoritariamente con la orina (80 %), mientras que un 15 % es excretado con las heces. Aproximadamente un 11 % es excretada como fluoxetina, un 7 % como norfluoxetina, y un 7 % y un 8 % como fluoxetina y norfluoxetina glucurónidos, respectivamente. Finalmente, más de un 20 % es excretado en orina como ácido hipúrico, una glicina conjugada del ácido benzoico (124).

Los efectos adversos más comunes asociados al uso de la FLUOX son cefalea, náuseas, insomnio, fatiga y diarrea. La FLUOX se clasifica dentro de la categoría C de riesgo en el embarazo.

6.3. Fluvoxamina

La fluvoxamina (FLUVOX) es un ISRS de segunda generación. Aunque originalmente se desarrolló como un antidepresivo, su aplicación más extendida es en el tratamiento de trastornos de ansiedad, particularmente en el trastorno obsesivo-compulsivo (125). Otras indicaciones terapéuticas de ese fármaco son el tratamiento de los ataques de pánico, el trastorno por estrés post-traumático y la fobia social (126).

La FLUVOX (Figura 11) es una base fuerte ($pK_a = 8,7$) comercializada como FLUVOX maleato. Dicho compuesto es escasamente soluble en agua (0,007 mg/ml), soluble en etanol y cloroformo y prácticamente insoluble en éter dietílico.

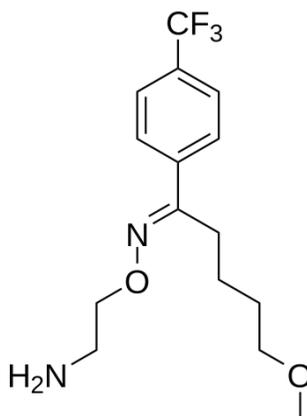


Figura 11. Estructura química de la fluvoxamina.

La dosis recomendada de FLUVOX se sitúa entre 100 mg y 300 mg al día. Sin embargo, los pacientes deben empezar el tratamiento con 50 mg/día. Después de su administración oral, todo el fármaco es prácticamente absorbido por el tracto gastrointestinal y su absorción no se ve afectada por la presencia de

alimentos. A pesar de su completa absorción, la biodisponibilidad oral es aproximadamente del 50 % debido al efecto de primer paso hepático. Cuando la FLUVOX es formulada en comprimidos recubiertos con película o en cápsulas, las concentraciones máximas (31-87 µg/ml) se alcanzan entre las 2 y las 8 horas posteriores a la administración. Sin embargo, en el caso de comprimidos con recubrimiento entérico, las concentraciones máximas se alcanzan entre las 4 y las 12 horas (127).

La FLUVOX se distribuye extensamente en los tejidos ($V_d = 25$ L/kg) y presenta una menor unión a proteínas plasmáticas que otros ISRS (77 %). Algunos estudios han mostrado que la excreción de este fármaco en leche materna es mínima (128).

La FLUVOX sufre oxidación hepática, dando lugar a nueve metabolitos farmacológicamente inactivos. Las principales isoenzimas del CYP450 involucradas en el metabolismo de la FLUVOX son CYP2D6 y CYP1A2 (129). A diferencia de otros ISRS, la FLUVOX es un inhibidor débil del CYP2D6, por lo que se considera que las interacciones con otros fármacos metabolizados por esta isoenzima, como los antipsicóticos, son poco probables. Sin embargo, la FLUVOX es un inhibidor moderado del CYP2C19 y del CYP3A4, y un inhibidor fuerte del CYP1A2, pudiendo prolongar la eliminación de fármacos metabolizados por esas isoenzimas, tales como warfarina, teofilina y algunas benzodiazepinas (126,130).

Se ha descrito la existencia de una interacción farmacocinética entre FLUVOX y NVP, dando lugar a una reducción del aclaramiento oral de NVP y, en consecuencia, a un incremento en sus concentraciones. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en la concentración de FLUVOX (123).

El fármaco se excreta con la orina, predominantemente en forma de metabolitos, siendo la proporción de compuesto original inferior al 4 %. La semivida de eliminación de la FLUVOX es de 12 a 15 horas tras su administración por vía oral (127).

La FLUVOX es, en general, bien tolerada en todos los grupos de edad, desde niños (131) hasta ancianos (132), así como en pacientes con enfermedades cardiovasculares leves o epilepsia (133,134). Al igual que sucede con otros ISRS, las náuseas son el efecto adverso más común. Sin embargo, a diferencia de otros antidepresivos, la FLUVOX tiene una baja incidencia de disfunción sexual. La FLUVOX se clasifica dentro de la categoría C de riesgo en el embarazo.

OBJETIVOS

A pesar de la amplia utilización de NVP, se desconocen algunos aspectos de su absorción gastrointestinal y, aunque se han descrito interacciones farmacocinéticas con otros fármacos, algunas interacciones potenciales con fármacos de uso relativamente frecuente, como los antidepresivos, no han sido estudiadas. Por ello, los objetivos del estudio fueron:

1. Caracterizar la farmacocinética y biodisponibilidad de la NVP en la rata.
2. Evaluar la absorción de la NVP en distintos segmentos gastrointestinales de ratas con el fin de detectar posibles áreas de absorción mayoritaria.
3. Determinar potenciales interacciones farmacocinéticas con fármacos antidepresivos. Dentro de este objetivo general, los objetivos específicos fueron los siguientes:
 - Evaluar las modificaciones en los niveles plasmáticos y en los parámetros farmacocinéticos de la NVP y de la NT que pueden producirse como consecuencia de su administración conjunta, utilizando ratas como animales de experimentación.
 - Estudiar el efecto inhibitorio de distintos fármacos antidepresivos (NT, SRT, FLUOX y FLUVOX) sobre el metabolismo de la NVP utilizando microsomas hepáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Fármacos y reactivos

La nevirapina (NVP, Viramune®) fue suministrada por el laboratorio Boehringer Ingelheim (Barcelona, España). Los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP se obtuvieron de Toronto Research Chemicals (North York, Canada). El clorhidrato de nortriptilina (NT), el clorhidrato de fluoxetina (FLUOX), la carboximetilcelulosa (CMC), el dimetilsulfóxido (DMSO), la glucosa-6-Fosfato (G6P), la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (β -NADP⁺), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el cloruro magnésico (MgCl₂) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El reactivo 9H-fluoren-9-ylmethyl chloroformate (Fmoc-Cl) y el propilenglicol (PG) de Fluka (Madrid, España). La Sertralina (SRT, Aremis®) se obtuvo de Laboratorios Dr. Esteve (Barcelona, España) y la fluvoxamina maleato (FLUVOX) de TCI Europe N.V (Zwijndrecht, Bélgica). El resto de reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico.

2. Ensayos *in vivo*

2.1. Animales de experimentación

Todos los protocolos llevados a cabo en los estudios con animales fueron aprobados previamente por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (Ref. A1352991914316).

Los animales utilizados en el estudio fueron ratas albinas macho de raza Wistar, de entre 280 y 310 g de peso y de edad comprendida entre 2 y 3 meses. Todos los animales fueron suministrados por el animalario de la Facultad de Farmacia

de la Universidad de Valencia, donde fueron criados de acuerdo con las condiciones de alojamiento requeridas para estos animales: habitaciones limpias con una temperatura de 23 ± 1 °C, humedad relativa del 60 % y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar de laboratorio proporcionada por Harlan Laboratories Inc. (Barcelona, España) y tuvieron acceso a agua *ad libitum*.

El día anterior a la administración, los animales fueron canulados en la vena yugular con el fin de facilitar la toma de muestras sanguíneas y, en determinados grupos, la administración por vía intravenosa, utilizando la técnica descrita previamente (135). Además, a algunos grupos de animales se les canuló un segmento intestinal para posibilitar así la administración del fármaco según el procedimiento descrito previamente (136). Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (80 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg). Al finalizar los ensayos, los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico por vía intravenosa (100 mg/kg).

2.2. Grupos de ensayo

Teniendo en cuenta la vía de administración y el objetivo del estudio, los animales se clasificaron en 19 grupos de experimentación. Cada grupo estaba compuesto por un total de 4 a 6 animales.

2.2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina: Grupos 1-4

Se utilizaron 4 grupos de ratas para estudiar la farmacocinética y la biodisponibilidad de la NVP en la rata (Tabla 6).

Tabla 6. Grupos de ratas empleados para el estudio la farmacocinética y la biodisponibilidad de la NVP en la rata (n = 5-6).

Grupo	Vía de administración	Dosis (mg)	Anestesia
1	i.v.	4	No
2	p.o.	8	No
3	s.c.	4	No
4	i.v.	4	Sí

i.v.: intravenosa; p.o.: oral; s.c.: subcutánea.

A los animales del grupo 1 se les administró 0,5 ml de una solución de NVP de 8 mg/ml en dimetilsulfóxido/propilenglicol (DMSO/PG) (1/4, v/v), por vía intravenosa a través de la cánula implantada en la vena yugular (dosis = 4 mg). A los animales del grupo 2 se les administró 1 ml de una suspensión de NVP (8 mg/ml) en carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5 %, en agua destilada, mediante una sonda gástrica. A los animales del grupo 3 se les administró, por vía subcutánea en la zona lumbar, 0,5 ml de la misma solución de NVP empleada para la administración intravenosa (dosis = 4 mg).

Con el fin de evaluar el efecto de la anestesia en la farmacocinética del fármaco, se empleó un grupo adicional de ratas (grupo 4), que se mantuvieron anestesiadas durante la administración y el muestreo sanguíneo. Los resultados obtenidos en este grupo adicional se compararon con los obtenidos en las ratas administradas por la misma vía en ausencia de anestesia (grupo 1). La

información sobre el efecto de la anestesia en la farmacocinética de la NVP fue necesaria para facilitar la interpretación de los resultados obtenidos en el siguiente estudio.

Con posterioridad a la administración, se tomaron 9 muestras sanguíneas en los animales administrados por vía intravenosa (grupos 1 y 4), a los siguientes tiempos: 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. En el caso de los animales administrados por vía extravasal (grupos 2 y 3) se tomaron 8 muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos.

2.2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales: Grupos 5-10

Con el fin de estudiar la absorción de NVP en los diferentes segmentos gastrointestinales de la rata los animales se clasificaron en 6 grupos (Tabla 7).

Tabla 7. Grupos de ratas empleados para el estudio de la absorción de NVP en los distintos segmentos gastrointestinales de la rata (n = 4-6).

Grupo	Vía de administración	Dosis (mg)	Lugar de absorción
5	p.o.	8	Estómago
6	i.d.	8	Duodeno
7	i.i.	8	Íleon
8	i.c.	8	Colon
9	i.d.w.	8	Duodeno
10	i.d.w.n.	8	Duodeno

p.o.: oral; i.d.: intraduodenal; i.i.: intraileal; i.c.:intracolónica; i.d.w.: intraduodenal, duodeno lavado; i.d.w.n.: intraduodenal, duodeno lavado, colédoco no ligado.

En este estudio se emplearon animales anestesiados, a los que se les aisló, mediante las correspondientes ligaduras, distintos segmentos gastrointestinales, en los que se introdujo una suspensión de fármaco (1 ml de 8 mg/ml). Al final del periodo de muestreo de sangre, las ratas se sacrificaron y el estómago (grupo 5), o el segmento intestinal donde se administró la NVP (grupos 6-10), se extirpó para determinar la cantidad remanente de fármaco.

A los animales del grupo 5 se les ligó el píloro y la administración del fármaco se efectuó mediante sonda gástrica. En el caso de los animales del grupo 6, la suspensión de NVP se administró a través de una cánula insertada en una sección del duodeno. Dicha sección fue delimitada por dos ligaduras situadas en el píloro y a 15 cm del mismo. En los animales del grupo 7 la administración del fármaco se efectuó a través de una cánula implantada en un segmento de íleon, de 15 cm, delimitado por dos ligaduras. En el grupo 8, se ligó la válvula ileocecal de los animales y la NVP se administró a través de una cánula insertada en el colon.

Con el fin de evaluar la influencia de la bilis en la absorción de la NVP, se incluyeron dos grupos de animales adicionales (grupos 9 y 10). En ambos casos, antes de la administración de NVP en un segmento duodenal, se eliminó la bilis presente en el lumen intestinal mediante lavado con una solución salina. La diferencia entre ambos grupos estuvo en que a las ratas del grupo 9 se les ligó el colédoco.

Con posterioridad a las administraciones, se tomaron 6 muestras sanguíneas en cada uno de los animales a los 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos.

2.2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT: Grupos 11-19

Para estudiar la interacción entre NVP y NT las ratas se clasificaron en 9 grupos dependiendo de la vía de administración de ambos fármacos (Tabla 8). Para la administración de NVP por vía oral e intraduodenal se empleó una suspensión (8 mg/ml) en CMC al 0,5 %. En el caso de la administración por vía intravenosa se empleó una solución de 8 mg/ml en DMSO/PG (1/4, v/v). Por otra parte, la NT se administró en forma de solución (5 mg/ml) en agua destilada (vía oral o intraduodenal) o en suero fisiológico (vía intravenosa).

Tabla 8. Grupos de ratas empleados para el estudio de la interacción *in vivo* entre NVP y NT (n = 6).

Grupo	Dosis (mg) y vía de administración	
	NVP	NT
11	8, p.o.	--
12	8, p.o.	5, p.o.
13	8, i.d.	--
14	8, i.d.	5, i.d.
15	8, i.d.	2,5, i.v.
16	4, i.v.	--
17	4, i.v.	5, i.d.
18	--	5, i.d.
19	--	2,5, i.v.

p.o.: oral; i.d. intraduodenal; i.v.: intravenosa.

A los animales del grupo 11 (grupo control de NVP administrada por vía oral) se les administró 1 ml de agua y, 15 minutos más tarde, 1 ml de la suspensión de NVP (dosis = 8 mg) a través de una sonda gástrica. A los animales del grupo 12 se les administró 1 ml de la solución de NT (dosis = 5 mg) y, a los 15 minutos, 1 ml de la suspensión de NVP (dosis = 8 mg).

Con posterioridad a las administraciones, se tomaron 9 muestras sanguíneas en cada uno de los animales a los tiempos indicados en la Figura 12.

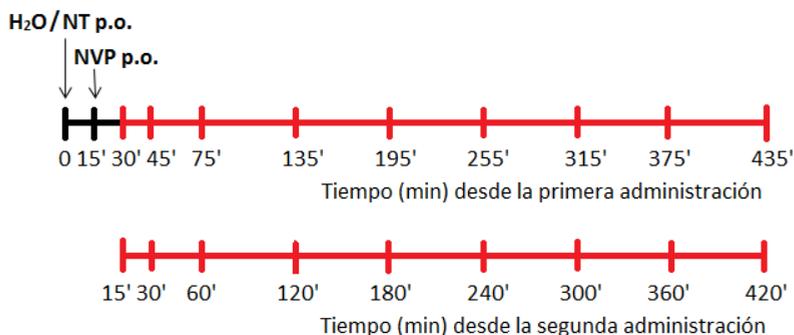


Figura 12. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 11 y 12.

En los grupos 13, 14 y 15 la administración de NVP fue por vía intraduodenal a través de una cánula implantada previamente en el duodeno. A los animales del grupo 13 (grupo control de NVP administrada por vía intraduodenal) se les administró 1 ml de agua y, 15 minutos más tarde, 1 ml de la suspensión de NVP (dosis = 8 mg). A los animales del grupo 14 se les administró por vía intraduodenal 1 ml de la solución de NT (dosis = 5 mg) y, a los 15 minutos, 1 ml de la suspensión de NVP (dosis = 8 mg).

Con posterioridad a las administraciones, se tomaron 9 muestras sanguíneas en cada uno de los animales a los tiempos indicados en la Figura 13.



Figura 13. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 13 y 14.

A los animales del grupo 15 se les administró 1 ml de la suspensión de NVP por vía intraduodenal (dosis = 8 mg) y, a los 15 minutos, 0,5 ml de la solución de NT por vía intravenosa (dosis = 2,5 mg).

Con posterioridad a las administraciones, se tomaron 9 muestras sanguíneas en cada uno de los animales a los tiempos indicados en la Figura 14.

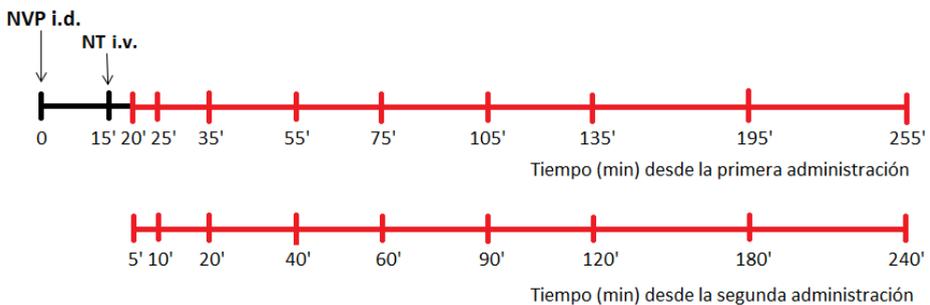


Figura 14. Tiempos de muestreo sanguíneo en el grupo 15.

En los animales de los grupos 16 y 17, la NVP fue administrada por vía intravenosa en forma de solución de 8 mg/ml. A los animales del grupo 16 (grupo control de NVP administrada por vía intravenosa) se les administró 1 ml

de agua por vía intraduodenal y, 15 minutos más tarde, 0,5 ml de la solución de NVP (dosis = 4 mg) a través de una cánula implantada en la vena yugular. A los animales del grupo 17 se les administró por vía intraduodenal 1 ml de la solución de NT (dosis = 5 mg) y, a los 15 minutos, 0,5 ml de la solución de NVP (dosis = 4 mg) por vía intravenosa.

Con posterioridad a las administraciones, se tomaron 9 muestras sanguíneas en cada uno de los animales a los tiempos indicados en la Figura 15.

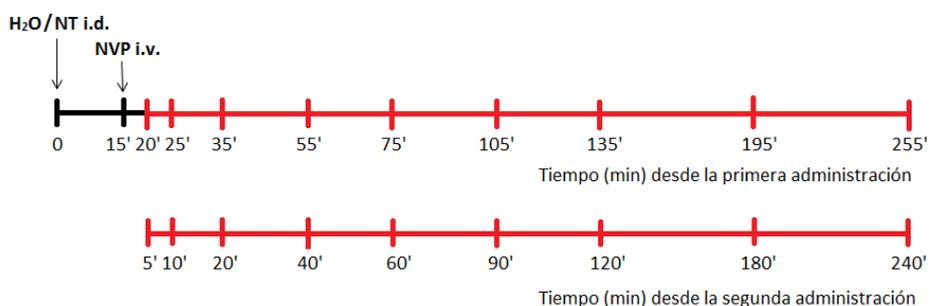


Figura 15. Tiempos de muestreo sanguíneo en los grupos 16 y 17.

Los grupos 18 y 19 se utilizaron como grupos control de NT y se compararon con los grupos 14, 15 y 17 con el fin de evaluar el efecto de la NVP en la farmacocinética de la NT. A los animales que pertenecían al grupo 18 se les administró por vía intraduodenal 1 ml de la solución de NT (dosis = 5 mg) y se tomaron muestras sanguíneas a los 30, 45, 75, 135, 195, 255 y 315 minutos. El grupo 19 fue administrado con 0,5 ml de la solución de NT (dosis = 2,5 mg) por vía intravenosa. Posteriormente, se tomaron 9 muestras sanguíneas a los 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos.

3. Ensayos *in vitro*

Para la realización de los ensayos *in vitro* se utilizaron microsomas hepáticos aislados de ratas Wistar y microsomas hepáticos provenientes de humanos. La evaluación de la cinética del metabolismo de la NVP y su inhibición por la NT y otros antidepresivos se realizó con microsomas hepáticos de rata. Los microsomas hepáticos humanos se emplearon únicamente para el estudio de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT.

3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata

Los microsomas utilizados en este estudio fueron obtenidos a partir de hígados de ratas Wistar. Para su preparación, se homogeneizó el hígado (4 °C) en una solución tampón de fosfato de sodio y potasio 50 mM (pH 7,4), que contenía cloruro potásico (KCl) (1,15 %, p/v), ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 2 mM y sacarosa 0,25 M. El homogenado de hígado se centrifugó a 9.000 g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó a 150.000 g durante 1 hora. El sedimento microsomal se resuspendió en una solución tampón de fosfato potásico 0,1 M (pH 7,4). La concentración de proteína microsomal se determinó utilizando el método de Lowry (137).

Con el fin de estudiar las cinéticas correspondientes a la velocidad de desaparición de la NVP y la velocidad de aparición de sus metabolitos, se efectuaron ensayos metabólicos con microsomas hepáticos de rata utilizando diversas concentraciones de NVP (sustrato). Los ensayos se llevaron a cabo en viales de vidrio en los que se evaporaron distintos volúmenes de una solución de NVP en metanol (50 o 100 µg/ml). Al residuo obtenido se adicionó:

microsomos hepáticos (equivalentes a 0,1 mg de proteína), 5 μ l de una solución de G6P en agua (20 mg/ml), 5 μ l de una solución de β -NADP⁺ en agua (20 mg/ml), 10 μ l de una solución de G6PDH en agua (10 U/ml) y 5 μ l de una solución de MgCl₂ en agua (13,4 mg/ml). El volumen final se ajustó a 0,1 ml añadiendo tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4), obteniéndose las siguientes concentraciones de NVP en la mezcla final: 2, 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 μ g/ml (7,51, 18,8, 37,6, 93,9, 188, 376, 563 y 751 μ M). Los viales se incubaron en un baño a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido el periodo de incubación, se introdujeron los viales en un baño de hielo y, seguidamente, se les adicionó 0,1 ml de una mezcla de ácido tricloroacético al 12 %/acetonitrilo (50/50, v/v) con el fin de detener las reacciones enzimáticas. Las muestras desproteinizadas se centrifugaron durante 5 minutos a 12.500 rpm y el sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación analítica de NVP y sus metabolitos.

3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomos hepáticos de rata

Los ensayos de inhibición del metabolismo de NVP por los fármacos antidepresivos NT, SRT, FLUOX y FLUVOX se efectuaron de forma similar a la descrita para el estudio de la cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos. La concentración de NVP en la mezcla final antes de incubar (0,1 ml) fue, en todos los casos, de 5 μ g/ml (18,8 μ M) y las concentraciones de los inhibidores ensayados fueron las siguientes: 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, 10, 20 y 50 μ g/ml. Al igual que en los ensayos anteriores, los viales se incubaron a 37 °C durante 30 minutos y, tras someterlos al proceso de desproteinización, se utilizó el sobrenadante para la determinación analítica de la NVP y sus metabolitos.

3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata

Con el fin de determinar el tipo de inhibición reversible (competitiva, no competitiva o acompetitiva) que la NT ejerce sobre la NVP, se llevaron a cabo ensayos adicionales con microsomas hepáticos de ratas. En estos ensayos, se utilizaron diferentes concentraciones de NVP (5, 10, 25, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y NT (0, 0,5, 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La incubación de los viales y el procesamiento posterior de su contenido fue similar al descrito en los ensayos anteriores.

Por otra parte, se realizaron estudios para determinar si la inhibición es tiempo-dependiente, es decir, si el efecto sobre la inhibición del metabolismo de la NVP aumenta como consecuencia de incrementar el tiempo de exposición del sistema enzimático al inhibidor. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de punto único (*Single point*) y de desplazamiento del valor IC_{50} (IC_{50} Shift). Los ensayos de desplazamiento de IC_{50} aportan más información que los ensayos de punto único y pueden utilizarse para predecir el riesgo de interacción farmacológica *in vivo*. Ambos tipos de ensayos se realizaron en dos fases que consistían, en primer lugar, en una preincubación de 30 minutos de duración de los microsomas en presencia de NT y, posteriormente, una incubación con NVP y un determinado volumen del preincubado durante 5 minutos.

Los experimentos de punto único se realizaron en viales de vidrio a los que se les adicionó: microsomas hepáticos (equivalentes a 1 mg de proteína), 5 μl de una solución de G6P en agua (20 mg/ml), 5 μl de una solución de $\beta\text{-NADP}^+$ en agua (20 mg/ml), 10 μl de una solución de G6PDH en agua (10 U/ml), 5 μl de una solución de MgCl_2 en agua (13,4 mg/ml) y una solución acuosa de NT (concentración final 87 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El volumen final se ajustó a 0,1 ml añadiendo tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Los viales se preincubaron en un baño a 37 °C

durante 30 minutos. En otro vial, se evaporaron 200 μl de una solución de NVP en metanol de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Al residuo obtenido se adicionó: 5 μl de una solución de G6P en agua (20 mg/ml), 5 μl de una solución de $\beta\text{-NADP}^+$ en agua (20 mg/ml), 10 μl de una solución de G6PDH en agua (10 U/ml), 5 μl de una solución de MgCl_2 en agua (13,4 mg/ml) y 11 μl del preincubado que contenía NT. El volumen final se ajustó a 0,1 ml añadiendo tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). Las concentraciones finales de NVP y de NT fueron 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (751,03 μM) y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (33,35 μM), respectivamente. Los viales se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Al mismo tiempo, se preincubaron viales sin el sistema enzimático que, posteriormente, fueron incubados en las mismas condiciones que los viales anteriores. El procesamiento posterior del contenido de los viales fue similar al descrito anteriormente. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, se obtuvo el porcentaje de inhibición tiempo-dependiente (TDI) correspondiente a cada metabolito de NVP utilizando la ecuación propuesta por Atkinson *et al.* (138):

$$\% TDI = 100 * \left(1 - \left(\left(\frac{R + I^{NADPH}}{R + I^{NO NADPH}} \right) / \left(\frac{R - I^{NADPH}}{R - I^{NO NADPH}} \right) \right) \right) \quad (\text{Ec. 1})$$

$R + I^{NADPH}$: velocidad de reacción cuando la preincubación se lleva a cabo con el sistema enzimático generador de NADPH y en presencia de inhibidor.

$R - I^{NADPH}$: velocidad de reacción cuando la preincubación se lleva a cabo con el sistema enzimático generador de NADPH pero en ausencia de inhibidor.

$R + I^{NO NADPH}$: velocidad de reacción cuando la preincubación se lleva a cabo en presencia de inhibidor pero en ausencia de sistema enzimático generador de NADPH.

$R - I^{NO NADPH}$: velocidad de reacción cuando la preincubación se lleva a cabo en ausencia de inhibidor y de sistema enzimático generador de NADPH.

Los experimentos de desplazamiento del valor IC_{50} se realizaron del mismo modo que el descrito para el punto único, utilizando en esta ocasión, varias concentraciones finales de NT: 1, 2, 4, 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ (3,34, 6,67, 13,3, 33,4 y 133 μM). Dicho desplazamiento se cuantificó mediante el cociente de los valores IC_{50} obtenidos en ausencia y en presencia del sistema enzimático durante la preincubación.

3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos humanos

La inhibición de la formación del 2-, 3- y 12-OH-NVP por la NT fue estudiada en microsomas hepáticos humanos obtenidos de Invitrogen (Barcelona, España). El procedimiento fue similar al descrito en el caso de los microsomas hepáticos de rata, con las siguientes modificaciones para incrementar las concentración de metabolitos en la solución final: 0,2 mg de proteína microsomal y el doble de volumen de las demás soluciones (volumen final total de 0,2 ml y concentración final de NVP de 5 $\mu\text{g/ml}$). Tras la incubación a 37 °C durante 30 minutos, se añadieron 25 μl de una solución de hidróxido sódico 2 N y 5 ml de acetato de etilo, y se agitaron enérgicamente los tubos para extraer la NVP y sus metabolitos. Se repitió la extracción con 3 ml de acetato de etilo y ambos extractos se evaporaron a 40 °C. El residuo seco se disolvió en 100 μl de fase móvil, compuesta por acetonitrilo y tampón fosfato 0,05 M (pH 4,6) con 0,1 % (v/v) de trietilamina, en las proporciones 12/88 (v/v). Una alícuota de 25 μl se inyectó en el sistema cromatográfico. Las concentraciones finales de NT ensayadas fueron 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (0,3, 3,3 y 33 μM).

4. Métodos analíticos

Las determinaciones analíticas de las concentraciones de NVP y NT en las muestras plasmáticas, así como de las concentraciones de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP en las muestras de microsomas hepáticos de rata y de humanos, se efectuaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Se construyó una curva de calibración para cada uno de los analitos, representando el área del pico cromatográfico respecto a la concentración del analito, y se determinó el límite de cuantificación a partir de la concentración del analito que dio lugar a un pico 10 veces superior al ruido de fondo cromatográfico. Además, se determinó la exactitud de cada método, definida como la relación entre la concentración obtenida y la concentración real en el intervalo de concentraciones obtenidas en los ensayos. Por último, se evaluó la precisión del método mediante el coeficiente de variación de los resultados obtenidos con una serie de patrones.

4.1. Nevirapina

La valoración de NVP en las muestras plasmáticas se realizó mediante HPLC, con detección mediante absorción de luz ultravioleta de 254 nm. Se utilizó un cromatógrafo compuesto por una bomba cuaternaria programable *SpectraSYSTEM P4000*, un inyector automático *SpectraSYSTEM AS3000* y un detector espectrofotométrico *SpectraSYSTEM UV 6000LP*. El procesamiento informático de los cromatogramas se efectuó con el programa *ChromQuest*. Como fase estacionaria se utilizó una columna comercial de fase inversa *Nova-Pack C₁₈* (150 mm x 3,9 mm, 4 µm). También se utilizó una precolumna, modelo

C-135 B, con el fin de prolongar la vida útil de la columna evitando el paso de posibles contaminantes sólidos. La fase móvil utilizada estaba compuesta por una mezcla de acetonitrilo y NaH_2PO_4 50 mM, en la proporción 25:75, con un flujo de 1 ml/min.

La preparación de las muestras consistió en la desproteización del plasma con acetonitrilo a partes iguales. Tras centrifugar a 2.000 g durante cinco minutos, se decantaron los sobrenadantes y se inyectaron 25 μl en el cromatógrafo.

4.2. 2-, 3- y 12-hidroxinevirapina

La determinación de las concentraciones de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP así como de NVP en las muestras de microsomas hepáticos se efectuó con el mismo equipo utilizado para la determinación de NVP. En esta ocasión, la longitud de onda fue de 240 nm y la fase móvil estuvo compuesta por una mezcla de acetonitrilo y NaH_2PO_4 50 mM que contenía trietilamina al 0,1 % (v/v) (pH 4,6) en la proporción 12/88 (v/v). Las muestras de microsomas hepáticos de rata (100 μl) se desproteizaron con 100 μl de una mezcla de ácido tricloroacético al 12 %/acetonitrilo (50/50, v/v). En el caso de los estudios con microsomas hepáticos humanos, las muestras no se desproteizaron con la mezcla descrita sino que, como se ha indicado anteriormente, se sometieron a un proceso de extracción con acetato de etilo y el residuo obtenido tras evaporar el disolvente orgánico se resuspendió con fase móvil (100 μl) previamente a su inyección en el cromatógrafo. En ambos casos, se centrifugaron las muestras a 2.000 g durante cinco minutos, se decantaron los sobrenadantes y se inyectaron 25 μl en el cromatógrafo.

4.3. Nortriptilina

Para la cuantificación de la NT en las muestras plasmáticas se empleó un método cromatográfico con detección fluorimétrica (139). Se utilizó la detección fluorimétrica con el fin de lograr una sensibilidad suficiente para cuantificar las concentraciones plasmáticas de NT. El sistema cromatográfico consistió en una bomba *Waters™ S15*, un inyector manual *Rheodyne®* y un detector de fluorescencia *Hewlett Packard 1046-A*. Como fase estacionaria se empleó una columna de fase inversa *Waters Spherisrob S5 ODS2* (4,6 mm x 250 mm) con precolumna y en el detector de fluorescencia se seleccionó una longitud de onda de excitación de 260 nm y una longitud de onda de emisión de 310 nm. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua (85/15, v/v) y el flujo fue de 1 ml/min.

Debido a que la molécula de NT no es fluorescente *per se*, fue necesario obtener un derivado fluorescente como se indica a continuación. Las muestras plasmáticas (50 µl) se sometieron al proceso de derivatización, adicionando 100 µl de una solución de borato sódico 0,1 M (pH 7) y 300 µl de una solución de Fmoc-Cl (0,25 mg/ml) en acetonitrilo. El Fmoc-Cl se utilizó por su capacidad en reaccionar con el grupo amino de la NT y formar un derivado fluorescente detectable por HPLC. A los 20 minutos de la reacción de derivatización, se adicionaron 20 µl de una solución de ácido cítrico 1 M, se centrifugó la mezcla a 5.000 g durante 5 minutos y se inyectó en el cromatógrafo un volumen de 25 µl.

5. Métodos farmacocinéticos y estadísticos

La estimación de los parámetros farmacocinéticos a partir de las concentraciones plasmáticas de los fármacos ensayados fue llevada a cabo mediante el programa informático WinNonlin (versión 5.1). En el caso de las administraciones extravasasales se estimaron los siguientes parámetros: semivida ($t_{1/2}$), concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo hasta alcanzar la concentración plasmática máxima ($t_{m\acute{a}x}$), área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo (AUC_{last}) y hasta infinito (AUC_{inf}), tiempo medio de absorción (MAT), tiempo medio de resistencia o de permanencia del fármaco en el organismo utilizando áreas desde tiempo cero hasta el último tiempo de muestreo (MRT_{last}) y hasta infinito (MRT_{inf}). Por otra parte, los parámetros estimados tras la administración intravenosa fueron los siguientes: $t_{1/2}$, AUC_{last} , AUC_{inf} , MRT_{last} , MRT_{inf} , volumen de distribución (Vd), volumen de distribución en estado estacionario (Vss) y aclaramiento plasmático total (Cl).

A partir de las velocidades iniciales de desaparición de NVP o de formación de sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata, se obtuvieron las curvas correspondientes a la cinética del metabolismo. Mediante el programa informático GraphPad Prism (versión 6.0; GraphPad Software Inc., San Diego, CA) se determinaron los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$), utilizándose una regresión no lineal para el ajuste de la ecuación representativa de la cinética de Michaelis-Menten. Las concentraciones de los distintos fármacos antidepresivos necesarias para inhibir en un 50 % el metabolismo de la NVP (IC_{50}) se determinaron también por regresión no lineal, utilizando un modelo de inhibición competitiva y el mismo programa usado anteriormente.

Para obtener el valor de la constante de inhibición (K_i) de la NT, se determinaron en primer lugar, las pendientes correspondientes a la representación de Lineweaver-Burk de velocidad de metabolismo de la NVP en función de las distintas concentraciones de NVP y de NT ensayadas. La representación de dichas pendientes respecto a la concentración de NT, proporcionó una línea recta cuya intersección con el eje de abscisas (eje X) se corresponde con el valor de K_i .

El análisis estadístico se efectuó con el programa informático IBM SPSS Statistics 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). Las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba t de Student, excepto cuando las varianzas de los grupos comparados no fueron homogéneas, en cuyo caso se utilizó la prueba de Mann-Whitney. La prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) se utilizó para las comparaciones de más de dos grupos. En el caso de existir diferencias estadísticamente significativas, se empleó la prueba de Tukey para determinar los grupos que diferían estadísticamente. Se consideró que la diferencia era estadísticamente significativa cuando el nivel de significación proporcionado por la prueba estadística fue inferior al 5 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Evaluación del método analítico

1.1. Nevirapina

Se ha desarrollado un nuevo método analítico para la determinación de NVP en plasma de rata. En la Figura 16 se muestra uno de los cromatogramas en el que se puede apreciar que el pico correspondiente a NVP se encuentra separado de los picos correspondientes a componentes del plasma, lo que permite su cuantificación sin interferencias debidas a dichos componentes.

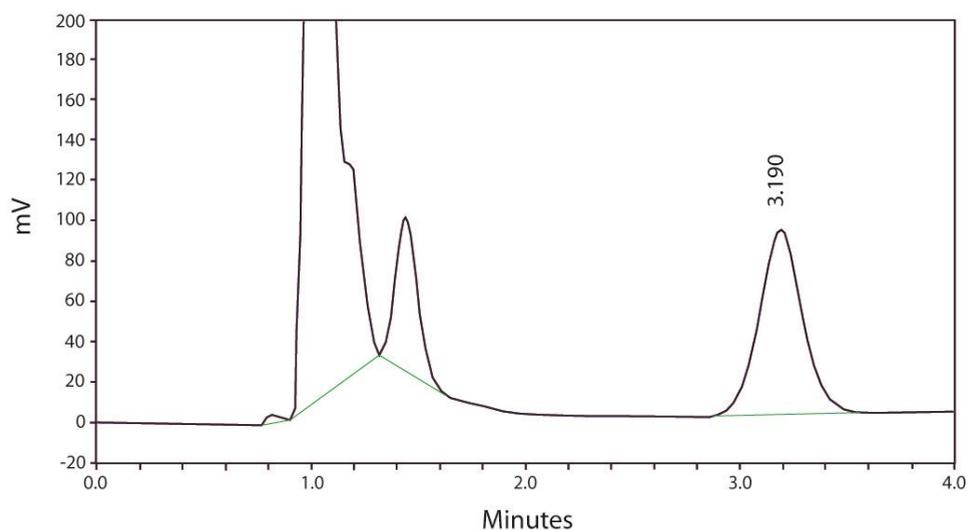


Figura 16. Cromatograma obtenido a partir de una muestra plasmática conteniendo NVP (10 $\mu\text{g/ml}$, pico a 3,19 min).

Las curvas de calibración obtenidas presentaron un trazado lineal en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 50 $\mu\text{g/ml}$ y el límite de cuantificación fue de, aproximadamente, 0,1 $\mu\text{g/ml}$. La exactitud fue superior al 90 % y el coeficiente de variación inferior al 15 %.

1.2. Nortriptilina

Los cromatogramas correspondientes a las muestras plasmáticas de NT mostraron un gran número de picos hasta, aproximadamente, el minuto 9 (Figura 17). Sin embargo, el pico correspondiente al derivado fluorescente de NT apareció en el cromatograma completamente separado de dichos picos, lo que permitió su cuantificación.

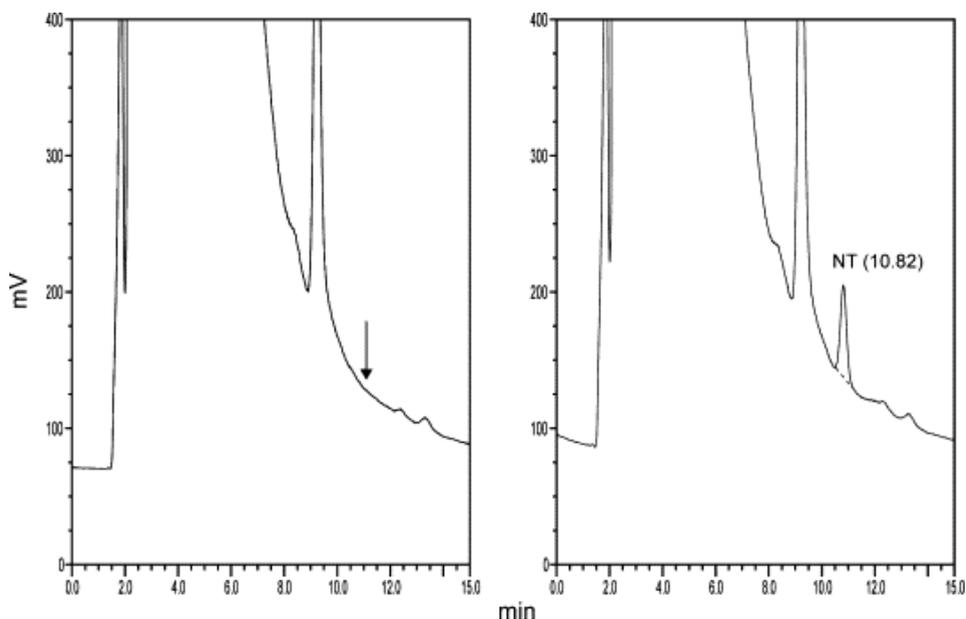


Figura 17. Cromatogramas correspondientes a un blanco de plasma y plasma adicionado con NT (50 ng/ml, pico a 10,82 min).

Las curvas de calibración obtenidas presentaron un trazado lineal en el intervalo de concentraciones de 10 a 5.000 ng/ml. El límite de cuantificación fue de, aproximadamente, 10 ng/ml, la exactitud superior al 90 % y el coeficiente de variación inferior al 15 %.

1.3. 2-, 3-, y 12-hidroxinevirapina

En los ensayos realizados *in vitro* con microsomas hepáticos de rata o de humano, se determinaron tanto la NVP como sus metabolitos. Con el método analítico descrito, los picos correspondientes a la NVP y a los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP aparecen en el cromatograma completamente separados de otros componentes presentes en los microsomas de rata (Figura 18) y en los microsomas de humanos (Figura 19).

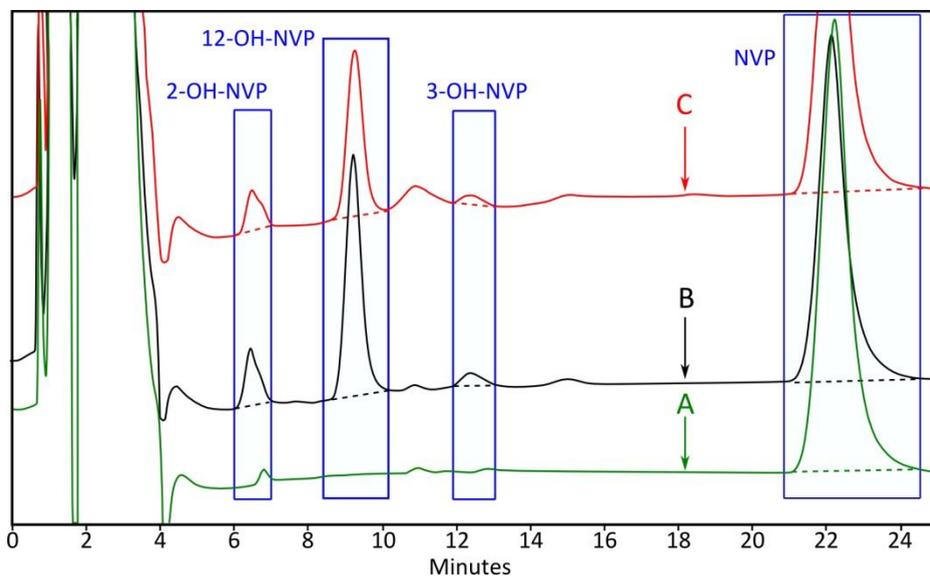


Figura 18. Cromatogramas representativos del metabolismo de NVP (5 $\mu\text{g/ml}$) en microsomas hepáticos de rata. A: Patrón de NVP (sin metabolismo); B: NVP tras 30 minutos a 37 °C; C: NVP y NT (1 $\mu\text{g/ml}$) tras 30 minutos a 37 °C.

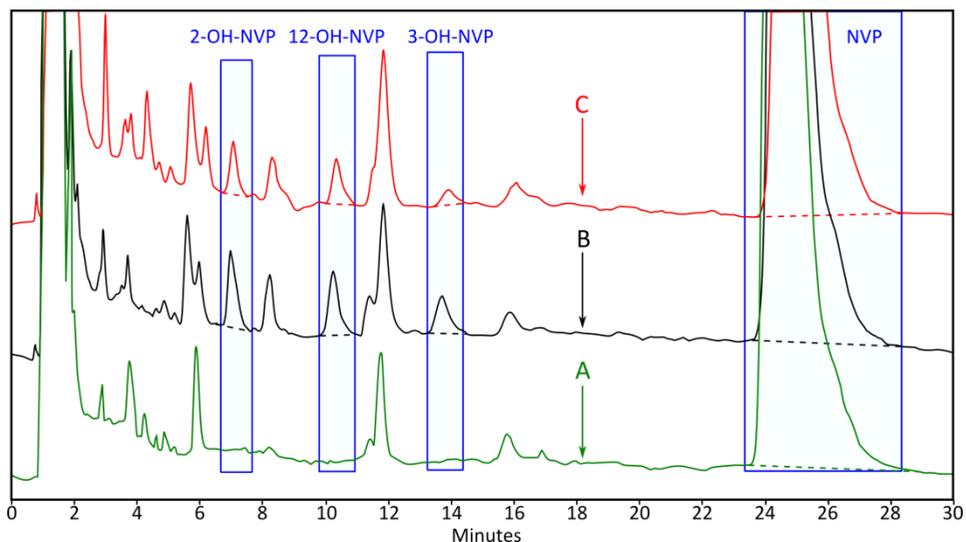


Figura 19. Cromatogramas representativos del metabolismo de NVP (5 µg/ml) en microsomas hepáticos humanos. A: Patrón de NVP (sin metabolismo); B: NVP tras 30 minutos a 37 °C; C: NVP y NT (10 µg/ml) tras 30 minutos a 37 °C.

2. Ensayos *in vivo*

2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina

En la Tabla 9 y en la Figura 20 se muestran los niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración por vía intravenosa (grupo 1), oral (grupo 2) y subcutánea (grupo 3). En esta figura, las concentraciones plasmáticas correspondientes a las administraciones intravenosa y subcutánea se han normalizado para una dosis de 8 mg. Como se observa en la Figura 20, la administración de NVP por vía oral dio lugar a niveles plasmáticos similares a los obtenidos tras su administración subcutánea.

Tabla 9. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP, expresadas como media \pm desviación estándar (D.E.), obtenidas tras su administración por vía intravenosa, oral y subcutánea ($n = 6$). Valores normalizados para una dosis de 8 mg.

Tiempo (min)	Vía de administración (grupo)		
	i.v. (1)	p.o. (2)	s.c. (3)
5	21,05 \pm 4,87	-	-
10	16,08 \pm 1,84	-	-
20	11,77 \pm 1,82	-	-
30	-	3,94 \pm 0,86	2,51 \pm 1,82
40	7,44 \pm 1,85	-	-
60	5,36 \pm 1,22	4,87 \pm 0,64	3,70 \pm 1,68
90	2,91 \pm 1,02	4,50 \pm 1,03	3,99 \pm 0,95
120	1,85 \pm 0,55	4,17 \pm 0,81	4,16 \pm 0,65
180	0,70 \pm 0,26	2,60 \pm 0,44	3,32 \pm 0,93
240	0,37 \pm 0,22	1,47 \pm 0,34	1,95 \pm 0,61
300	-	0,80 \pm 0,28	0,98 \pm 0,20
360	-	0,35 \pm 0,14	0,46 \pm 0,20

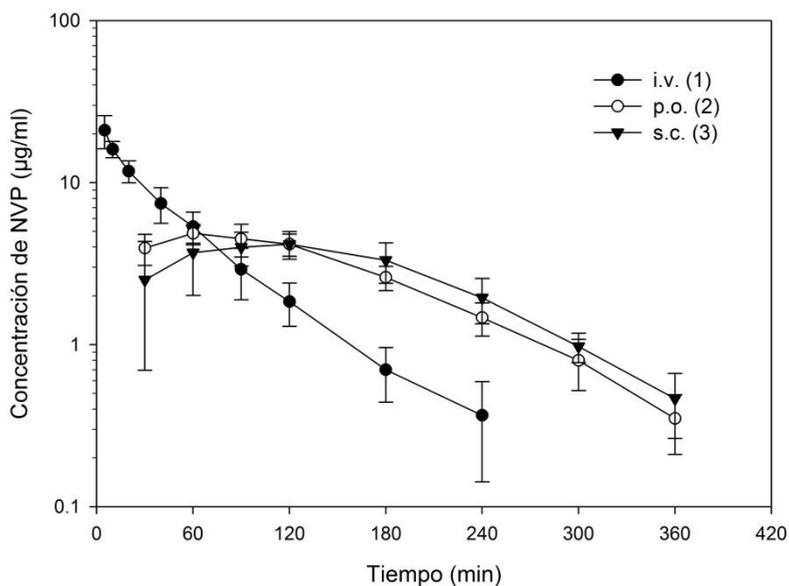


Figura 20. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa, oral y subcutánea (normalizados para una dosis de 8 mg). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

En la Tabla 10 se muestran los valores medios de los parámetros farmacocinéticos de NVP obtenidos en los tres grupos de animales. La comparación estadística mostró diferencias significativas solamente entre los valores medios de MRT del grupo 1 y los obtenidos tras las administraciones extravasales (grupos 2 y 3).

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 1, 2 y 3. Los valores de AUC y $C_{m\acute{a}x}$ fueron normalizados para una dosis de 8 mg. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	Vía de administración (grupo)			Significación
	i.v. (1)	p.o. (2)	s.c. (3)	
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	1.012 \pm 178	918 \pm 129	920 \pm 116	NS
$t_{1/2}$ (min)	47,5 \pm 9,7	56,6 \pm 8,7	59,2 \pm 6,3	NS
Cl (ml/min)	8,15 \pm 1,70	-	-	-
Vss (ml)	434,3 \pm 51,0	-	-	-
Vd (ml)	550,3 \pm 114,9	-	-	-
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	-	5,05 \pm 0,73	4,88 \pm 0,94	NS
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	-	80 \pm 24	105 \pm 46	NS
MRT (min)	54,4 \pm 8,5 ^a	138,2 \pm 8,9 ^b	158,1 \pm 23,7 ^b	P < 0,001
MAT (min)	-	83,8	103,7	-

Los parámetros con distinto superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

NS: No significativo.

Con el fin de evaluar el efecto de la anestesia en la farmacocinética del fármaco, se realizó un grupo adicional (grupo 4). En la Tabla 11 y en la Figura 21 se muestran los niveles plasmáticos medios obtenidos tras la administración de 4 mg de NVP por vía intravenosa en ausencia (grupo 1) y en presencia de anestesia (grupo 4), normalizados para una dosis de 8 mg. Como se observa en

la figura, se obtuvo una caída de concentraciones más lenta en los animales anestesiados.

Tabla 11. Valores promedios \pm D.E. de las concentraciones plasmáticas de NVP, expresadas en $\mu\text{g/ml}$, obtenidas tras su administración por vía intravenosa en ausencia (grupo 1) o en presencia de anestesia (grupo 4) ($n = 5-6$). Valores normalizados para una dosis de 8 mg.

Tiempo (min)	Vía de administración (grupo)	
	i.v. (1)	i.v. (4)
5	21,05 \pm 4,87	34,76 \pm 4,33
10	16,08 \pm 1,84	33,60 \pm 3,97
20	11,77 \pm 1,82	29,41 \pm 3,96
40	7,44 \pm 1,85	24,78 \pm 3,44
60	5,36 \pm 1,22	22,40 \pm 2,14
90	2,91 \pm 1,02	-
120	1,85 \pm 0,55	17,66 \pm 1,94
180	0,70 \pm 0,26	16,15 \pm 1,81
240	0,37 \pm 0,22	14,10 \pm 2,10

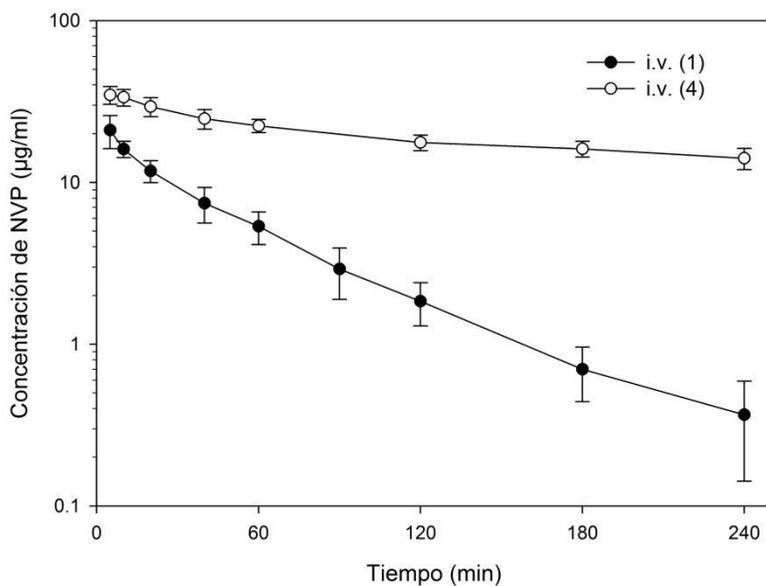


Figura 21. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa en ausencia (grupo 1) o en presencia (grupo 4) de anestesia. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

En la Tabla 12 se muestran los valores medios de los parámetros farmacocinéticos de NVP obtenidos en los grupos 1 y 4 y su comparación estadística. Todos los parámetros evaluados mostraron diferencias significativas debidas a la presencia de anestesia.

Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 1 y 4. Los valores de AUC fueron normalizados para una dosis de 8 mg. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	Vía de administración (grupo)		Significación
	i.v. (1)	i.v. (4)	
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	1.012 \pm 178	13.779 \pm 5.183	P < 0,001
$t_{1/2}$ (min)	47,5 \pm 9,7	425,0 \pm 199,9	P = 0,001
Cl (ml/min)	8,15 \pm 1,70	0,65 \pm 0,24	P < 0,001
Vss (ml)	434,3 \pm 51,0	334,5 \pm 70,3	P < 0,05
Vd (ml)	550,3 \pm 114,9	345,8 \pm 72,5	P < 0,01
MRT (min)	54,4 \pm 8,5	594,2 \pm 282,4	P = 0,001

2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales

En la Tabla 13 y en la Figura 22 se muestran las concentraciones plasmáticas medias de NVP obtenidas dependiendo del segmento gastrointestinal donde fue administrado el fármaco (grupos 5-8). En el momento de la administración y durante el muestreo sanguíneo, todos los animales permanecieron anestesiados y con el colédoco ligado.

Tabla 13. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración oral e intrainestinal (n = 4-6). Valores expresados en $\mu\text{g/ml}$.

Tiempo (min)	Vía de administración (grupo)			
	p.o. (5)	i.d. (6)	i.i. (7)	i.c. (8)
30	0,24 \pm 0,21	3,27 \pm 0,88	2,11 \pm 0,28	1,53 \pm 0,33
60	0,38 \pm 0,26	4,21 \pm 1,02	2,67 \pm 0,30	2,21 \pm 0,43
90	0,47 \pm 0,26	4,86 \pm 1,13	3,45 \pm 0,25	2,64 \pm 0,53
120	0,43 \pm 0,23	5,56 \pm 1,09	3,67 \pm 0,29	2,90 \pm 0,50
180	0,69 \pm 0,33	5,80 \pm 1,10	4,05 \pm 0,24	3,37 \pm 0,44
240	0,79 \pm 0,33	6,25 \pm 1,19	4,39 \pm 0,21	3,73 \pm 0,54

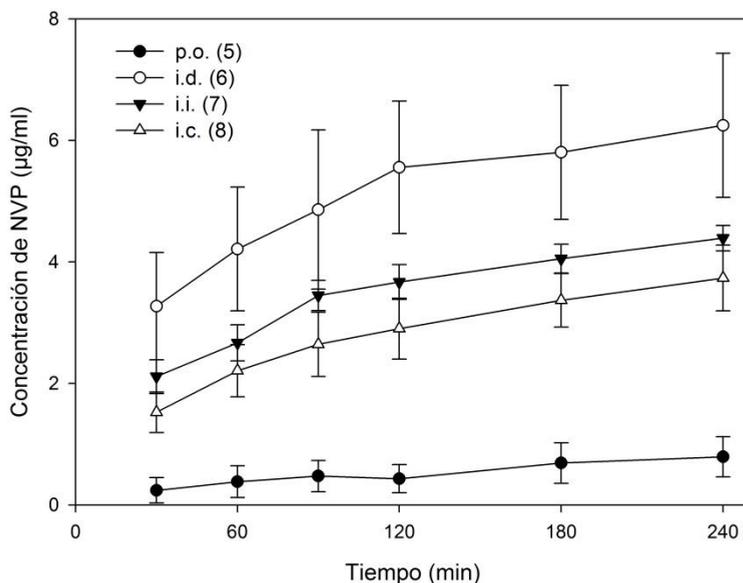


Figura 22. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración oral e intrainestinal. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Las cantidades remanentes de NVP en cada segmento gastrointestinal al final del período de estudio se encuentran representadas en la Figura 23. Estos resultados confirman los obtenidos a partir de las curvas plasmáticas con una velocidad de absorción en el orden: duodeno > íleon > colon > estómago.

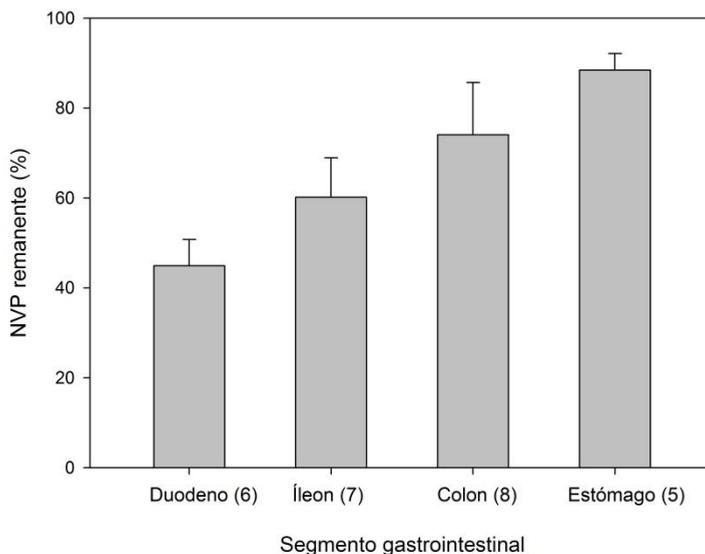


Figura 23. Porcentaje remanente de NVP (media \pm D.E.) en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal a las 4 horas de la administración. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

En la Tabla 14 se muestran los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos de NVP obtenidos en los grupos 5-8. La comparación estadística de los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{last} no mostró diferencias significativas en el caso de las administraciones por vía intraileal (grupo 7) e intracolónica (grupo 8). Sin embargo, su administración por vía oral (grupo 5) e intraduodenal (grupo 6) dio lugar al valor más bajo y al más alto de estos parámetros, respectivamente.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 5-8. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	Vía de administración (grupo)				Significación
	p.o. (5)	i.d. (6)	i.i. (7)	i.c. (8)	
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	196 \pm 63	220 \pm 49	228 \pm 27	225 \pm 30	NS
$C_{m\acute{a}x}$ (μ g/ml)	0,86 \pm 0,35 ^a	6,31 \pm 1,18 ^b	4,41 \pm 0,20 ^c	3,77 \pm 0,54 ^c	P < 0,001
AUC_{last} (μ g·min/ml)	96 \pm 50 ^a	1.156 \pm 237 ^b	774 \pm 41 ^c	636 \pm 99 ^c	P < 0,001

Los parámetros con distinto superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

NS: No significativo.

Para evaluar la influencia de la bilis en la absorción de NVP en el segmento gastrointestinal que presenta mejor absorción, el duodeno, se utilizaron dos grupos adicionales de animales (grupos 9 y 10). En la Tabla 15 y en la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos en las ratas con el colédoco ligado (grupos 6 y 9) y no ligado (grupo 10). Además, el duodeno de los animales de los grupos 9 y 10 fue lavado con suero previamente a la administración, con el fin de eliminar la bilis presente en la luz intestinal.

Tabla 15. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal en ratas anestesiadas con el colédoco ligado (grupos 6 y 9) o no ligado (grupo 10) y con el duodeno lavado antes de la administración (grupos 9 y 10) o no lavado (grupo 6) ($n = 4-6$). Valores expresados en μ g/ml.

Tiempo (min)	Vía de administración (grupo)		
	i.d. (6)	i.d.w. (9)	i.d.w.n. (10)
30	3,27 \pm 0,88	2,92 \pm 0,80	3,52 \pm 0,92
60	4,21 \pm 1,02	3,47 \pm 0,43	4,78 \pm 0,84
90	4,86 \pm 1,13	3,90 \pm 0,46	5,76 \pm 0,84
120	5,56 \pm 1,09	3,96 \pm 0,55	6,59 \pm 0,70
180	5,80 \pm 1,10	4,25 \pm 0,84	7,58 \pm 0,57
240	6,25 \pm 1,19	4,46 \pm 0,94	7,89 \pm 0,46

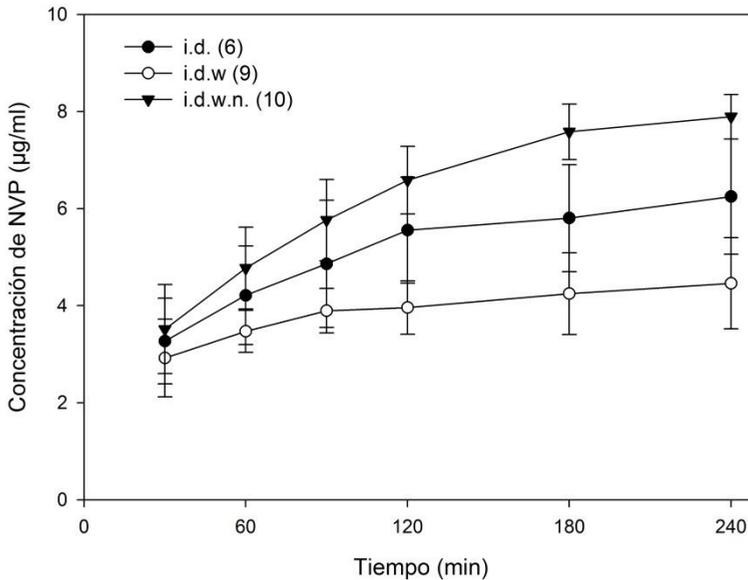


Figura 24. Concentraciones plasmáticas de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal en ratas anestesiadas con el colédoco ligado (grupos 6 y 9) o no ligado (grupo 10) y con el duodeno lavado antes de la administración (grupos 9 y 10) o no lavado (grupo 6). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Como puede observarse en la Figura 24, los animales con el colédoco ligado y a los que se eliminó la bilis del duodeno mediante lavado (grupo 9), presentaron niveles de NVP más bajos que los otros dos grupos. Sin embargo, los niveles plasmáticos más elevados fueron obtenidos en los animales con secreción continua de bilis (grupo 10), mientras que los animales sin secreción de bilis, pero con bilis remanente en el duodeno (grupo 6), presentaron niveles intermedios a los obtenidos en los otros dos grupos. Todo ello indica que la bilis favorece la absorción de NVP. Con el fin de confirmar los resultados obtenidos, se analizaron las cantidades remanentes de NVP en el duodeno en cada grupo de animales (Figura 25).

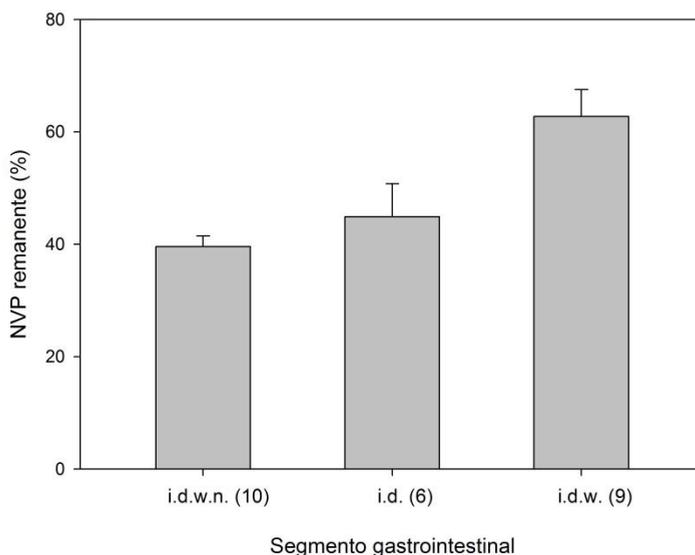


Figura 25. Porcentaje remanente (media \pm D.E.) de NVP en el duodeno de los animales (grupos 6, 9 y 10) a las 4 horas de la administración. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

En la Tabla 16 se muestran los valores medios de los principales parámetros farmacocinéticos de NVP obtenidos en los grupos 6, 9 y 10. La comparación estadística mostró diferencias significativas entre los tres grupos en los valores medios de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{last} .

Tabla 16. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los grupos 6, 9 y 10. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	Vía de administración (grupo)			Significación
	i.d. (6)	i.d.w. (9)	i.d.w.n. (10)	
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	220 \pm 49	210 \pm 60	228 \pm 27	NS
$C_{m\acute{a}x}$ (μ g/ml)	6,31 \pm 1,18 ^a	4,55 \pm 0,80 ^b	7,98 \pm 0,38 ^c	P < 0,001
AUC_{last} (μ g·min/ml)	1.156 \pm 237 ^a	876 \pm 141 ^b	1.410 \pm 120 ^c	P < 0,001

Los parámetros con distinto superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

NS: No significativo.

2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT

2.3.1. Niveles plasmáticos y parámetros farmacocinéticos de NVP

2.3.1.1. Administración oral de NVP (grupos 11 y 12)

En la Tabla 17 y en la Figura 26 se muestran los niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos en los animales administrados por vía oral con 8 mg de NVP (grupo 11, control NVP) y 8 mg de NVP y 5 mg de NT (grupo 12).

Tabla 17. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración oral con (grupo 12) o sin (grupo 11) NT ($n = 6$). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Tiempo (min)	NVP p.o.	
	- NT (11)	+ NT p.o. (12)
15	1,33 \pm 0,62	1,39 \pm 1,16
30	2,74 \pm 1,09	2,31 \pm 1,80
60	3,93 \pm 0,96	3,55 \pm 1,90
120	4,01 \pm 1,02	5,59 \pm 2,46
180	2,79 \pm 0,94	6,76 \pm 3,00
240	1,59 \pm 0,63	7,82 \pm 3,26
300	0,79 \pm 0,48	8,08 \pm 3,72
360	0,32 \pm 0,20	7,98 \pm 4,35
420	0,19 \pm 0,19	6,26 \pm 2,36

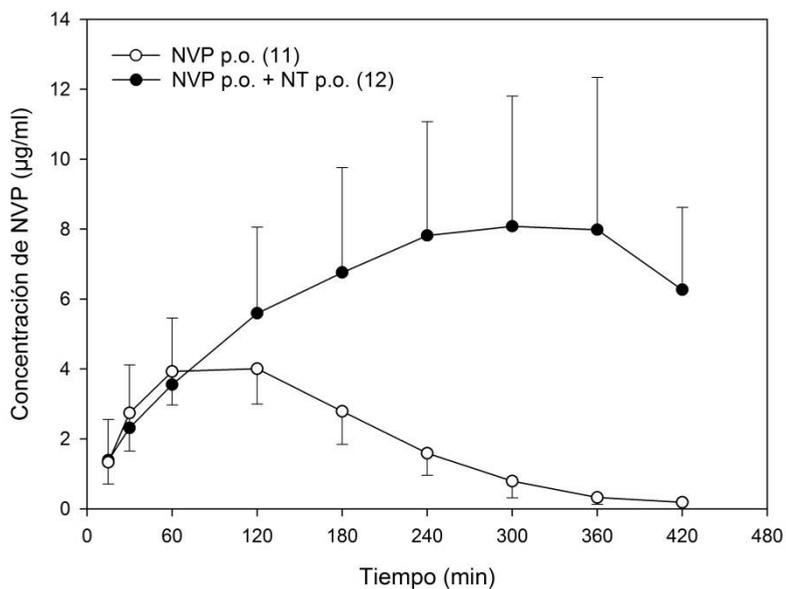


Figura 26. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración oral con o sin NT. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

La coadministración por vía oral de NT dio lugar a concentraciones plasmáticas de NVP más elevadas y el análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos confirmó la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 18).

Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración oral con (grupo 12) o sin (grupo 11) NT. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	NVP p.o.		Significación
	- NT (11)	+ NT p.o. (12)	
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	110 \pm 24	300 \pm 76	P < 0,001
$C_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	4,10 \pm 1,06	8,92 \pm 4,26	P < 0,05
$t_{1/2}$ (min)	63,2 \pm 22,9	-	-
AUC_{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	819 \pm 224	2.471 \pm 1.002	P < 0,01
AUC_{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	873 \pm 291	-	-
MRT_{last} (min)	137 \pm 12	242 \pm 14	P < 0,001
MRT_{inf} (min)	152 \pm 24	-	-

Cabe señalar que, en el caso de los animales coadministrados con NT (grupo 12) no fue posible determinar el valor de los parámetros $t_{1/2}$, AUC_{inf} y MRT_{inf} debido a la escasez de datos de niveles plasmáticos de NVP en la fase terminal de la curva.

2.3.1.2. Administración intraduodenal de NVP (grupos 13-15)

En la Tabla 19 y en la Figura 27 se muestran los niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos en los animales administrados por vía intraduodenal con 8 mg de NVP (grupo 13, control NVP), 8 mg de NVP i.d. y 5 mg de NT i.d. (grupo 14) y 8 mg de NVP i.d. y 2,5 mg de NT i.v. (grupo 15).

Tabla 19. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 15) o sin (grupo 13) NT ($n = 6$). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Tiempo (min)	NVP i.d.		
	- NT (13)	+ NT i.d. (14)	+ NT i.v. (15)
15	2,21 \pm 0,87	2,60 \pm 0,93	-
20	-	-	1,72 \pm 0,45
25	-	-	1,75 \pm 0,45
30	2,20 \pm 0,87	3,66 \pm 1,07	-
35	-	-	1,98 \pm 0,65
55	-	-	3,20 \pm 0,74
60	2,22 \pm 0,78	5,53 \pm 1,41	-
75	-	-	4,20 \pm 0,89
105	-	-	4,95 \pm 1,12
120	2,33 \pm 1,05	9,03 \pm 3,04	-
135	-	-	5,71 \pm 1,74
180	1,87 \pm 1,05	10,61 \pm 3,49	-
195	-	-	6,91 \pm 1,46
240	1,61 \pm 1,29	11,13 \pm 2,85	-
255	-	-	6,84 \pm 1,54
300	1,13 \pm 0,93	11,06 \pm 2,94	-
360	0,86 \pm 0,48	9,58 \pm 3,55	-
420	0,93 \pm 0,76	7,67 \pm 3,05	-

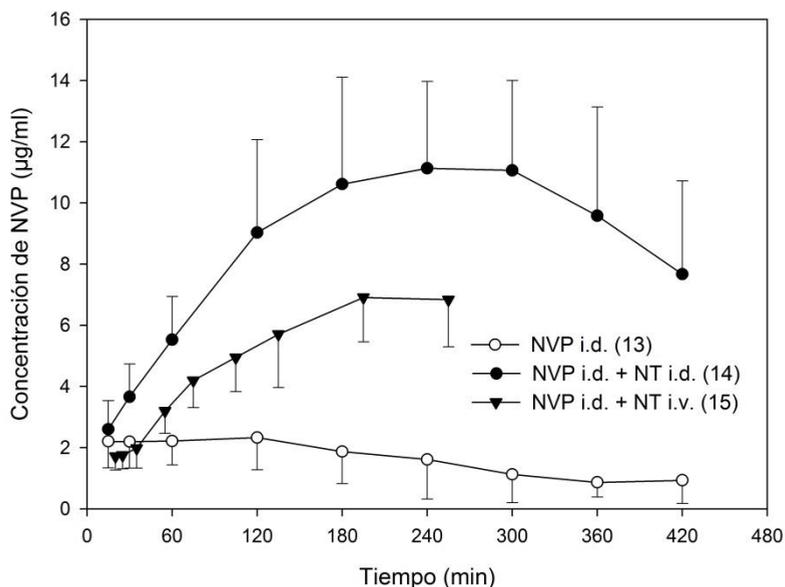


Figura 27. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intraduodenal con o sin NT. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Las concentraciones plasmáticas obtenidas en presencia de NT (grupos 14 y 15) fueron superiores a las obtenidas en su ausencia (grupo 13). La mayor concentración plasmática de NVP se obtuvo en el grupo administrado por vía intraduodenal con NT (grupo 14). Los parámetros farmacocinéticos de NVP correspondientes a estos grupos de animales y su comparación estadística se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 15) o sin (grupo 13) NT.

Parámetro	NVP i.d.		
	- NT (13)	+ NT i.d. (14)	+ NT i.v. (15)
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	95,0 \pm 85,2 ^a	260 \pm 90 ^b	205 \pm 45 ^{a,b}
$C_{m\acute{a}x}$ (μ g/ml)	2,64 \pm 1,13 ^a	11,9 \pm 3,4 ^b	7,24 \pm 1,46 ^c
$t_{1/2}$ (min)	164 \pm 63	-	-
AUC_{last} (μ g·min/ml)	650 \pm 333 ^a	3.360 \pm 530 ^b	1.260 \pm 231
AUC_{inf} (μ g·min/ml)	877 \pm 462	-	-
MRT_{last} (min)	162 \pm 24 ^a	222 \pm 25 ^b	156 \pm 5
MRT_{inf} (min)	285 \pm 77	-	-

Los parámetros con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$).

Los valores de AUC_{last} y MRT_{last} obtenidos tras la administración i.v. de NT (grupo 15) no fueron comparados con los otros dos grupos (ver el texto para más detalles).

Al igual que en los animales coadministrados con NT p.o. (grupo 12), en los animales coadministrados con NT i.d. (grupo 14) e i.v. (grupo 15) no fue posible determinar el valor de los parámetros $t_{1/2}$, AUC_{inf} y MRT_{inf} debido a la escasez de datos de niveles plasmáticos de NVP en la fase terminal de la curva. Por otra parte, no pudieron realizarse comparaciones estadísticas de los valores de AUC_{last} y MRT_{last} obtenidos tras la administración i.v. de NT (grupo 15) por los diferentes tiempos de muestreo.

2.3.1.3. Administración intravenosa de NVP (grupos 16 y 17)

En la Tabla 21 y en la Figura 28 se muestran los niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos en los animales administrados por vía intravenosa con 4 mg de NVP (grupo 16, control NVP) o 4 mg de NVP i.v. y 5 mg de NT i.d. (grupo 17). Estos grupos fueron incluidos en el estudio para confirmar que la interacción entre NVP y NT no ocurre a nivel de la absorción ya que, en ellos, la NVP se administró por vía intravenosa.

Tabla 21. Concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de NVP (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intravenosa con (grupo 17) o sin (grupo 16) NT ($n = 6$). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Tiempo (min)	NVP i.v.	
	- NT (16)	+ NT i.d. (17)
5	14,68 \pm 3,29	16,18 \pm 2,89
10	10,30 \pm 1,69	12,21 \pm 1,87
20	8,57 \pm 1,72	9,61 \pm 1,65
40	6,13 \pm 1,23	9,46 \pm 1,79
60	4,53 \pm 0,91	8,55 \pm 0,85
90	3,39 \pm 0,93	8,54 \pm 0,89
120	2,28 \pm 0,82	8,35 \pm 1,14
180	1,07 \pm 0,45	7,50 \pm 1,17
240	0,61 \pm 0,31	6,71 \pm 1,12

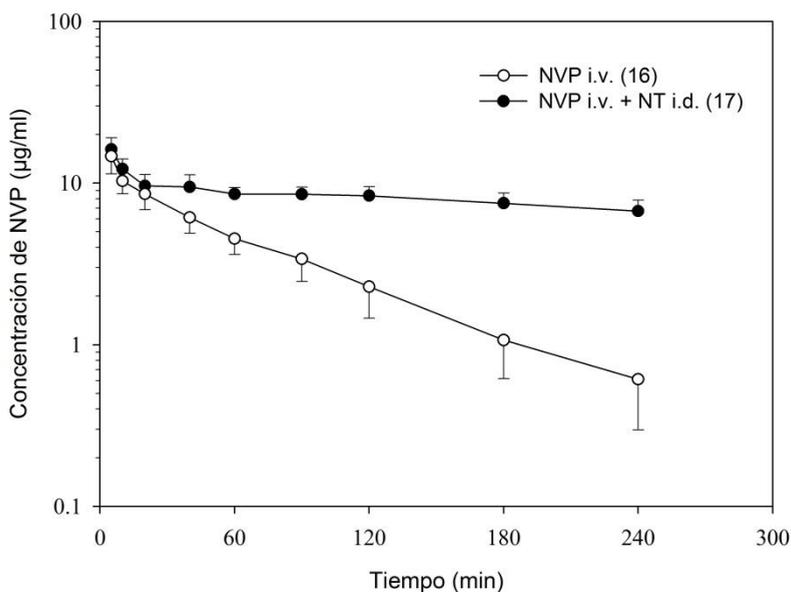


Figura 28. Niveles plasmáticos medios de NVP obtenidos tras su administración intravenosa con o sin NT. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Las concentraciones plasmáticas de NVP tras alcanzarse el equilibrio en la distribución (aproximadamente a los 20-40 minutos) mostraron una disminución más lenta en el grupo coadministrado con NT (grupo 17). Los parámetros farmacocinéticos correspondientes a ambos grupos de animales se encuentran resumidos en la Tabla 22, donde pueden observarse valores muy inferiores de Cl en el grupo coadministrado con NT y valores enormemente superiores de $t_{1/2}$ y MRT_{inf} para este mismo grupo.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intravenosa con (grupo 17) o sin (grupo 16) NT. En la última columna se indica el resultado de la comparación estadística.

Parámetro	NVP i.v.		Significación
	- NT (16)	+ NT i.d. (17)	
Vd (ml)	492 \pm 140	454 \pm 134	NS
Cl (ml/min)	6,40 \pm 2,18	0,955 \pm 0,314	P < 0,01
$t_{1/2}$ (min)	54,4 \pm 7,7	370 \pm 189	P < 0,01
AUC _{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	643 \pm 223	1.770 \pm 403	P < 0,001
AUC _{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	683 \pm 212	4.840 \pm 2.530	P < 0,01
MRT _{last} (min)	51,5 \pm 11,6	105 \pm 5	P < 0,001
MRT _{inf} (min)	65,2 \pm 8,2	528 \pm 272	P < 0,01

NS: No significativo.

2.3.2. Niveles plasmáticos y parámetros farmacocinéticos de NT

En los animales administrados por vía oral con NT (grupo 12) no se pudo cuantificar de forma fiable las concentraciones plasmáticas de NT, ya que, en general, fueron muy bajas y próximas al límite de cuantificación del método analítico. Por este motivo, los efectos de la interacción entre NVP y NT sobre los

parámetros farmacocinéticos de NT tras su administración oral no fueron evaluados.

2.3.2.1. Administración intraduodenal de NT (grupos 14, 17 y 18)

La administración por vía intraduodenal de NT dio lugar a niveles plasmáticos superiores a los obtenidos tras su administración por vía oral que pudieron ser cuantificados utilizando el método analítico descrito en el apartado de materiales y métodos. En la Tabla 23 y en la Figura 29 se muestran los niveles plasmáticos medios de NT obtenidos en los animales administrados con 5 mg de NT por vía intraduodenal (grupo 18, control NT), 5 mg de NT i.d. y 8 mg de NVP i.d. (grupo 14) y 5 mg de NT i.d. y 4 mg de NVP i.v. (grupo 17).

Tabla 23. Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de NT (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 17) o sin (grupo 18) NVP (n = 6). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Tiempo (min)	NT i.d.		
	- NVP (18)	+ NVP i.d. (14)	+ NVP i.v. (17)
20	-	-	231,61 \pm 147,14
25	-	-	259,01 \pm 154,75
30	107,04 \pm 37,98	151,23 \pm 83,68	-
35	-	-	163,62 \pm 113,12
45	111,66 \pm 48,65	143,88 \pm 76,11	-
55	-	-	131,01 \pm 62,41
75	79,95 \pm 20,75	128,55 \pm 50,00	112,26 \pm 55,95
105	-	-	82,63 \pm 47,53
135	51,80 \pm 8,76	77,18 \pm 43,72	53,40 \pm 41,30
195	29,97 \pm 9,42	52,66 \pm 35,99	35,62 \pm 32,62
255	21,59 \pm 4,41	36,46 \pm 30,00	-
315	14,43 \pm 4,30	23,87 \pm 23,63	-

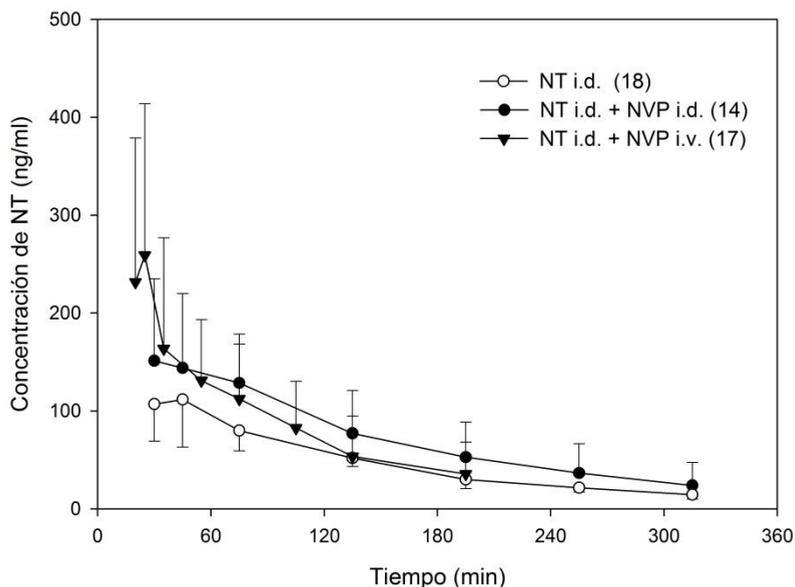


Figura 29. Niveles plasmáticos medios de NT obtenidos tras su administración intraduodenal con o sin NVP. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Las concentraciones plasmáticas de NT fueron más elevadas cuando se coadministró con NVP (grupos 14 y 17). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los tres grupos debido a la amplia variabilidad interindividual (Tabla 24). En el caso del grupo 17, sólo se realizó la comparación estadística de los parámetros $t_{1/2}$, AUC_{inf} y MRT_{inf} debido a los diferentes tiempos de muestreo respecto a los otros dos grupos.

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos de NT (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intraduodenal con (grupos 14 y 17) o sin (grupo 18) NVP.

Parámetro	NT i.d.		
	- NVP (18)	+ NVP i.d. (14)	+ NVP i.v. (17)
$t_{m\acute{a}x}$ (min)	35,0 \pm 7,7	37,5 \pm 8,2	23,3 \pm 2,6
$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	122 \pm 48	163 \pm 80	273 \pm 148
$t_{1/2}$ (min)	86,0 \pm 12,0	70,3 \pm 32,8	76,4 \pm 42,2
AUC_{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	15,0 \pm 2,9	22,9 \pm 8,7	17,9 \pm 8,8
AUC_{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	17,0 \pm 3,4	26,7 \pm 10,9	23,9 \pm 13,7
MRT_{last} (min)	110 \pm 15	113 \pm 38	68,5 \pm 16,1
MRT_{inf} (min)	149 \pm 19	135 \pm 50	122 \pm 54

En el caso del grupo 17, solamente se compararon estadísticamente los valores de $t_{1/2}$, AUC_{inf} y MRT_{inf} con los valores correspondientes obtenidos en los otros dos grupos (para más detalles véase el texto).

2.3.2.2. Administración intravenosa de NT (grupos 15 y 19)

En la Tabla 25 y en la Figura 30 se muestran los niveles plasmáticos medios de NT obtenidos en los animales administrados con 2,5 mg de NT por vía intravenosa (grupo 19, control NT) o 2,5 mg de NT i.v. y 8 mg de NVP i.d. (grupo 15).

Tabla 25. Concentraciones plasmáticas (ng/ml) de NT (media \pm D.E.) obtenidas tras su administración intravenosa con (grupo 15) o sin (grupo 19) NVP (n = 6). Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Tiempo (min)	NT i.v.	
	- NVP (19)	+ NVP i.d. (15)
5	3.395 \pm 766	2.742 \pm 546
10	2.613 \pm 593	2.019 \pm 652
20	1.885 \pm 207	1.414 \pm 345
40	1.108 \pm 176	903 \pm 298
60	774 \pm 185	617 \pm 198
90	459 \pm 125	417 \pm 92
120	343 \pm 81	246 \pm 56
180	162 \pm 67	144 \pm 33
240	64 \pm 24	64 \pm 26

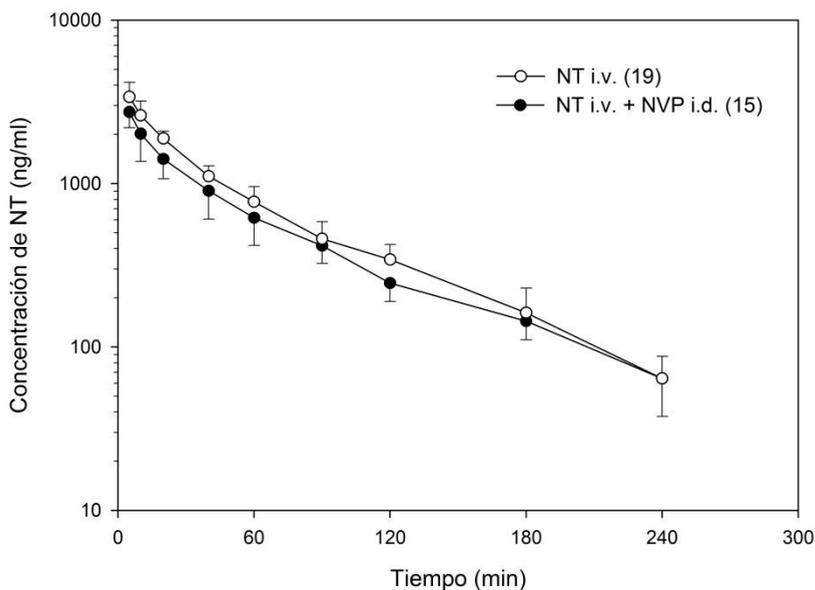


Figura 30. Niveles plasmáticos medios de NT obtenidos tras su administración intravenosa con o sin NVP. Los números entre paréntesis indican los grupos a los que pertenecen los animales.

Las concentraciones plasmáticas de NT obtenidas en ambos grupos fueron similares y no se detectaron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos (Tabla 26).

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos de NT (media \pm D.E.) obtenidos tras su administración intravenosa con (grupo 15) o sin (grupo 19) NVP.

Parámetro	NT i.v.	
	- NVP (19)	+ NVP i.d. (15)
Vd (ml)	1.080 \pm 162	1.660 \pm 595
Cl (ml/min)	15,8 \pm 3,5	19,2 \pm 3,1
t _{1/2} (min)	48,5 \pm 8,3	58,8 \pm 16,5
AUC _{last} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	159 \pm 27	127 \pm 24
AUC _{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)	164 \pm 29	133 \pm 22
MRT _{last} (min)	51,2 \pm 6,7	53,5 \pm 4,1
MRT _{inf} (min)	58,5 \pm 10,1	66,8 \pm 15,0

3. Ensayos *in vitro*

3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata

Con el fin de determinar la velocidad de desaparición de la NVP y la velocidad de aparición de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP se ensayaron diferentes concentraciones de NVP utilizando microsomas hepáticos de ratas. Sin embargo, la detección del metabolito 8-OH-NVP no fue posible debido a su escasa formación, indetectable mediante el método analítico empleado.

En la Tabla 27 y en la Figura 31 se muestran los valores correspondientes a la velocidad de desaparición de NVP y a la velocidad de aparición de sus metabolitos en función de la concentración inicial de NVP. En la Figura 31 también se muestran las curvas correspondientes al ajuste de una cinética de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal.

Tabla 27. Velocidades de desaparición de NVP y de formación de sus metabolitos (media \pm D.E.) obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).

NVP (μ M)	Velocidad (nmoles/(min/mg proteína))			
	NVP	2-OH-NVP	3-OH-NVP	12-OH-NVP
7,51	0,093 \pm 0,012	0,016 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001	0,066 \pm 0,005
18,78	0,220 \pm 0,014	0,032 \pm 0,002	0,015 \pm 0,001	0,157 \pm 0,008
37,55	0,394 \pm 0,014	0,056 \pm 0,003	0,026 \pm 0,001	0,290 \pm 0,014
93,88	0,765 \pm 0,070	0,106 \pm 0,005	0,054 \pm 0,001	0,569 \pm 0,026
187,76	1,123 \pm 0,062	0,162 \pm 0,005	0,089 \pm 0,003	0,867 \pm 0,038
375,52	1,638 \pm 0,059	0,206 \pm 0,005	0,131 \pm 0,007	1,111 \pm 0,044
563,27	1,820 \pm 0,145	0,232 \pm 0,011	0,154 \pm 0,004	1,213 \pm 0,062
751,03	1,996 \pm 0,242	0,245 \pm 0,002	0,178 \pm 0,003	1,279 \pm 0,030

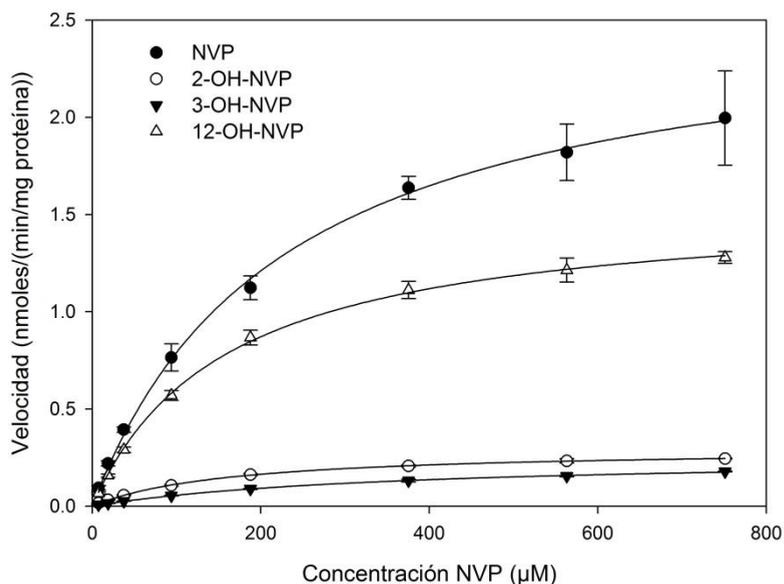


Figura 31. Representación de la cinética de Michaelis-Menten correspondiente a la desaparición de NVP y a la formación de sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata.

A partir de las curvas correspondientes a las cinéticas de Michaelis-Menten se determinaron los valores de velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) y de constante de Michaelis-Menten (K_m) (Tabla 28).

Tabla 28. Parámetros cinéticos de NVP y sus metabolitos (valor estimado \pm error estándar (E.E.)) obtenidos tras el ajuste de la cinética de Michaelis-Menten a los datos experimentales mostrados en la Figura 31.

	$V_{m\acute{a}x}$ (nmoles/(min/mg))	K_m (μ M)
NVP	2,58 \pm 0,06	227 \pm 13
2-OH-NVP	0,30 \pm 0,01	163 \pm 5
3-OH-NVP	0,26 \pm 0,01	361 \pm 23
12-OH-NVP	1,56 \pm 0,02	158 \pm 6

3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomas hepáticos de rata

Con el fin de investigar un potencial efecto inhibidor de los fármacos antidepresivos NT, SRT, FLUOX y FLUVOX sobre el metabolismo de la NVP se determinó, en primer lugar, el porcentaje de NVP metabolizada en presencia de inhibidor respecto a la metabolizada en su ausencia (control). Los resultados obtenidos, expresados como porcentaje del control en función de la concentración del inhibidor, se recogen en la Tabla 29 y su representación gráfica en la Figura 32.

Tabla 29. Metabolismo de NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).

Inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	NVP (% Control)			
	NT	SRT	FLUVOX	FLUOX
0,1	97,23 \pm 3,02	98,54 \pm 0,22	98,93 \pm 0,85	91,29 \pm 1,46
0,2	92,18 \pm 5,90	94,61 \pm 2,53	96,65 \pm 1,10	84,48 \pm 1,80
0,5	82,52 \pm 1,09	-	-	75,35 \pm 0,87
1	54,62 \pm 14,23	87,80 \pm 7,09	87,77 \pm 5,61	59,43 \pm 3,99
2	28,92 \pm 2,16	79,97 \pm 6,72	79,95 \pm 6,10	43,09 \pm 1,74
10	16,54 \pm 4,82	55,81 \pm 3,18	49,61 \pm 3,42	19,77 \pm 1,89
20	-	41,29 \pm 3,53	35,15 \pm 2,86	-
50	10,41 \pm 3,80	26,03 \pm 0,94	24,62 \pm 2,00	11,69 \pm 1,67

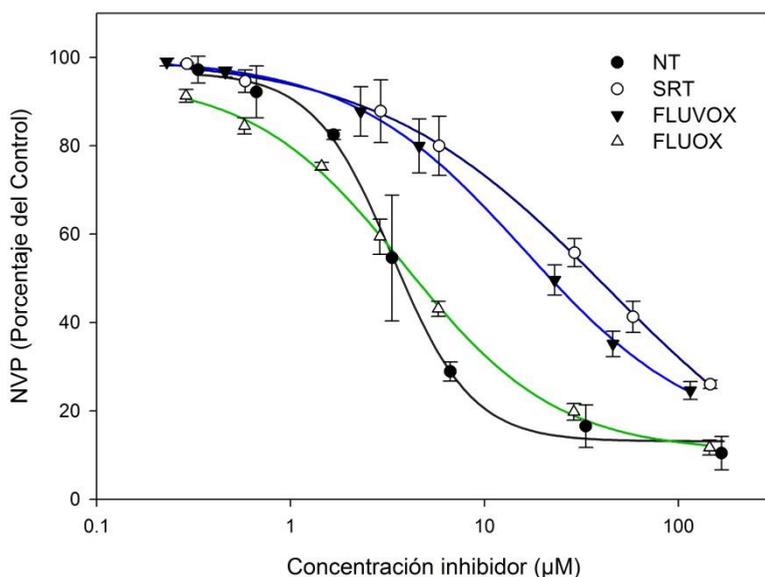


Figura 32. Inhibición concentración-dependiente del metabolismo de NVP en microsomas hepáticos de rata en función de la concentración del inhibidor.

Por otra parte, se determinó el porcentaje de metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP formados en presencia de inhibidor respecto a los formados en su ausencia (controles). En las Tablas 30-32 y en la Figura 33 se muestran los resultados obtenidos para los tres metabolitos analizados.

Tabla 30. Formación del metabolito 2-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).

Inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	2-OH-NVP (% Control)			
	NT	SRT	FLUVOX	FLUOX
0,1	91,53 \pm 5,57	90,17 \pm 5,47	95,07 \pm 1,21	99,16 \pm 0,67
0,2	89,85 \pm 2,75	86,09 \pm 3,00	89,39 \pm 3,13	93,18 \pm 0,68
0,5	83,19 \pm 1,38	-	-	80,18 \pm 2,45
1	63,90 \pm 8,09	81,93 \pm 5,58	81,41 \pm 6,78	63,35 \pm 4,54
2	44,42 \pm 6,83	77,07 \pm 7,84	74,03 \pm 8,74	52,74 \pm 0,51
10	24,40 \pm 7,90	56,42 \pm 10,53	53,05 \pm 9,01	25,25 \pm 1,65
20	-	40,26 \pm 1,81	34,24 \pm 5,36	-
50	14,63 \pm 0,57	30,16 \pm 1,60	20,68 \pm 1,34	13,57 \pm 0,24

Tabla 31. Formación del metabolito 3-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).

Inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	3-OH-NVP (% Control)			
	NT	SRT	FLUVOX	FLUOX
0,1	94,88 \pm 2,81	92,46 \pm 1,64	96,62 \pm 1,94	93,09 \pm 1,04
0,2	92,06 \pm 4,09	89,50 \pm 0,56	93,10 \pm 1,79	76,65 \pm 1,66
0,5	84,46 \pm 1,74	-	-	71,11 \pm 2,60
1	56,36 \pm 9,98	83,64 \pm 7,30	85,09 \pm 2,06	63,28 \pm 1,75
2	42,53 \pm 12,70	75,18 \pm 6,69	80,51 \pm 4,04	45,24 \pm 0,45
10	32,69 \pm 11,34	51,33 \pm 3,61	50,88 \pm 6,82	18,01 \pm 1,21
20	-	40,15 \pm 5,15	31,06 \pm 5,26	-
50	7,30 \pm 2,45	29,36 \pm 3,26	13,65 \pm 0,71	6,20 \pm 1,09

Tabla 32. Formación del metabolito 12-OH-NVP, expresado como porcentaje del control, en función de la concentración de inhibidor (media \pm D.E., n = 4).

Inhibidor ($\mu\text{g/ml}$)	12-OH-NVP (% Control)			
	NT	SRT	FLUVOX	FLUOX
0,1	95,67 \pm 1,84	96,83 \pm 2,06	96,61 \pm 1,40	97,00 \pm 0,85
0,2	88,63 \pm 3,26	92,70 \pm 3,41	91,89 \pm 3,68	92,42 \pm 1,70
0,5	80,09 \pm 1,40	-	-	78,25 \pm 1,89
1	62,82 \pm 8,03	88,96 \pm 2,96	85,00 \pm 6,03	60,75 \pm 3,12
2	36,31 \pm 11,04	81,79 \pm 5,06	78,80 \pm 4,65	45,96 \pm 0,62
10	13,20 \pm 5,23	58,43 \pm 6,67	46,02 \pm 4,24	14,55 \pm 1,14
20	-	45,71 \pm 3,72	29,37 \pm 2,23	-
50	6,43 \pm 1,87	22,87 \pm 2,94	12,86 \pm 0,86	4,75 \pm 0,32

Mediante el correspondiente ajuste por regresión no lineal se obtuvieron los valores de IC_{50} de cada uno de los antidepresivos para la NVP y sus metabolitos (Tabla 33).

Tabla 33. Valores de IC_{50} de NT, SRT, FLUVOX y FLUOX correspondiente a la desaparición de NVP y formación de metabolitos en microsomas hepáticos de rata (valor estimado, (intervalo de confianza del 95 %)).

	IC_{50} (μM)			
	IC_{50} NT	IC_{50} SRT	IC_{50} FLUVOX	IC_{50} FLUOX
NVP	3,37 ^a (2,89-3,93)	38,09 ^b (20,90-69,41)	16,15 ^c (11,53-22,63)	3,88 ^a (3,46-4,34)
2-OH-NVP	4,67 ^a (3,80-5,73)	34,10 ^b (13,82-84,16)	25,22 ^b (16,06-39,60)	3,88 ^a (3,27-4,60)
3-OH-NVP	4,68 ^a (3,36-6,53)	23,19 ^b (12,51-42,96)	23,95 ^b (18,01-31,85)	5,01 ^a (3,77-6,65)
12-OH-NVP	4,46 ^a (3,75-5,32)	47,46 ^b (38,25-58,89)	20,82 ^c (15,11-28,67)	4,18 ^a (3,83-4,56)

Los parámetros con diferente superíndice son estadísticamente diferentes, ANOVA ($p < 0,001$) seguida de prueba de Tukey.

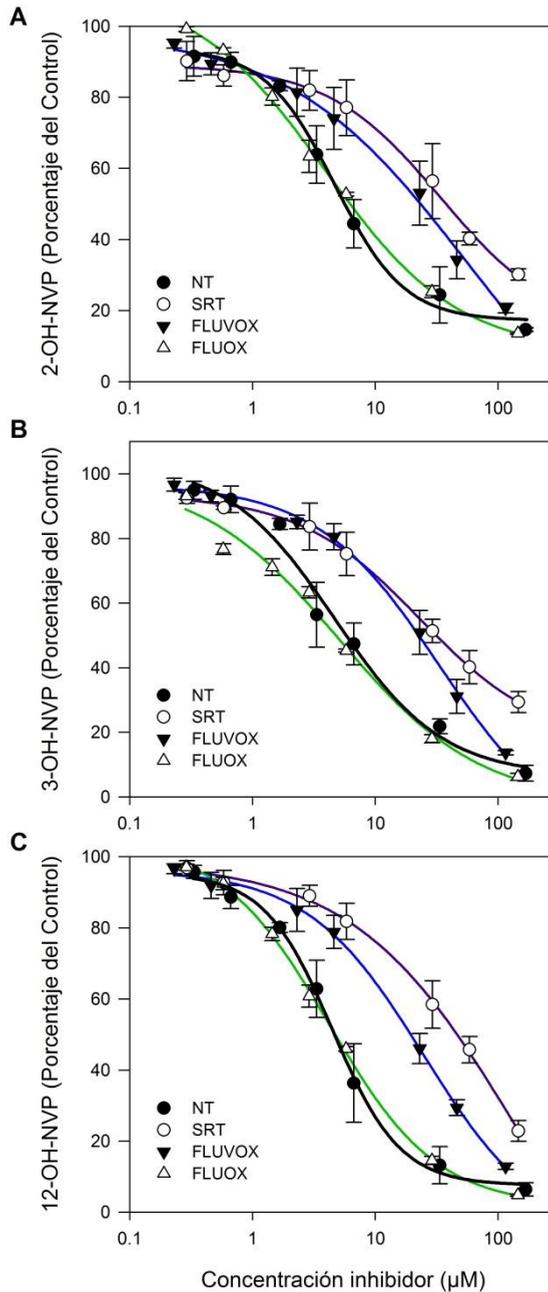


Figura 33. Inhibición concentración-dependiente de la formación de los metabolitos 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) y 12-OH-NVP (C), en función de la concentración de los distintos inhibidores, en microsomas hepáticos de rata.

3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata

Con el fin de determinar si la inhibición del metabolismo de la NVP por parte de la NT es de tipo competitivo, no competitivo o acompetitivo, se obtuvieron las velocidades de desaparición de distintas concentraciones de NVP en presencia de diferentes concentraciones de NT. En la Tabla 34 se encuentran resumidos estos resultados y en la Figura 34 la representación gráfica de los datos con el ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten y la ecuación de Lineweaver-Burk.

Tabla 34. Velocidades de desaparición de NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).

NVP (μM)	Velocidad (nmoles/(min/mg proteína))			
	- NT	+ NT 0,5 $\mu\text{g/ml}$	+ NT 1 $\mu\text{g/ml}$	+ NT 2 $\mu\text{g/ml}$
18,78	0,25 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00
37,55	0,48 \pm 0,03	0,39 \pm 0,02	0,32 \pm 0,02	0,24 \pm 0,03
93,88	0,90 \pm 0,04	0,77 \pm 0,05	0,55 \pm 0,16	0,46 \pm 0,06
375,52	1,68 \pm 0,32	1,52 \pm 0,16	1,45 \pm 0,02	1,11 \pm 0,02
751,03	2,16 \pm 0,17	2,02 \pm 0,16	1,81 \pm 0,04	1,66 \pm 0,05

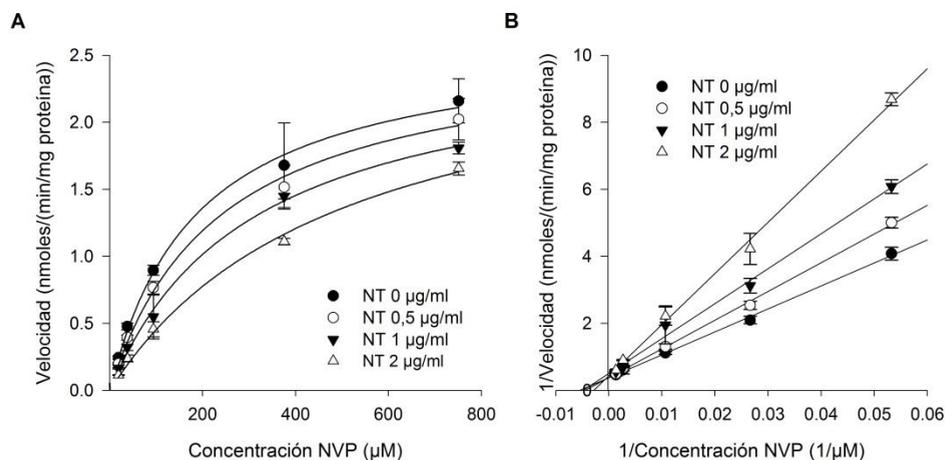


Figura 34. Representación de las cinéticas de Michaelis-Menten (A) y Lineweaver-Burk (B) correspondientes a la desaparición de NVP en microsomas hepáticos de rata.

Se determinaron también las velocidades de formación de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP en presencia de diferentes concentraciones de NVP y NT. En las Tablas 35-37 y en la Figura 35 se muestran las velocidades medias obtenidas y el ajuste de las ecuaciones de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk.

Tabla 35. Velocidades de formación de 2-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).

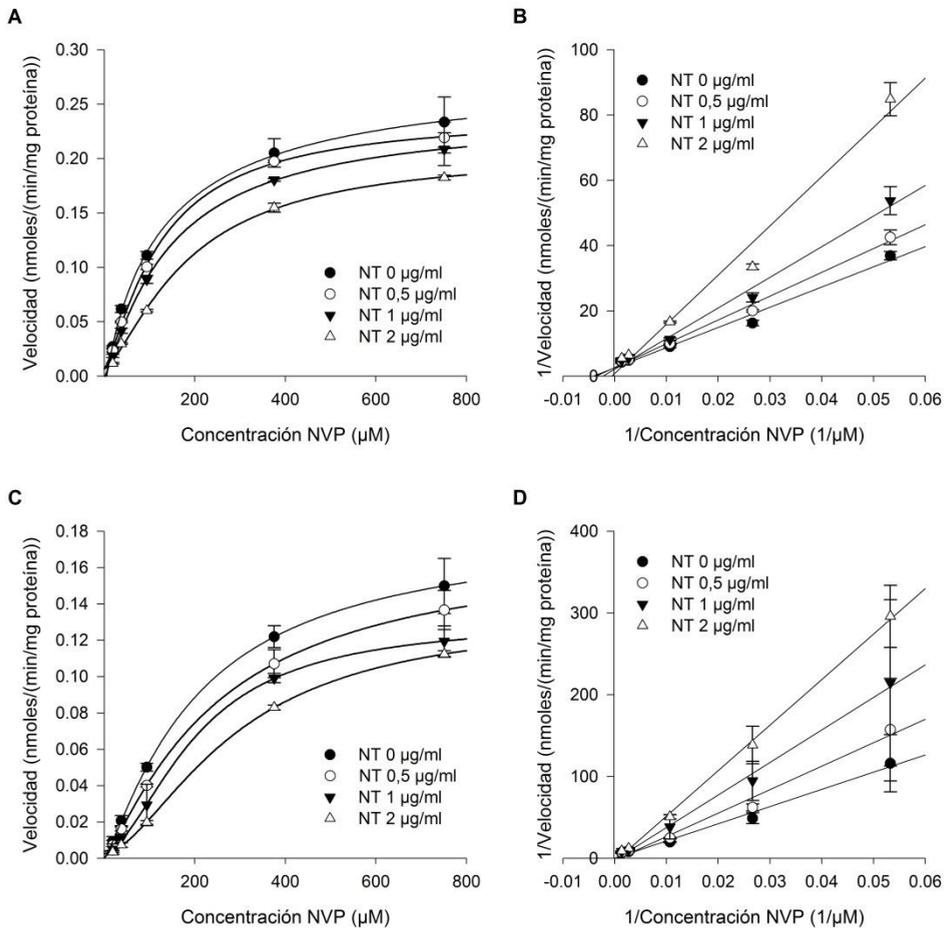
NVP (μ M)	Velocidad (nmoles/(min/mg proteína))			
	- NT	+ NT 0,5 μ g/ml	+ NT 1 μ g/ml	+ NT 2 μ g/ml
18,78	0,027 \pm 0,001	0,024 \pm 0,001	0,019 \pm 0,001	0,012 \pm 0,001
37,55	0,062 \pm 0,003	0,050 \pm 0,001	0,042 \pm 0,002	0,030 \pm 0,001
93,88	0,111 \pm 0,004	0,100 \pm 0,002	0,089 \pm 0,004	0,060 \pm 0,001
375,52	0,205 \pm 0,013	0,197 \pm 0,001	0,180 \pm 0,001	0,155 \pm 0,004
751,03	0,234 \pm 0,023	0,219 \pm 0,014	0,209 \pm 0,015	0,183 \pm 0,002

Tabla 36. Velocidades de formación de 3-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).

NVP (μ M)	Velocidad (nmoles/(min/mg proteína))			
	- NT	+ NT 0,5 μ g/ml	+ NT 1 μ g/ml	+ NT 2 μ g/ml
18,78	0,009 \pm 0,003	0,007 \pm 0,003	0,005 \pm 0,002	0,003 \pm 0,000
37,55	0,021 \pm 0,003	0,016 \pm 0,001	0,011 \pm 0,002	0,007 \pm 0,001
93,88	0,050 \pm 0,002	0,040 \pm 0,001	0,029 \pm 0,011	0,020 \pm 0,001
375,52	0,122 \pm 0,006	0,107 \pm 0,008	0,099 \pm 0,003	0,083 \pm 0,001
751,03	0,150 \pm 0,015	0,137 \pm 0,011	0,119 \pm 0,008	0,112 \pm 0,002

Tabla 37. Velocidades de formación de 12-OH-NVP (media \pm D.E.) en presencia de distintas concentraciones de NT, obtenidas en microsomas hepáticos de rata (n = 4).

NVP (μ M)	Velocidad (nmoles/(min/mg proteína))			
	- NT	+ NT 0,5 μ g/ml	+ NT 1 μ g/ml	+ NT 2 μ g/ml
18,78	0,150 \pm 0,006	0,120 \pm 0,011	0,094 \pm 0,002	0,065 \pm 0,001
37,55	0,314 \pm 0,012	0,257 \pm 0,005	0,201 \pm 0,021	0,149 \pm 0,007
93,88	0,593 \pm 0,034	0,520 \pm 0,015	0,438 \pm 0,025	0,326 \pm 0,029
375,52	1,124 \pm 0,024	1,068 \pm 0,020	0,970 \pm 0,015	0,809 \pm 0,034
751,03	1,181 \pm 0,093	1,107 \pm 0,086	1,040 \pm 0,084	0,967 \pm 0,060



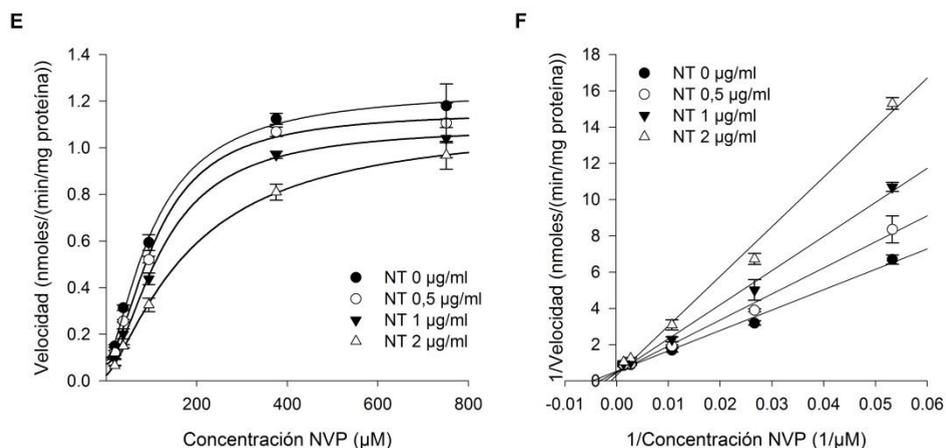


Figura 35. Representación de la cinética de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk correspondiente a la formación de 2-OH-NVP (A, B), 3-OH-NVP (C, D) y 12-OH-NVP (E, F) en microsomas hepáticos de rata.

En la tabla 38 se resumen los valores de $V_{\text{máx}}$ y K_m correspondientes a la desaparición de NVP y formación de los distintos metabolitos con distintas concentraciones de inhibidor (NT). Estos valores indican que se trata de una inhibición de tipo competitiva ya que el valor de K_m aumenta cuando se incrementa al concentración del inhibidor (es decir, el inhibidor interfiere con la unión del sustrato), pero no afecta a la $V_{\text{máx}}$ (el inhibidor no obstaculiza la catálisis, es decir, la liberación del producto y la enzima a partir del complejo enzima-sustrato, ya que no se une a dicho complejo).

Tabla 38. Parámetros cinéticos de NVP y sus metabolitos (valor estimado \pm E.E.) correspondientes a los ajustes mostrados en las Figuras 34 y 35. Valores expresados en μM (K_m) y $\text{nmoles}/(\text{min}/\text{mg}$ de proteína) ($V_{m\acute{a}x}$).

		- NT	+ NT 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+ NT 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	+ NT 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
NVP	K_m	188 \pm 23	235 \pm 34	305 \pm 40	498 \pm 96
	$V_{m\acute{a}x}$	2,64 \pm 0,11	2,60 \pm 0,14	2,56 \pm 0,14	2,71 \pm 0,26
2-OH-NVP	K_m	141 \pm 10	160 \pm 17	190 \pm 18	281 \pm 48
	$V_{m\acute{a}x}$	0,28 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02
3-OH-NVP	K_m	304 \pm 38	383 \pm 51	438 \pm 155	749 \pm 297
	$V_{m\acute{a}x}$	0,21 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,20 \pm 0,03	0,23 \pm 0,05
12-OH-NVP	K_m	131 \pm 19	153 \pm 32	190 \pm 40	283 \pm 40
	$V_{m\acute{a}x}$	1,44 \pm 0,07	1,40 \pm 0,10	1,36 \pm 0,10	1,36 \pm 0,08

A partir de las pendientes correspondientes a las representaciones de Lineweaver-Burk (Tabla 39) se determinaron las constantes de inhibición (K_i) de la NT correspondientes a la desaparición de NVP y formación de los distintos metabolitos mediante las correspondientes regresiones lineales (Figura 36). El valor de K_i se corresponde con el valor absoluto de la intersección de la recta con el eje de abscisas (eje X).

Tabla 39. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT: pendientes correspondientes a las representaciones de Lineweaver-Burk.

NT (μM)	Pendiente Lineweaver-Burk, $\mu\text{M}/(\text{nmoles}/(\text{min}/\text{mg}$ prot))			
	NVP	2-OH-NVP	3-OH-NVP	12-OH-NVP
0,00	69	619	2.104	112
1,67	86	729	2.868	144
3,34	104	939	3.976	188
6,67	153	1.508	5.564	273

Los resultados obtenidos tras el cálculo de K_i fueron: 5,17 μM (NVP), 4,01 μM (2-OH-NVP), 3,97 μM (3-OH-NVP) y 4,40 μM (12-OH-NVP).

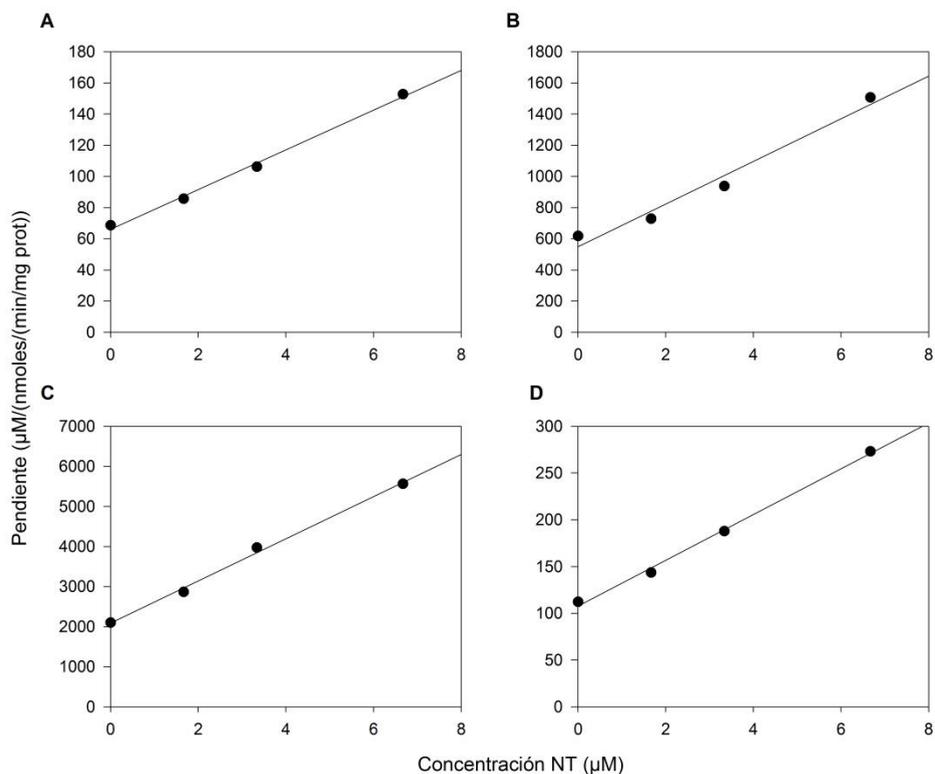


Figura 36. Representación de las pendientes obtenidas utilizando la ecuación de Lineweaver-Burk en función de la concentración de NT. A: valores correspondientes a la desaparición de NVP. B, C y D: valores correspondientes a la formación de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP, respectivamente.

Los siguientes estudios estuvieron destinados a profundizar en las características de la inhibición que produce la NT sobre la NVP. Para ello, se realizaron experimentos de punto único (*Single point*) y de desplazamiento del valor IC_{50} (IC_{50} Shift) con el fin de determinar si la inhibición era tiempo-dependiente. Este tipo de inhibición se manifiesta con un incremento en el potencial inhibitorio cuando se aumenta el tiempo de contacto del inhibidor con la enzima.

En la Tabla 40 y en la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de punto único, expresados como porcentaje de metabolito de NVP formado en presencia de inhibidor durante el tiempo de preincubación respecto al formado en su ausencia (control). Las concentraciones finales de NVP y NT en estos experimentos se fijaron en 751,03 μM y 33,35 μM , respectivamente. A partir de los resultados obtenidos y utilizando la fórmula propuesta por Atkinson (Ec.1), se calculó el porcentaje de inhibición tiempo-dependiente correspondiente a cada metabolito (Tabla 40).

Tabla 40. Inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.) por la NT en los ensayos de punto único, en presencia y en ausencia de enzimas responsables del sistema generador de NADPH durante la preincubación ($n = 4$). En la última columna se muestra el porcentaje de inhibición tiempo-dependiente (% TDI) obtenido con la Ec. 1.

Metabolito	% del Control		% TDI
	- Enzimas	+ Enzimas	
2-OH-NVP	72,88 \pm 2,72	26,95 \pm 0,98	63,02
3-OH-NVP	64,60 \pm 2,00	20,03 \pm 1,07	68,99
12-OH-NVP	72,53 \pm 2,05	26,61 \pm 2,14	63,31

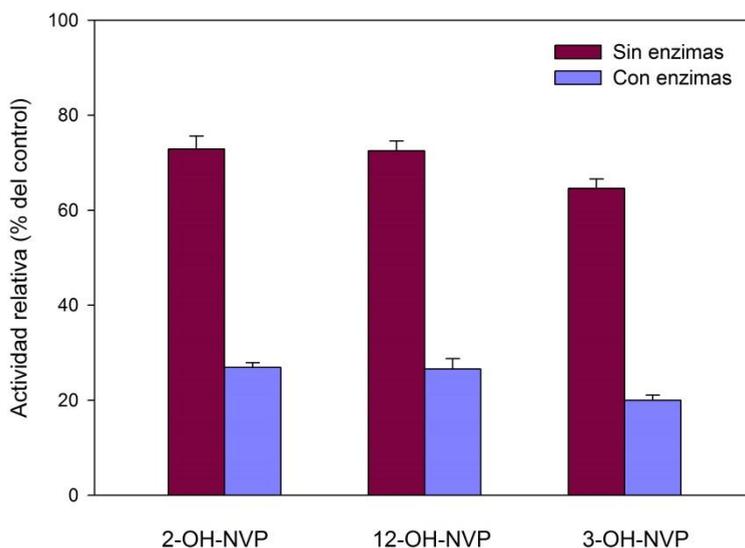


Figura 37. Representación gráfica del porcentaje del control (sin NT) de los metabolitos de NVP obtenidos en presencia de NT, con y sin sistema enzimático generador de NADPH durante la preincubación.

Del mismo modo que en los experimentos de punto único, en los experimentos de desplazamiento del valor IC_{50} la concentración de NVP se mantuvo fija en 751,03 μM . Sin embargo, se ensayaron diferentes concentraciones de NT (3,34, 6,67, 13,3, 33,4 y 133 μM) con el fin de observar el desplazamiento del valor de IC_{50} . En la Tabla 41 y en la Figura 38 se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de desplazamiento de IC_{50} , expresados, al igual que en el caso anterior, como porcentaje del control, y su representación gráfica.

Tabla 41. Porcentaje de inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.) obtenidos en los ensayos de desplazamiento de IC_{50} en presencia y en ausencia de enzimas durante la preincubación (n = 4).

NT (μM)	2-OH-NVP		3-OH-NVP		12-OH-NVP	
	- Enzimas	+ Enzimas	- Enzimas	+ Enzimas	- Enzimas	+ Enzimas
3,3	94,2 \pm 4,3	77,4 \pm 2,8	91,5 \pm 1,3	69,9 \pm 3,3	91,3 \pm 5,4	73,9 \pm 5,3
6,7	92,1 \pm 3,2	71,3 \pm 1,3	84,2 \pm 0,5	57,2 \pm 4,4	88,6 \pm 2,1	65,2 \pm 3,6
13,3	88,5 \pm 4,0	55,2 \pm 8,5	81,1 \pm 1,8	46,1 \pm 5,0	83,6 \pm 6,7	50,2 \pm 5,4
33,4	72,5 \pm 2,3	32,6 \pm 6,6	63,0 \pm 5,5	20,0 \pm 2,6	71,5 \pm 0,6	26,6 \pm 2,5
133,4	43,2 \pm 5,5	20,1 \pm 3,5	41,3 \pm 5,6	12,4 \pm 4,1	43,7 \pm 4,2	15,2 \pm 3,3

Tras el ajuste por regresión no lineal se calcularon los valores de IC_{50} de NT (Tabla 42).

Tabla 42. Valores de IC_{50} de NT en relación a los distintos metabolitos de NVP (valor estimado, (intervalo de confianza del 95 %)).

Metabolito	IC_{50} (μM)		Desplazamiento
	- Enzimas	+ Enzimas	
2-OH-NVP	44,40 (26,37-74,76)	16,39 (12,39-21,68)	2,71
3-OH-NVP	35,05 (20,30-60,54)	14,29 (11,07-18,43)	2,45
12-OH-NVP	39,85 (21,90-72,51)	15,42 (12,29-19,34)	2,58

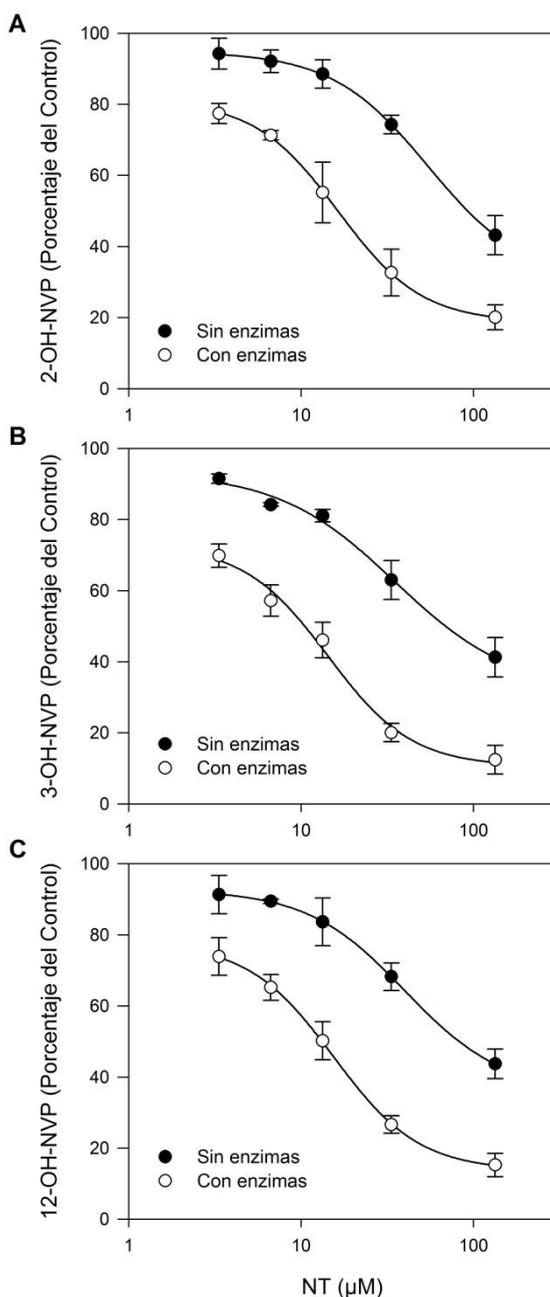


Figura 38. Representación gráfica de la inhibición de la formación de los metabolitos 2-OH-NVP (A), 3-OH-NVP (B) y 12-OH-NVP (C), en presencia y ausencia de sistema enzimático generador de NADPH durante la preincubación, en función de la concentración de NT.

De acuerdo con algunos autores, como Grimm *et al.* (140), un inhibidor puede considerarse tiempo-dependiente cuando, tras un período de preincubación de 30 minutos, el desplazamiento del valor de IC_{50} es igual o superior a 1,5 veces. Los resultados obtenidos muestran un desplazamiento superior a 1,5 para todos los metabolitos analizados, por lo que la NT puede considerarse un inhibidor tiempo-dependiente del metabolismo de la NVP.

En resumen, tras la realización de los estudios de caracterización de la inhibición de la NVP por la NT, los resultados obtenidos indican que la NT es un inhibidor reversible, de carácter competitivo y tiempo-dependiente, del metabolismo de la NVP en microsomas hepáticos de rata.

3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos humanos

Con el fin de confirmar si la inhibición del metabolismo de la NVP por parte de la NT se produce también en humanos, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* utilizando microsomas hepáticos humanos. En estos ensayos no pudo determinarse los cambios en la velocidad de desaparición de la NVP provocados por la NT, ya que su metabolismo en humanos es muy lento y al final del período de incubación los cambios en la concentración de NVP son mínimos. Por ello, sólo se estudió los cambios en la velocidad de formación de los metabolitos, expresados como porcentaje del control en función de la concentración de NT ensayada. En la Tabla 43 se resumen los resultados obtenidos y su representación gráfica se muestra en la Figura 39.

Tabla 43. Porcentaje de inhibición de la formación de los metabolitos de NVP (media \pm D.E.), en microsomas hepáticos humanos, en presencia de distintas concentraciones de NT (n = 4).

NT (μ M)	NVP (% Control)		
	2-OH-NVP	3-OH-NVP	12-OH-NVP
0,3	95 \pm 4	90 \pm 3	92 \pm 5
3,3	86 \pm 8	67 \pm 7	82 \pm 7
33	79 \pm 8	54 \pm 9	77 \pm 10

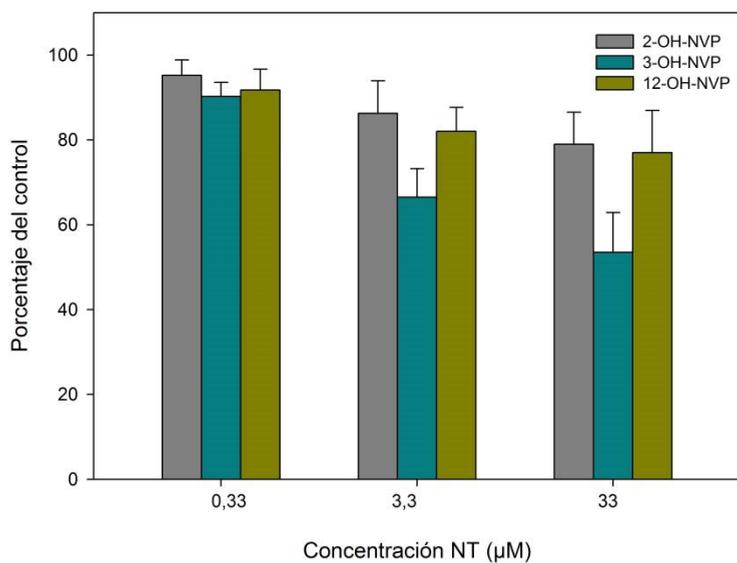


Figura 39. Representación gráfica de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos humanos.

DISCUSIÓN

1. Métodos analíticos

El método analítico utilizado en la mayoría de ocasiones para la determinación de la concentración de NVP y de sus metabolitos en muestras plasmáticas es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), empleándose para la detección principalmente detectores de luz ultravioleta (53,141,142) y, con menor frecuencia, espectrómetros de masas (143-145). En ocasiones, también se han empleado métodos inmunocromatográficos para determinar la presencia de NVP en fluidos corporales (146,147) e, incluso, la cromatografía en capa fina para detectar la NVP en sangre procedente de cordón umbilical (148).

Debido a su especificidad, rapidez y disponibilidad, el método analítico seleccionado para este trabajo ha sido la cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta. Se han desarrollado dos técnicas analíticas diferentes con el fin de detectar, por una parte, concentraciones de NVP en plasma y, por otra parte, concentraciones de 2-, 3- y 12-OH-NVP en muestras provenientes de microsomas hepáticos de ratas y de humanos.

En cuanto a la cuantificación de NT, se han publicado varios métodos analíticos basados en la técnica HPLC para su análisis en plasma. No obstante, estos métodos precisan volúmenes excesivamente grandes de plasma (0,5-1 ml), lo que dificulta su aplicación en animales de laboratorio de pequeño tamaño como las ratas (149,150), y requieren largos procesos de concentración de las muestras, a menos que se empleen equipos de elevado precio como es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (151,152). Para realizar este estudio se ha seleccionado un método de HPLC sencillo, sensible y específico desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación (139) que mediante una reacción de derivatización de la NT y el empleo de un

detector de fluorescencia permite cuantificar las concentraciones de NT utilizando volúmenes de plasma del orden de 50 μ l.

2. Ensayos *in vivo*

2.1. Estudio de la farmacocinética y la biodisponibilidad de la nevirapina

En relación a la disposición de la NVP en la rata (Tabla 10), cabe señalar que el volumen de distribución obtenido en los animales de experimentación (1,8 L/kg) es ligeramente superior al valor descrito en humanos ($V_d = 1,21$ L/Kg) (153). La relativa similitud en los valores del volumen de distribución de NVP en la rata y en humanos sugiere que la distribución del fármaco sigue pautas similares en ambas especies. Además, un valor de volumen de distribución superior a 1 L/kg indica que el fármaco se acumula en algún tejido del organismo, posiblemente en el tejido adiposo, ya que la NVP presenta una lipofilia relativamente elevada ($\log P = 2,05$ en octanol/agua) (41). Por otra parte, si se compara el aclaramiento del fármaco obtenido en ratas, 27,33 ml/min/kg, con el hallado en humanos, 0,71 ml/min/kg (50,154), se observa que la eliminación es mucho más rápida en ratas. En general, la eliminación de los fármacos es más rápida en la especie de pequeño tamaño que en las de mayor tamaño, siendo en muchos casos unas 6-7 veces más rápida en ratas que en humanos (155,156). En el caso de la NVP, no se dispone del aclaramiento en humanos (obtenido tras la administración intravenosa) y el valor recogido en la literatura (0,71 ml/min/kg) es un aclaramiento aparente, obtenido tras la administración oral. Utilizando este valor como referencia, el aclaramiento en la rata es aproximadamente 38 veces superior que en humanos.

Respecto a la absorción de la NVP en la rata, la Figura 20 permite apreciar que los niveles promedios de NVP obtenidos tras la administración por vía oral fueron similares a los obtenidos tras la administración subcutánea. De hecho, los valores de AUC (Tabla 10) fueron prácticamente iguales para ambas administraciones (918 y 920 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$), y ligeramente inferiores al valor obtenido tras la administración intravenosa (1.012 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$). Por otra parte, las concentraciones plasmáticas correspondientes a la administración intravenosa presentaron una caída más rápida al poco tiempo de la administración que las obtenidas tras la administración oral y subcutánea después de los correspondientes máximos. Ello fue debido a que, en el caso de las administraciones extravasales, todavía hay absorción residual del fármaco después del máximo de las curvas, por lo que la caída de los niveles es más lenta que la observada tras la administración intravenosa. Sin embargo, conforme avanza el tiempo las pendientes de las curvas se fueron aproximando. De hecho, los últimos puntos correspondientes a las administraciones extravasales mostraron una caída similar a la observada con la administración intravenosa. Debido a la citada absorción residual después del máximo de las curvas extravasales, los valores de semivida obtenidos con las administraciones oral y subcutánea (56,6 y 59,2 min, respectivamente) fueron ligeramente superiores al valor obtenido con la administración intravenosa (47,5 min), no siendo las diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

La absorción de NVP fue ligeramente más rápida por vía oral que por vía subcutánea, con valores medios de $t_{\text{máx}}$ de 80 min y 105 min, respectivamente, y valores normalizados de $C_{\text{máx}}$ de 5,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 4,88 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente. No obstante, los parámetros $C_{\text{máx}}$ y $t_{\text{máx}}$ obtenidos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 10).

Por lo que respecta al tiempo medio de permanencia de la NVP en el organismo (MRT), cabe indicar que, tal y como era de esperar, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la vía intravenosa y las vías extravasales (Tabla 10), ya que, en estas, el valor de MRT incluye al tiempo medio de absorción (MAT).

La dosis de NVP administrada por vía oral a las ratas (8 mg) se eligió con el criterio de obtener valores de $C_{m\acute{a}x}$ (aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$) semejantes a los descritos en los pacientes que reciben este fármaco: 6,69 $\mu\text{g/ml}$ para una dosis única de 400 mg y 5,74 $\mu\text{g/ml}$ para dosis múltiples de 200 mg dos veces al día (51). Sin embargo, en el caso de las administraciones intravenosa y subcutánea, la dosis se redujo a 4 mg debido a la limitada solubilidad de la NVP en el vehículo empleado.

La biodisponibilidad oral y subcutánea de la NVP se estimó mediante la comparación de los valores medios de AUC correspondientes a estas administraciones con el valor medio de AUC obtenido tras la administración intravenosa (previa normalización para una dosis de 8 mg). Así, la biodisponibilidad estimada para la vía oral fue de, aproximadamente, un 91 %, obteniéndose prácticamente el mismo valor de biodisponibilidad tras la administración por vía subcutánea. Por tanto, la biodisponibilidad de NVP en las ratas fue prácticamente completa, tanto por vía oral como por vía subcutánea. Se ha descrito que la biodisponibilidad oral de NVP en humanos es del $93 \pm 9 \%$ cuando se administra en forma de comprimidos, y del $91 \pm 8 \%$ cuando se administra en forma de solución oral (49), valores prácticamente coincidentes con la biodisponibilidad oral obtenida en este estudio. No ha sido posible localizar información relativa a la administración subcutánea de NVP en humanos. La similitud entre los valores de biodisponibilidad oral de NVP

obtenidos en ratas y humanos indica que la rata constituye un animal de laboratorio adecuado para efectuar estudios relacionados con la absorción de este fármaco, con una elevada probabilidad de que los resultados sean extrapolables a la especie humana.

Finalmente, como parte de este estudio se administró un grupo adicional de ratas con el fin de evaluar el efecto de la anestesia en la farmacocinética de la NVP. La presencia de anestesia dio lugar a una caída de concentraciones más lenta que la obtenida en ratas no anestesiadas, debido a una eliminación más lenta (Figura 21). Todos los parámetros farmacocinéticos comparados entre ambos grupos resultaron estadísticamente diferentes (Tabla 12), por lo que puede concluirse que la anestesia influye de manera significativa en la eliminación de la NVP.

2.2. Estudio de la absorción de la nevirapina en distintos segmentos gastrointestinales

La administración de NVP en lugares específicos del tracto gastrointestinal mostró diferencias en la velocidad de absorción (Figura 22). La absorción más rápida tuvo lugar en el duodeno, seguida de íleon, colon y, en último lugar, estómago. La comparación estadística de los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{last} (Tabla 14) no mostró diferencias estadísticamente significativas en el caso de las administraciones por vía intraileal e intracolónica, mientras que las administraciones oral e intraduodenal dieron lugar a los valores más bajos y más altos de estos parámetros, respectivamente. Por otra parte, las cantidades remanentes de NVP obtenidas en cada segmento gastrointesinal al finalizar el estudio confirmaron los resultados obtenidos a partir de las curvas plasmáticas

(Figura 23). De hecho, la cantidad remanente de NVP en el estómago fue aproximadamente un 80 % de la dosis administrada mientras que en el caso del duodeno fue un 40 %.

Cabe señalar que la absorción de NVP ha sido también estudiada en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal humano utilizando cápsulas activadas por control remoto y gammagrafía (157). En dicho estudio se observó absorción de NVP en los cuatro segmentos gastrointestinales que se evaluaron (yeyuno, íleon, colon ascendente y colon descendente), decreciendo la velocidad de absorción desde el yeyuno hasta el colon descendente. Esta tendencia en la absorción de NVP a lo largo del tracto gastrointestinal concuerda con lo observado en el presente estudio realizado en ratas, con una disminución en la absorción de NVP desde el duodeno hasta el colon.

El hecho de que la NVP se absorba más rápidamente en el duodeno podría atribuirse a la presencia de bilis, ya que la NVP es un fármaco lipófilo con baja solubilidad en agua (0,1 mg/ml) (40), por lo que la bilis podría aumentar la absorción debido a sus propiedades emulsionantes. Para evaluar la influencia de la bilis en la absorción de la NVP se incluyeron en el estudio dos grupos adicionales de ratas con el lumen intestinal lavado para eliminar los restos de bilis (grupos 9 y 10). En la interpretación del efecto de la bilis sobre la absorción de la NVP en el duodeno de las ratas se compararon los niveles plasmáticos obtenidos en los grupos 6 (colédoco ligado, bilis remanente en duodeno), 9 (colédoco ligado, sin bilis remanente en duodeno) y 10 (colédoco no ligado, sin bilis remanente en duodeno). En las ratas, el aporte de bilis al lumen intestinal a través del colédoco es un proceso más o menos continuo, ya que carecen de vesícula biliar. Por ello, la presencia de bilis en el duodeno durante el estudio de absorción debía ser mayor en los animales del grupo 10 (colédoco no

ligado), menor en las ratas del grupo 6 (colédoco ligado, bilis remanente) y prácticamente inexistente en las ratas del grupo 9 (colédoco ligado, sin bilis remanente). Los resultados experimentales confirmaron que la velocidad de absorción de la NVP en el duodeno seguía el orden: grupo 10 > grupo 6 > grupo 9 (Figura 24, Tabla 16), lo que indica que la presencia de bilis en el duodeno favorece la absorción de este fármaco.

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio corroboran que la rata es un modelo animal útil para llevar a cabo estudios sobre la absorción de este fármaco, ya que las diferencias en la absorción de la NVP en distintos segmentos intestinales de la rata se correspondieron con las diferencias descritas en humanos. Además, se confirmó que la bilis juega un papel promotor en la absorción de este fármaco.

2.3. Estudio de la interacción farmacocinética entre NVP y NT

2.3.1. Elección de las dosis ensayadas

Las dosis de NVP y NT utilizadas en este estudio fueron seleccionados con el objetivo de obtener concentraciones plasmáticas en ratas similares a las descritas en humanos cuando se usan dosis terapéuticas de estos medicamentos.

Por lo que respecta a la NVP, se mantuvo la dosis establecida en el primer estudio, 8 mg, que, en esta ocasión, dio lugar a un valor medio de $C_{m\acute{a}x}$ de 4,10 $\mu\text{g/ml}$ tras su administración por vía oral. Esta pequeña variación en el valor de $C_{m\acute{a}x}$ obtenido (5,05 vs. 4,10 $\mu\text{g/ml}$) podría ser debida a que los estudios se realizaron en distintos periodos de tiempo. Del mismo modo que en el primer

estudio, la dosis de NVP administrada por vía intravenosa se redujo a la mitad debido a su limitada solubilidad en el vehículo. Además, esta reducción de dosis evitó la obtención de elevadas concentraciones plasmáticas. De hecho, las concentraciones plasmáticas de NVP obtenidas tras alcanzarse el equilibrio en la distribución (aproximadamente a los 20-40 min) fueron inferiores a 10 µg/ml.

En el caso de la administración intraduodenal de NT, se utilizó una dosis de 5 mg, obteniéndose un valor de $C_{m\acute{a}x}$ (122 ng/ml) dentro del intervalo óptimo de 58-148 ng/ml descrito en humanos (158). Con el fin de mantener la misma relación entre la dosis intravenosa e intraduodenal que en el caso de la administración de NVP, la dosis intravenosa de NT (2,5 mg) fue la mitad de la empleada por vía intraduodenal.

2.3.2. Administración oral de NVP

La coadministración por vía oral de NVP y NT dio lugar a un incremento de los niveles plasmáticos de NVP (Figura 26), detectándose diferencias estadísticamente significativas en los valores de todos los parámetros farmacocinéticos estudiados (Tabla 18). Por lo que respecta a los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{last} , se obtuvieron incrementos de aproximadamente 2 y 3 veces en comparación con el grupo control. Del mismo modo, los valores de MRT y $t_{m\acute{a}x}$ fueron 2 y 3 veces superiores. Estos resultados indican la existencia de una interacción farmacocinética entre NVP y NT tras su administración por vía oral.

En cuanto a la NT, los niveles plasmáticos alcanzados tras su administración por vía oral no pudieron cuantificarse y, por tanto, los efectos de la interacción sobre los parámetros farmacocinéticos de dicho fármaco no se evaluaron. Con

el fin de confirmar los efectos de la NT sobre la farmacocinética de la NVP, así como para evaluar los efectos de la NVP sobre la farmacocinética de la NT, en los siguientes grupos de animales las administraciones se llevaron a cabo por vía intraduodenal, ya que estudios previos habían mostrado una buena absorción duodenal de NVP y de NT.

2.3.3. Administración intraduodenal de NVP

Las concentraciones plasmáticas de NVP alcanzadas tras su administración por vía intraduodenal fueron mayores en presencia de NT que en su ausencia (Figura 27). De hecho, el incremento en los niveles de NVP provocado por la administración i.d. de NT fue más pronunciado que el observado tras su administración por vía oral, registrándose valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC_{last} 5 veces superiores. Los valores de $t_{m\acute{a}x}$ y MRT_{last} de NVP también fueron significativamente superiores en presencia de NT, y similares a los observados cuando ambos fármacos fueron coadministrados por vía oral (Tabla 20).

Sin embargo, cabe señalar que la absorción de NVP fue más rápida cuando la NVP se administró por vía oral (63,2 min) que por vía intraduodenal (164 min). Este hecho podría atribuirse a que el fármaco posee una solubilidad favorable en el medio ácido del estómago, ya que la NVP es una base débil con solubilidad dependiente del pH del medio. Aunque en los estudios anteriores se observó que la NVP se absorbe mejor en el duodeno que en el estómago, la administración oral da lugar a una mayor fracción disuelta cuando el fármaco alcanza el duodeno después de pasar a través del estómago que cuando se inyecta directamente en el duodeno. Como consecuencia de esta superior fracción de fármaco disuelto, se obtiene una absorción más rápida después de

la administración oral que tras la administración intraduodenal. Sin embargo, la cantidad absorbida es similar, ya que el valor AUC_{inf} es prácticamente el mismo para ambas vías de administración (873 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$ y 877 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$).

Por otra parte, para confirmar que la interacción entre la NVP y la NT no ocurre a nivel de la absorción, ambos fármacos se administraron por diferentes vías (NVP i.d. y NT i.v., NVP i.v. y NT i.d.). En un primer estudio, se administró la NVP por vía intraduodenal y la NT por vía intravenosa, obteniéndose concentraciones plasmáticas superiores a las alcanzadas en los animales del grupo control (Figura 27) y detectándose diferencias significativas en los valores de $C_{m\acute{a}x}$ (Tabla 20). Estos resultados sugerían que la interacción no se producía a nivel de la absorción, lo cual se confirmó en el siguiente grupo de animales (NVP i.v. y NT i.d.).

2.3.4. Administración intravenosa de NVP

Los niveles plasmáticos obtenidos tras la administración de NVP por vía intravenosa en presencia de NT i.d. (Figura 28) mostraron una disminución de 7 veces en el valor del aclaramiento, un aumento de 7 veces en los valores de $t_{1/2}$ y AUC_{inf} , y un aumento de 8 veces en el valor de MRT_{inf} como consecuencia de la administración de NT (Tabla 22).

En estos grupos de animales (grupos 16 y 17) la NVP se administró por vía intravenosa, por lo que las variaciones en los parámetros farmacocinéticos provocadas por la coadministración de NT no están relacionadas con el proceso de absorción de la NVP, sino con la disposición de la misma. La marcada disminución en el aclaramiento provocada por la coadministración de NT (7

veces menor) indica una eliminación más lenta de la NVP. Esta disminución de la tasa de eliminación de NVP podría atribuirse a una inhibición de su metabolismo hepático causado por la NT. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo los estudios *in vitro* con microsomas hepáticos de rata.

2.3.5. Administración intraduodenal de NT

La coadministración de NT i.d. y NVP i.d. o i.v. dio lugar a niveles plasmáticos ligeramente superiores a los alcanzados cuando la NT se administró sin NVP (Figura 29). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos de NT obtenidos en ausencia y presencia de NVP, debido a la amplia variabilidad interindividual (Tabla 24). Con el fin de confirmar que la NVP no afecta a la farmacocinética de la NT, se utilizaron dos grupos adicionales de animales a los que se administró la NT por vía intravenosa.

2.3.6. Administración intravenosa de NT

Las concentraciones plasmáticas de NT obtenidas tras la administración por vía intravenosa fueron similares en ausencia y en presencia de NVP i.d. (Figura 30) y no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de los parámetros farmacocinéticos (Tabla 26). Estos resultados confirmaron que la NVP no afecta a la farmacocinética de la NT.

3. Ensayos *in vitro*

3.1. Cinética del metabolismo de NVP y sus metabolitos en microsomas hepáticos de rata

Con el fin de estudiar la cinética del metabolismo de la NVP, se determinaron las velocidades de desaparición de la NVP y de formación de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP, utilizando microsomas hepáticos de rata y distintas concentraciones iniciales de NVP (Figura 31). Las curvas obtenidas mostraron el perfil típico de la cinética de Michaelis-Menten, definida por los parámetros $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima de la reacción enzimática) y K_m (concentración de sustrato requerida para obtener una velocidad que sea la mitad de $V_{\text{máx}}$). En estos estudios, el metabolito mayoritario de NVP fue el 12-OH-NVP, ya que presentó una mayor velocidad de formación, seguido del 2-OH-NVP y, por último, el 3-OH-NVP (Tabla 28). La suma de las velocidades máximas de formación de los tres metabolitos analizados debería aproximarse a la velocidad máxima de desaparición de NVP y, de hecho, es lo que ocurre (2,12 vs. 2,58 nmoles/(min/mg proteína)). La ligera diferencia entre ambos valores podría deberse a que no se ha contemplado la formación del metabolito 8-OH-NVP, el cual, a pesar de ser el metabolito minoritario, podría influir en el resultado final. Estos resultados coinciden con los obtenidos por algunos autores que identifican al metabolito 12-OH-NVP como el mayoritario en plasma de rata (53), en muestras de hígado de ratas macho (159) y en plasma humano (50). Cabe señalar que se ha atribuido a este metabolito una de las reacciones adversas más características de la NVP, el exantema. Se ha observado que tras una primera oxidación del metabolito tiene lugar la formación del sulfato bencílico (12-OH-NVP sulfato), el cual posee suficiente reactividad química para unirse de forma covalente a las proteínas de la piel

(160). Respecto al resto de metabolitos, los resultados obtenidos en este estudio se corresponden con los mostrados recientemente por Pinherio *et al.* (159) en hígados de ratas, con el siguiente orden de abundancia: 12-OH-NVP > 2-OH-NVP > 3-OH-NVP > 8-OH-NVP.

En estudios realizados con microsomas hepáticos humanos se ha observado que, en la mayoría de ocasiones, los dos metabolitos mayoritarios han sido el 2- y el 12-OH-NVP, aunque, en otras ocasiones, el mayoritario ha sido el 3-OH-NVP. En estos estudios, el metabolito minoritario ha sido, en todas las ocasiones, el 8-OH-NVP (54). En resumen, tanto en ratas como en humanos el metabolito minoritario es el 8-OH-NVP, siendo indetectable en algunos estudios realizados en ratas (53).

En la cinética de Michaelis-Menten, el parámetro K_m representa, aproximadamente, la constante de disociación del complejo enzima-sustrato, de modo que cuanto menor sea el valor de K_m mayor es la afinidad del sustrato por la enzima. De acuerdo con esto, la formación del metabolito 3-OH-NVP fue la que presentó una menor afinidad entre la NVP y la enzima responsable de su formación, mientras que la NVP mostró mayor afinidad por las enzimas responsables de la formación de los metabolitos 2- y 12-OH-NVP (Tabla 28).

3.2. Inhibición del metabolismo de la NVP por fármacos antidepresivos en microsomas hepáticos de rata

En este estudio se determinó el potencial efecto inhibitorio de la NT y de otros antidepresivos pertenecientes al grupo de los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SRT, FLUOX y FLUVOX) sobre el metabolismo de la

NVP. En esta ocasión se ensayaron distintas concentraciones de los diferentes antidepresivos mientras que la concentración de NVP se mantuvo fija en 5 µg/ml (18,8 µM). La concentración de NVP fue seleccionada teniendo en cuenta el valor de $C_{m\acute{a}x}$ obtenido en ratas tras la administración oral de NVP (5,05 µg/ml), que fue similar al que se alcanza en humanos (5,74 µg/ml) (51).

Tal y como se esperaba tras de la realización de los estudios *in vivo*, la NT inhibió el metabolismo de la NVP en el intervalo de concentraciones de NT de 0,1-50 µg/ml (0,3-166,8 µM). No obstante, no se alcanzó una completa inhibición del metabolismo de la NVP, quedando un 10 % sin inhibir, lo que sugiere que algunas rutas metabólicas de la NVP no son inhibidas por la NT (Figura 32). Respecto a los metabolitos de NVP, cabe señalar que la formación de 2- y 3-OH-NVP fue inhibida por la NT con similar intensidad, ya que los valores de IC_{50} fueron prácticamente idénticos (4,67 y 4,68 µM, Tabla 33). En el caso de la formación de 12-OH-NVP, la inhibición de la NT fue ligeramente más potente ($IC_{50} = 4,46$ µM, Tabla 33).

Las principales isoformas del CYP450 que intervienen en el metabolismo de la NVP son la 3A4 (formación de 2-, 8- y 12-OH-NVP), la 2B6 (formación de 3- y 8-OH-NVP), la 2D6 (formación de 8- y 12-OH-NVP) y la 2C9 (formación de 12-OH-NVP). Por otra parte, la principal isoforma del CYP450 involucrada en el metabolismo de la NT es la 2D6, implicada también en la formación de los metabolitos 12- y 8-OH-NVP como ya se ha indicado. Otra isoenzima relacionada con el metabolismo de la NT, y a su vez involucrada en la formación de los metabolitos 2-, 8- y 12-OH-NVP, es la isoforma 3A4. Por tanto, CYP2D6 y CYP3A4 son isoenzimas involucradas, probablemente, en la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT. Los resultados obtenidos muestran también una inhibición de 3-OH-NVP, metabolito cuya formación está mediada

exclusivamente por el CYP2B6, isoenzima que no está involucrada en el metabolismo de la NT.

Por otra parte, se ha observado una potencia inhibitoria de la FLUOX similar a la obtenida con NT, ya que los valores de IC_{50} correspondientes a la desaparición de NVP y formación de sus metabolitos son semejantes para ambos antidepresivos. En cambio, los otros antidepresivos estudiados, SRT y FLUVOX, presentaron un potencial inhibitor aproximadamente 11 y 5 veces inferior al de la NT, respectivamente (Tabla 33).

Las interacciones farmacocinéticas FLUOX-NVP y FLUVOX-NVP han sido estudiadas por de Maat *et al.* en humanos (123). En el estudio de la interacción FLUOX-NVP, estos autores observaron una reducción significativa en los niveles de FLUOX y norfluoxetina, sin modificación apreciable de la farmacocinética de la NVP. En el caso de la interacción FLUVOX-NVP, detectaron una reducción en el aclaramiento de NVP que conllevó un incremento en sus concentraciones, sin modificaciones significativas en las concentraciones de FLUVOX.

Por tanto, la inhibición del metabolismo de la NVP por la FLUOX observada *in vitro* con microsomas hepáticos de rata no ha sido detectada en los estudios *in vivo* realizados en humanos. Sin embargo, la inhibición debida a la FLUVOX si que ha sido observada en dichos estudios *in vivo*. En cuanto a la inhibición del metabolismo de la NVP por parte de la NT y la SRT, no se han localizado estudios realizados en humanos en los que se haya evaluado estas interacciones.

3.3. Caracterización de la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos de rata

El estudio detallado de las características de la inhibición del metabolismo de la NVP por parte de la NT se dividió en dos partes. Por un lado, se estudió si la inhibición era de tipo competitivo y, por otro, si era tiempo-dependiente.

Los inhibidores son moléculas que pueden afectar a la actividad de las enzimas de forma reversible, es decir, formando interacciones con la enzima débiles basadas en fuerzas no covalentes, o irreversible, formando interacciones fuertes y estables que sólo pueden ser eliminadas químicamente. A su vez, los inhibidores reversibles se pueden clasificar como competitivos, no competitivos y acompetitivos. En el apartado de resultados se ha concluido que la NT es un inhibidor competitivo observando las variaciones de los parámetros cinéticos K_m y $V_{m\acute{a}x}$ en función de la concentración del inhibidor. Un inhibidor competitivo compite con el sustrato para unirse a la enzima y, debido a la especificidad del sitio activo de la enzima, un inhibidor competitivo clásico debería tener una estructura química similar al sustrato de la enzima. Sin embargo, esto no es lo que ocurre en el caso de la NVP y de la NT, sus estructuras químicas no pueden considerarse análogas por lo que es probable que la NT se una a la enzima en una zona distinta a la del sitio activo, provocando cambios en el mismo e impidiendo la unión del sustrato, en cuyo caso habría que considerar a la NT como inhibidor competitivo no clásico.

Los parámetros que definen el potencial inhibidor de un fármaco son K_i e IC_{50} . El valor K_i se corresponde con la concentración de inhibidor requerida para disminuir el valor de $V_{m\acute{a}x}$ obtenido en su ausencia a la mitad, utilizando concentraciones bajas de sustrato. En cambio, el valor IC_{50} se corresponde con la concentración de inhibidor necesaria para obtener una velocidad que sea la

mitad de la alcanzada en su ausencia, a una concentración determinada de sustrato. En otras palabras, el valor IC_{50} de un inhibidor depende de la concentración de sustrato utilizada en el ensayo. Sin embargo, el valor K_i es independiente de la concentración de sustrato, por lo que se le considera un valor más adecuado para caracterizar la potencia inhibitoria que el valor IC_{50} .

Cuando se comparan valores de IC_{50} o de K_i de distintos inhibidores, para un mismo sustrato, un valor más pequeño indica mayor afinidad del inhibidor por la enzima y, por tanto, mayor potencia inhibitoria. En este estudio se han obtenido valores de IC_{50} y K_i correspondientes a la NT en relación a la inhibición de la formación de distintos metabolitos de NVP. Tanto los valores de IC_{50} como los de K_i fueron semejantes para los distintos metabolitos (valores de IC_{50} : 4,67, 4,68 y 4,46 μ M, valores de K_i : 4,01, 3,97 y 4,40 μ M, correspondientes a los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP, respectivamente).

En la segunda parte de este estudio se evaluó si la inhibición de la NVP por parte de la NT era tiempo-dependiente, es decir, si el efecto inhibitorio se incrementaba como consecuencia de un mayor tiempo de contacto del sistema enzimático con el inhibidor. La evaluación de la inhibición tiempo-dependiente está recomendada por la FDA en la guía de estudios de interacciones de fármacos (161). Cuando se observa una inhibición tiempo-dependiente, ello puede ser consecuencia de un mecanismo de inhibición irreversible o cuasi-irreversible, o bien puede indicar que el verdadero agente inhibitorio es un metabolito del supuesto fármaco inhibitorio. Las consecuencias de una inhibición irreversible se consideran más serias que las producidas por una reversible, ya que la enzima inactivada tiene que volverse a sintetizar antes de que la actividad se restaure. Además, normalmente implica la formación de una unión

covalente entre el metabolito y la enzima, que puede conducir a la formación de haptenos y desencadenar una respuesta autoinmune.

En los experimentos de punto único (*single point*), las concentraciones de NVP y NT se mantuvieron fijas en 751,03 μM (200 $\mu\text{g/ml}$) y 33,35 μM (10 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente. En estos estudios, las condiciones del ensayo deben minimizar la inhibición de tipo competitiva, por ello la concentración de NVP empleada fue 4 veces el valor de K_m (188 μM) y el tiempo de incubación se redujo a 5 minutos. Con el fin de establecer la concentración de NT más adecuada para estos estudios, se investigó previamente su metabolismo utilizando microsomas hepáticos de rata. Se utilizaron tres concentraciones iniciales de NT (3,33, 13,3 y 33,4 μM) y se determinó el porcentaje metabolizado a distintos tiempos. En el caso de la concentración inicial de 3,33 μM , se observó que la totalidad de NT (100 %) había sido metabolizada en 5 minutos, mientras que con la concentración inicial de 13,3 μM , se metabolizó un 50 %. Sin embargo, con la concentración inicial de 33,4 μM (10 $\mu\text{g/ml}$), el porcentaje metabolizado fue solo un 6 % a los 5 minutos y un 40 % a los 30 minutos. Por ello, para matizar las diferencias entre las muestras preincubadas en presencia de enzimas y las preincubadas en su ausencia, se escogió una concentración de NT de 33,4 μM (10 $\mu\text{g/ml}$), un tiempo de preincubación de 30 min y un tiempo de incubación con NVP de 5 minutos.

Los resultados obtenidos en estos ensayos mostraron que la inhibición de la NVP por la NT es, en parte, tiempo-dependiente, obteniéndose unos porcentajes de inhibición tiempo-dependiente de 63,02 %, 68,99 % y 63,31 %, correspondiente a los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP, respectivamente (Tabla 40).

El segundo tipo de experimentos destinados al estudio de la inhibición tiempo-dependiente fueron los ensayos de desplazamiento de IC_{50} (*IC₅₀ Shift*). Este tipo de ensayos aportan más información que los ensayos de punto único y pueden usarse para predecir el riesgo de interacción farmacológica *in vivo* (162). Sin embargo, se recomienda, en general, llevar a cabo inicialmente ensayos de punto único para detectar el metabolismo tiempo-dependiente, por ser de realización más sencilla.

Estos ensayos se realizaron en las mismas condiciones descritas para los experimentos de punto único, utilizando una concentración de NVP de 751,03 μ M ($4 \times K_m$). Sin embargo, la concentración de NT se varió en el intervalo 3,34-133,40 μ M. El objetivo principal de estos estudios es determinar si se produce un desplazamiento en el valor de IC_{50} del inhibidor cuando se somete a una preincubación previa con el sistema enzimático completo (incluyendo los microsomas y el sistema generador de NADPH), cuantificando dicho desplazamiento mediante el cociente de los valores IC_{50} obtenidos. Cuanto mayor es el desplazamiento del valor de IC_{50} mayor importancia cobra el componente tiempo-dependiente en la inhibición global provocada por el inhibidor. Se considera que, en general, un valor de desplazamiento superior a 1,5 veces es una indicación clara de inhibición tiempo-dependiente (140). Los resultados obtenidos mostraron un desplazamiento similar en el valor de IC_{50} de la NT en relación a la formación de los metabolitos 2-, 3- y 12-OH-NVP (2,71, 2,45 y 2,58 veces, respectivamente), que fue superior a 1,5 veces (Tabla 42).

En resumen, tras la realización de los estudios de caracterización de la inhibición de la NVP por la NT, los resultados obtenidos indican que la NT es un inhibidor reversible, de carácter competitivo y tiempo-dependiente, del metabolismo de la NVP en microsomas hepáticos de rata.

3.4. Inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en microsomas hepáticos humanos

Utilizando microsomas hepáticos humanos se confirmó, también, que la NT inhibe el metabolismo de la NVP. Sin embargo, en este caso la inhibición fue menos intensa que la observada en microsomas de rata. El metabolito inhibido en mayor proporción fue el 3-OH-NVP, seguido del 12-OH-NVP y el 2-OH-NVP (Tabla 43). Del mismo modo que se ha indicado anteriormente, las isoenzimas CYP2D6 y CYP3A4 parecen ser las involucradas en la inhibición del metabolismo de la NVP por la NT en humanos.

Aunque los resultados obtenidos utilizando microsomas hepáticos humanos mostraron una marcada inhibición del metabolismo de la NVP por la NT, la extrapolación directa de estos resultados a humanos no es posible. Sería necesario llevar a cabo estudios farmacocinéticos *in vivo* con el fin de evaluar la relevancia clínica de esta interacción.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

1. Los procesos de distribución y absorción de la NVP en ratas y en humanos siguen pautas similares, con un volumen de distribución, biodisponibilidad y absorción a lo largo del tracto gastrointestinal (duodeno > íleon > colon > estómago) similares en ambas especies. Estos resultados indican que la rata constituye un animal de laboratorio adecuado para efectuar estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos con distintas formas farmacéuticas de NVP, con una elevada probabilidad de que los resultados obtenidos sean extrapolables a la especie humana.
2. La coadministración de NVP y NT dio lugar a un incremento en los niveles plasmáticos de NVP, con valores de $C_{m\acute{a}x}$ y AUC varias veces superiores a los obtenidos cuando dicho fármaco no se coadministra con NT. Este hecho es consecuencia de la disminución del aclaramiento de la NVP provocada por la NT. Sin embargo, no se han observado alteraciones en la farmacocinética de la NT debidas a la coadministración de NVP.
3. Los ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos de rata confirmaron que la NT inhibe el metabolismo de la NVP, inhibiendo en igual medida la formación de los tres principales metabolitos (2-, 3- y 12-OH-NVP). Por otra parte, el estudio de las características de esta inhibición puso de manifiesto que se trata de una inhibición de tipo competitivo y tiempo-dependiente.
4. La potencia inhibitoria de NT y FLUOX sobre el metabolismo de la NVP es similar (valores de IC_{50} : 3,37 y 3,88 μM , respectivamente). Sin

embargo, las potencias inhibitorias de SRT y FLUVOX son aproximadamente 11 y 5 veces inferiores a la de la NT, respectivamente.

5. La NT también inhibe la formación de los metabolitos de la NVP en microsomas hepáticos humanos. No obstante, la magnitud de esta inhibición es menor que la obtenida con microsomas hepáticos de rata. Se precisan estudios farmacocinéticos *in vivo* para poder evaluar la relevancia clínica de esta interacción.

1. Distribution and absorption of NVP in rats and humans follow similar patterns, with values of volume of distribution, bioavailability and absorption from the gastrointestinal tract (duodenum > ileum > colon > stomach) being comparable in both species. These results indicate that the rat is a suitable laboratory animal to perform pharmacokinetic and biopharmaceutical studies with different pharmaceutical forms of NVP, in such a way that the obtained results could be extrapolated to humans.
2. The co-administration of NVP and NT gave rise to higher NVP plasma levels, with several times higher C_{max} and AUC values than those obtained when this drug is not co-administered with NT. This fact is a consequence of decreased NVP clearance caused by NT. However, no alterations in the pharmacokinetics of NT have been observed due to NVP co-administration.
3. The *in vitro* assays using rat liver microsomes confirmed an inhibitory effect of NT on the NVP metabolism; the three major metabolites (2-, 3- and 12- OH-NVP) being inhibited to a similar extent. Moreover, the study of the characteristics of this inhibition showed it to be a competitive and time-dependent.
4. The inhibitory potency of NT and FLUOX on the NVP metabolism is similar (IC_{50} values: 3.37 and 3.88 μM , respectively). However, SRT and FLUVOX are about 11 and 5 times less potent than NT, respectively.

5. NT also inhibits the formation of NVP metabolites in human liver microsomes. However, the magnitude of this inhibition is lower than that obtained with rat liver microsomes. *In vivo* pharmacokinetic studies are required to assess the clinical relevance of this interaction.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Carretero M. Terapia combinada antirretroviral. *Offarm* 2003;22(3):146-148.
- (2) Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 6):1253-1265.
- (3) Bock PJ, Markovitz DM. Infection with HIV-2. *AIDS* 2001;15 Suppl 5:S35-45.
- (4) Castillo JAL. Infección-enfermedad por VIH/SIDA. *Medisan* 2004;8(4):49-63.
- (5) De Leys R, Vanderborgh B, Vanden Haesevelde M, Heyndrickx L, van Geel A, Wauters C, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* 1990;64(3):1207-1216.
- (6) Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol* 1994;68(3):1581-1585.
- (7) Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, et al. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 1997;11(4):493-498.
- (8) Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 1998;4(9):1032-1037.
- (9) Vallari A, Bodelle P, Ngansop C, Makamche F, Ndembi N, Mbanya D, et al. Four new HIV-1 group N isolates from Cameroon: Prevalence continues to be low. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010;26(1):109-115.
- (10) Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009;15(8):871-872.
- (11) Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol* 2011;85(3):1403-1407.
- (12) Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011;1(1):a006841.

-
- (13) ONUSIDA. Estadísticas mundiales 2014. Available at: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20140716_FactSheet_es_0.pdf. Accessed 8 Junio, 2015.
- (14) ONUSIDA. Vivir en un mundo con VIH y SIDA : información para el personal de las Naciones Unidas y sus familias. 2004; Available at: http://data.unaids.org/Publications/IRC-pub06/jc975-livinginworldaids_es.pdf. Accessed 10 Junio, 2015.
- (15) Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med* 1993;328(5):327-335.
- (16) Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68(7):4650-4655.
- (17) McMichael AJ, Borrow P, Tomaras GD, Goonetilleke N, Haynes BF. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2010;10(1):11-23.
- (18) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373(6510):123-126.
- (19) Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996;272(5265):1167-1170.
- (20) Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997;126(12):946-954.
- (21) Kahn JO, Walker BD. Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N Engl J Med* 1998;339(1):33-39.
- (22) Schacker T, Collier AC, Hughes J, Shea T, Corey L. Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1996;125(4):257-264.
- (23) Dorrucchi M, Rezza G, Vlahov D, Pezzotti P, Sinicco A, Nicolosi A, et al. Clinical characteristics and prognostic value of acute retroviral syndrome

- among injecting drug users. Italian Seroconversion Study. *AIDS* 1995;9(6):597-604.
- (24) Henrard DR, Phillips JF, Muenz LR, Blattner WA, Wiesner D, Eyster ME, et al. Natural history of HIV-1 cell-free viremia. *JAMA* 1995;274(7):554-558.
- (25) Penzak SR, Reddy YS, Grimsley SR. Depression in patients with HIV infection. *Am J Health Syst Pharm* 2000;57(4):376-86; quiz 387-9.
- (26) Gonzalez JS, Batchelder AW, Psaros C, Safren SA. Depression and HIV/AIDS treatment nonadherence: a review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2011;58(2):181-187.
- (27) Justice AC. Prioritizing primary care in HIV: comorbidity, toxicity, and demography. *Top HIV Med* 2006-2007;14(5):159-163.
- (28) Pumarola T. VIH y laboratorio. Determinaciones diagnósticas. *Ed Cont Lab Clín* 2009;13:11-21.
- (29) Delgado R. Características virológicas del VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(1):58-65.
- (30) Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 2005;34(4):233-244.
- (31) Panos G, Samonis G, Alexiou VG, Kavarnou GA, Charatsis G, Falagas ME. Mortality and morbidity of HIV infected patients receiving HAART: a cohort study. *Curr HIV Res* 2008;6(3):257-260.
- (32) Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, et al. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis* 2008;197(8):1133-1144.
- (33) Wilkin TJ, Gulick RM, Mayer KH. When to Start Antiretroviral Therapy? *Clinical Infectious Diseases* 2008;47(12):1580-1586.
- (34) Panel de Expertos de Gesida y Plan Nacional sobre el Sida. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. 2015; Available at: <http://www.gesida->

- seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2015/gesida-guiasclinicas-2015-tar.pdf. Accessed Junio 11, 2015.
- (35) Ribera E, Tuset M, Martin M, del Cacho E. Characteristics of antiretroviral drugs. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29(5):362-391.
- (36) Messiaen P, Wensing AM, Fun A, Nijhuis M, Brusselaers N, Vandekerckhove L. Clinical use of HIV integrase inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8(1):e52562.
- (37) Fontas E, van Leth F, Sabin CA, Friis-Moller N, Rickenbach M, d'Arminio Monforte A, et al. Lipid profiles in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: are different antiretroviral drugs associated with different lipid profiles? *J Infect Dis* 2004;189(6):1056-1074.
- (38) Stein JH. Dyslipidemia in the era of HIV protease inhibitors. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45(4):293-304.
- (39) Parienti JJ, Massari V, Rey D, Poubeau P, Verdon R, SIROCCO study team. Efavirenz to nevirapine switch in HIV-1-infected patients with dyslipidemia: a randomized, controlled study. *Clin Infect Dis* 2007;45(2):263-266.
- (40) Cheeseman SH, Hattox SE, McLaughlin MM, Koup RA, Andrews C, Bova CA, et al. Pharmacokinetics of nevirapine: initial single-rising-dose study in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37(2):178-182.
- (41) Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernas H, Hussain AS, et al. Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm* 2004;1(1):85-96.
- (42) Ren J, Bird LE, Chamberlain PP, Stewart-Jones GB, Stuart DI, Stammers DK. Structure of HIV-2 reverse transcriptase at 2.35-Å resolution and the mechanism of resistance to non-nucleoside inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(22):14410-14415.
- (43) Cohen CJ, Molina JM, Cassetti I, Chetchotisakd P, Lazzarin A, Orkin C, et al. Week 96 efficacy and safety of rilpivirine in treatment-naive, HIV-1 patients in two Phase III randomized trials. *AIDS* 2013;27(6):939-950.

-
- (44) Kryst J, Kawalec P, Pilc A. Efavirenz-Based Regimens in Antiretroviral-Naive HIV-Infected Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS One* 2015;10(5):e0124279.
- (45) Sharma M, Saravolatz LD. Rilpivirine: a new non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(2):250-256.
- (46) Natarajan U, Pym A, McDonald C, Velisetty P, Edwards SG, Hay P, et al. Safety of nevirapine in pregnancy. *HIV Med* 2007;8(1):64-69.
- (47) Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37(1):113-128.
- (48) Lokamatha KM, Bharathi A, Shanta Kumar SM, Rama Rao N. Preparation, Characterization And In Vitro Evaluation Of Nevirapine- β Cyclodextrin Solid Complexes. *Res J Pharm Bio Chem Sci* 2010;1(2):372-384.
- (49) Lamson MJ, Sabo JP, MacGregor TR, Pav JW, Rowland L, Hawi A, et al. Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos* 1999;20(6):285-291.
- (50) Riska P, Lamson M, MacGregor T, Sabo J, Hattox S, Pav J, et al. Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans. *Drug Metab Dispos* 1999;27(8):895-901.
- (51) van Heeswijk RP, Veldkamp AI, Mulder JW, Meenhorst PL, Wit FW, Lange JM, et al. The steady-state pharmacokinetics of nevirapine during once daily and twice daily dosing in HIV-1-infected individuals. *AIDS* 2000;14(8):F77-82.
- (52) Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Gilman AG. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2001.
- (53) Riska PS, Joseph DP, Dinallo RM, Davidson WC, Keirns JJ, Hattox SE. Biotransformation of nevirapine, a non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitor, in mice, rats, rabbits, dogs, monkeys, and chimpanzees. *Drug Metab Dispos* 1999;27(12):1434-1447.

-
- (54) Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH, Keirns JJ. Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999;27(12):1488-1495.
- (55) Lamson M, MacGregor T, Riska P, Erickson D, Maxfield P, Rowland L, et al. Nevirapine induces both CYP3A4 and CYP2B6 metabolic pathways. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1999;65(2):137-137.
- (56) Clarke SM, Mulcahy FM, Tjia J, Reynolds HE, Gibbons SE, Barry MG, et al. Pharmacokinetic interactions of nevirapine and methadone and guidelines for use of nevirapine to treat injection drug users. *Clin Infect Dis* 2001;33(9):1595-1597.
- (57) Mildvan D, Yarrish R, Marshak A, Hutman HW, McDonough M, Lamson M, et al. Pharmacokinetic interaction between nevirapine and ethinyl estradiol/norethindrone when administered concurrently to HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29(5):471-477.
- (58) Borrelli F, Izzo AA. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *AAPS J* 2009;11(4):710-727.
- (59) Wakeham K, Parkes-Ratanshi R, Watson V, Ggayi AB, Khoo S, Lalloo DG. Co-administration of fluconazole increases nevirapine concentrations in HIV-infected Ugandans. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(2):316-319.
- (60) Gonzalez de Requena D, Nunez M, Jimenez-Nacher I, Soriano V. Liver toxicity caused by nevirapine. *AIDS* 2002;16(2):290-291.
- (61) Wang J, Kou H, Fu Q, Han Y, Qiu Z, Zuo L, et al. Nevirapine plasma concentrations are associated with virologic response and hepatotoxicity in Chinese patients with HIV infection. *PLoS One* 2011;6(10):e26739.
- (62) von Hentig N, Carlebach A, Gute P, Knecht G, Klauke S, Rohrbacher M, et al. A comparison of the steady-state pharmacokinetics of nevirapine in men, nonpregnant women and women in late pregnancy. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62(5):552-559.

-
- (63) de Maat MM, ter Heine R, Mulder JW, Meenhorst PL, Mairuhu AT, van Gorp EC, et al. Incidence and risk factors for nevirapine-associated rash. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59(5-6):457-462.
- (64) La Porte C, Burger D, Gyssens I, Sprenger H, Koopmans P, editors. Gender differences in nevirapine pharmacokinetics, fact or fiction. Fourth International Workshop on Clinical Pharmacology of HIV Therapy. Abstract 10; 27-29 March 2003; Cannes, France.
- (65) Regazzi M, Villani P, Seminari E, Ravasi G, Cusato M, Marubbi F, et al. Sex differences in nevirapine disposition in HIV-infected patients. *AIDS* 2003;17(16):2399-2400.
- (66) Stohr W, Back D, Dunn D, Sabin C, Winston A, Gilson R, et al. Factors influencing efavirenz and nevirapine plasma concentration: effect of ethnicity, weight and co-medication. *Antivir Ther* 2008;13(5):675-685.
- (67) Glazener CM, Evans JH, Peto RE. Tricyclic and related drugs for nocturnal enuresis in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(3):CD002117.
- (68) Prince JB, Wilens TE, Biederman J, Spencer TJ, Millstein R, Polisner DA, et al. A controlled study of nortriptyline in children and adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2000;10(3):193-204.
- (69) Munjack DJ, Usigli R, Zulueta A, Crocker B, Adatia N, Buckwalter JG, et al. Nortriptyline in the treatment of panic disorder and agoraphobia with panic attacks. *J Clin Psychopharmacol* 1988;8(3):204-207.
- (70) Clark C, DeLegge M. Irritable bowel syndrome: a practical approach. *Nutr Clin Pract* 2008;23(3):263-267.
- (71) Punay NC, Couch JR. Antidepressants in the treatment of migraine headache. *Curr Pain Headache Rep* 2003;7(1):51-54.
- (72) Dworkin RH, O'Connor AB, Audette J, Baron R, Gourlay GK, Haanpaa ML, et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc* 2010;85(3 Suppl):S3-14.

-
- (73) Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 2000;58(1):19-36.
- (74) Arroll B, Macgillivray S, Ogston S, Reid I, Sullivan F, Williams B, et al. Efficacy and tolerability of tricyclic antidepressants and SSRIs compared with placebo for treatment of depression in primary care: a meta-analysis. *Ann Fam Med* 2005;3(5):449-456.
- (75) MacGillivray S, Arroll B, Hatcher S, Ogston S, Reid I, Sullivan F, et al. Efficacy and tolerability of selective serotonin reuptake inhibitors compared with tricyclic antidepressants in depression treated in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2003;326(7397):1014-1016.
- (76) Hill L, Lee KC. Pharmacotherapy considerations in patients with HIV and psychiatric disorders: focus on antidepressants and antipsychotics. *Ann Pharmacother* 2013;47(1):75-89.
- (77) Alexanderson B, Borga O. Urinary excretion of nortriptyline and five of its metabolites in man after single and multiple oral doses. *Eur J Clin Pharmacol* 1973;5(3):174-180.
- (78) BNM Group, New Zealand Data Sheet. Nortriptyline NRIM. 2013; Available at: <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/n/nortriptylinenrimtab.pdf>. Accessed 6 Julio, 2015.
- (79) Dahl ML, Nordin C, Bertilsson L. Enantioselective hydroxylation of nortriptyline in human liver microsomes, intestinal homogenate, and patients treated with nortriptyline. *Ther Drug Monit* 1991;13(3):189-194.
- (80) Olesen OV, Linnet K. Hydroxylation and demethylation of the tricyclic antidepressant nortriptyline by cDNA-expressed human cytochrome P-450 isozymes. *Drug Metab Dispos* 1997;25(6):740-744.
- (81) Bechuk JM, Stewart DE. Drug interaction between rifampin and nortriptyline: a case report. *Int J Psychiatry Med* 1991;21(2):183-187.
- (82) Brosen K, Kragh-Sorensen P. Concomitant intake of nortriptyline and carbamazepine. *Ther Drug Monit* 1993;15(3):258-260.

-
- (83) Self T, Corley CR, Nabhan S, Abell T. Case report: interaction of rifampin and nortriptyline. *Am J Med Sci* 1996;311(2):80-81.
- (84) von Bahr C, Steiner E, Koike Y, Gabrielsson J. Time course of enzyme induction in humans: effect of pentobarbital on nortriptyline metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64(1):18-26.
- (85) Gannon RH, Anderson ML. Fluconazole-nortriptyline drug interaction. *Ann Pharmacother* 1992;26(11):1456-1457.
- (86) Miller DD, Sawyer JB, Duffy JP. Cimetidine's effect on steady-state serum nortriptyline concentrations. *Drug Intell Clin Pharm* 1983;17(12):904-905.
- (87) Jerling M, Merle Y, Mentre F, Mallet A. Population pharmacokinetics of nortriptyline during monotherapy and during concomitant treatment with drugs that inhibit CYP2D6--an evaluation with the nonparametric maximum likelihood method. *Br J Clin Pharmacol* 1994;38(5):453-462.
- (88) Shear N, Drake L, Gupta AK, Lambert J, Yaniv R. The implications and management of drug interactions with itraconazole, fluconazole and terbinafine. *Dermatology* 2000;201(3):196-203.
- (89) Nemeroff CB, DeVane CL, Pollock BG. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry* 1996;153(3):311-320.
- (90) Loga S, Curry S, Lader M. Interaction of chlorpromazine and nortriptyline in patients with schizophrenia. *Clin Pharmacokinet* 1981;6(6):454-462.
- (91) Houghton GW, Richens A. Inhibition of phenytoin metabolism by other drugs used in epilepsy. *Int J Clin Pharmacol Biopharm* 1975;12(1-2):210-216.
- (92) Abad FJ, Pons J, Micó M, Casterá DE, Bellés MD, Sánchez A. Categorías de riesgo de los medicamentos utilizados durante el embarazo: Guía rápida de consulta. *Farm Aten Prim* 2005;3(2):49-61.
- (93) DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(15):1247-1266.
- (94) Hirschfeld RM. Sertraline in the treatment of anxiety disorders. *Depress Anxiety* 2000;11(4):139-157.

-
- (95) Halbreich U, Kahn LS. Treatment of premenstrual dysphoric disorder with luteal phase dosing of sertraline. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4(11):2065-2078.
- (96) Vaidya V. Sertraline in the treatment of hiccups. *Psychosomatics* 2000;41(4):353-355.
- (97) Preskorn SH, Lane RM. Sertraline 50 mg daily: the optimal dose in the treatment of depression. *Int Clin Psychopharmacol* 1995;10(3):129-141.
- (98) Murdoch D, McTavish D. Sertraline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in depression and obsessive-compulsive disorder. *Drugs* 1992;44(4):604-624.
- (99) Kristensen JH, Ilett KF, Dusci LJ, Hackett LP, Yapp P, Wojnar-Horton RE, et al. Distribution and excretion of sertraline and N-desmethylsertraline in human milk. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45(5):453-457.
- (100) Doogan DP, Caillard V. Sertraline: a new antidepressant. *J Clin Psychiatry* 1988;49 Suppl:46-51.
- (101) Warrington SJ. Clinical implications of the pharmacology of sertraline. *Int Clin Psychopharmacol* 1991;6 Suppl 2:11-21.
- (102) Obach RS, Cox LM, Tremaine LM. Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab Dispos* 2005;33(2):262-270.
- (103) Kobayashi K, Ishizuka T, Shimada N, Yoshimura Y, Kamijima K, Chiba K. Sertraline N-demethylation is catalyzed by multiple isoforms of human cytochrome P-450 in vitro. *Drug Metab Dispos* 1999;27(7):763-766.
- (104) Liston HL, DeVane CL, Boulton DW, Risch SC, Markowitz JS, Goldman J. Differential time course of cytochrome P450 2D6 enzyme inhibition by fluoxetine, sertraline, and paroxetine in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22(2):169-173.
- (105) Molnari JC, Hassan HE, Myers AL. Effects of sertraline on the pharmacokinetics of bupropion and its major metabolite,

- hydroxybupropion, in mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2012;37(1):57-63.
- (106) Preskorn SH, Alderman J, Chung M, Harrison W, Messig M, Harris S. Pharmacokinetics of desipramine coadministered with sertraline or fluoxetine. *J Clin Psychopharmacol* 1994;14(2):90-98.
- (107) Kurtz DL, Bergstrom RF, Goldberg MJ, Cerimele BJ. The effect of sertraline on the pharmacokinetics of desipramine and imipramine. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62(2):145-156.
- (108) Hamilton SP, Nunes EV, Janal M, Weber L. The effect of sertraline on methadone plasma levels in methadone-maintenance patients. *Am J Addict* 2000;9(1):63-69.
- (109) Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, Phebus L, et al. Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;160(4):353-361.
- (110) Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA. Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci* 1995;57(5):411-441.
- (111) Cohen LS, Miner C, Brown EW, Freeman E, Halbreich U, Sundell K, et al. Premenstrual daily fluoxetine for premenstrual dysphoric disorder: a placebo-controlled, clinical trial using computerized diaries. *Obstet Gynecol* 2002;100(3):435-444.
- (112) Golub MS, Hogrefe CE. Fluoxetine: juvenile pharmacokinetics in a nonhuman primate model. *Psychopharmacology (Berl)* 2014;231(20):4041-4047.
- (113) Risley DS, Bopp RJ. Fluoxetine. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Volume 19. California: Academic Press, Inc.; 1990. p. 193-213.
- (114) Aronoff GR, Bergstrom RF, Pottratz ST, Sloan RS, Wolen RL, Lemberger L. Fluoxetine kinetics and protein binding in normal and impaired renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1984;36(1):138-144.

-
- (115) Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27(1):85-102.
- (116) Heikkinen T, Ekblad U, Palo P, Laine K. Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73(4):330-337.
- (117) Schenker S, Bergstrom RF, Wolen RL, Lemberger L. Fluoxetine disposition and elimination in cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 1988;44(3):353-359.
- (118) Lemberger L, Bergstrom RF, Wolen RL, Farid NA, Enas GG, Aronoff GR. Fluoxetine: clinical pharmacology and physiologic disposition. *J Clin Psychiatry* 1985;46(3 Pt 2):14-19.
- (119) Mandrioli R, Forti GC, Raggi MA. Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome p450. *Curr Drug Metab* 2006;7(2):127-133.
- (120) Sager JE, Lutz JD, Foti RS, Davis C, Kunze KL, Isoherranen N. Fluoxetine- and norfluoxetine-mediated complex drug-drug interactions: in vitro to in vivo correlation of effects on CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 2014;95(6):653-662.
- (121) Ereshefsky L, Riesenman C, Lam YW. Antidepressant drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2D6. *Clin Pharmacokinet* 1995;29 Suppl 1:10-8; discussion 18-9.
- (122) Vlase L, Popa A, Neag M, Muntean D, Leucuta SE. Effect of fluoxetine on the pharmacokinetics of lansoprazole: a two-treatment period study in healthy male subjects. *Clin Drug Investig* 2011;31(10):727-733.
- (123) de Maat MM, Huitema AD, Mulder JW, Meenhorst PL, van Gorp EC, Mairuhu AT, et al. Drug Interaction of Fluvoxamine and Fluoxetine with Nevirapine in HIV-1-Infected Individuals. *Clin Drug Investig* 2003;23(10):629-637.
- (124) Altamura AC, Moro AR, Percudani M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet* 1994;26(3):201-214.

-
- (125) Irons J. Fluvoxamine in the treatment of anxiety disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2005;1(4):289-299.
- (126) Figgitt DP, McClellan KJ. Fluvoxamine. An updated review of its use in the management of adults with anxiety disorders. *Drugs* 2000;60(4):925-954.
- (127) van Harten J. Overview of the pharmacokinetics of fluvoxamine. *Clin Pharmacokinet* 1995;29 Suppl 1:1-9.
- (128) Piontek CM, Wisner KL, Perel JM, Peindl KS. Serum fluvoxamine levels in breastfed infants. *J Clin Psychiatry* 2001;62(2):111-113.
- (129) Spigset O, Axelsson S, Norstrom A, Hagg S, Dahlqvist R. The major fluvoxamine metabolite in urine is formed by CYP2D6. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57(9):653-658.
- (130) DeVane CL. Differential pharmacology of newer antidepressants. *J Clin Psychiatry* 1998;59 Suppl 20:85-93.
- (131) Riddle MA, Reeve EA, Yaryura-Tobias JA, Yang HM, Claghorn JL, Gaffney G, et al. Fluvoxamine for children and adolescents with obsessive-compulsive disorder: a randomized, controlled, multicenter trial. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2001;40(2):222-229.
- (132) Wagner W, Houser V, Wong LF. The Safety Profile of Fluvoxamine in Elderly Patients. *Hum Psychopharmacol Clin Exp* 1996;11(4):267-272.
- (133) Harmant J, van Rijckevorsel-Harmant K, de Barsey T, Hendrickx B. Fluvoxamine: an antidepressant with low (or no) epileptogenic effect. *Lancet* 1990;336(8711):386.
- (134) Präger G, Stollmaier W, Parger R. Safety and tolerance of fluvoxamine in cardiac patients. *TW Neurologie Psychiatrie* 1991;5:548-562.
- (135) Torres-Molina F, Aristorena JC, Garcia-Carbonell C, Granero L, Chesa-Jimenez J, Pla-Delfina J, et al. Influence of permanent cannulation of the jugular vein on pharmacokinetics of amoxicillin and antipyrine in the rat. *Pharm Res* 1992;9(12):1587-1591.
- (136) Torres-Molina F, Peris JE, Garcia-Carbonell MC, Aristorena JC, Granero L, Chesa-Jimenez J. Use of rats chronically cannulated in the jugular vein

- and the duodenum in pharmacokinetic studies. Effect of ether anesthesia on absorption of amoxicillin. *Arzneimittelforschung* 1996;46(7):716-719.
- (137) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-275.
- (138) Atkinson A, Kenny JR, Grime K. Automated assessment of time-dependent inhibition of human cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Drug Metab Dispos* 2005;33(11):1637-1647.
- (139) Almudever P, Peris JE, Garrigues T, Diez O, Melero A, Alos M. Quantification of nortriptyline in plasma by HPLC and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878(9-10):841-844.
- (140) Grimm SW, Einolf HJ, Hall SD, He K, Lim HK, Ling KH, et al. The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug Metab Dispos* 2009;37(7):1355-1370.
- (141) Marinho AT, Godinho ALA, Novais DA, Antunes AMM, Marques MM, Ramos T, et al. Development and validation of an HPLC-UV method for quantifying nevirapine and its main phase I metabolites in human blood. *Anal Methods* 2014;6(5):1575-1580.
- (142) Halde S, Mungantiwar A, Chintamaneni M. Simple, precise and accurate HPLC method of analysis for nevirapine suspension from human plasma. *Indian J Pharm Sci* 2011;73(4):416-421.
- (143) Chi J, Jayewardene AL, Stone JA, Aweeka FT. An LC-MS-MS method for the determination of nevirapine, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2003;31(5):953-959.
- (144) Minocha M, Mandava NK, Kwatra D, Pal D, Folk WR, Earla R, et al. Effect of short term and chronic administration of *Sutherlandia frutescens* on pharmacokinetics of nevirapine in rats. *Int J Pharm* 2011;413(1-2):44-50.
- (145) Rowland LS, MacGregor TR, Campbell SJ, Jenkins R, Pearsall AB, Morris JP. Quantitation of five nevirapine oxidative metabolites in human plasma

- using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;856(1-2):252-260.
- (146) Cressey TR, Nangola S, Tawon Y, Pattarawarapan M, Lallemand M, Tayapiwatana C. Immunochromatographic strip test for rapid detection of nevirapine in plasma samples from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(9):3361-3363.
- (147) Pattarawarapan M, Nangola S, Cressey TR, Tayapiwatana C. Development of a one-step immunochromatographic strip test for the rapid detection of nevirapine (NVP), a commonly used antiretroviral drug for the treatment of HIV/AIDS. *Talanta* 2007;71(1):462-470.
- (148) Chi BH, Lee A, Acosta EP, Westerman LE, Sinkala M, Stringer JS. Field performance of a thin-layer chromatography assay for detection of nevirapine in umbilical cord blood. *HIV Clin Trials* 2006;7(5):263-269.
- (149) Bose D, Durgbanshi A, Martinavarro-Dominguez A, Capella-Peiro ME, Carda-Broch S, Esteve-Romero J, et al. Amitriptyline and nortriptyline serum determination by micellar liquid chromatography. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2005;52(3):323-329.
- (150) Wozniakiewicz M, Wietecha-Posluszny R, Garbacik A, Koscielniak P. Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination. *J Chromatogr A* 2008;1190(1-2):52-56.
- (151) Tybring G, Nordin J, Widen J. High-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the quantification of nortriptyline and 10-hydroxynortriptyline in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;716(1-2):382-386.
- (152) Shinozuka T, Terada M, Tanaka E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci Int* 2006;162(1-3):108-112.
- (153) Harris M, Zala C, Hogg R, Montaner J. Nevirapine. In: Dolin R, Masur H, Saag MS, editors. *AIDS Therapy*. Third ed. USA: Churchill Livingstone Elsevier; 2008. p. 233-246.

-
- (154) Sabo JP, Lamson MJ, Leitz G, Yong CL, MacGregor TR. Pharmacokinetics of nevirapine and lamivudine in patients with HIV-1 infection. *AAPS PharmSci* 2000;2(1):E1.
- (155) Chiou WL, Robbie G, Chung SM, Wu TC, Ma C. Correlation of plasma clearance of 54 extensively metabolized drugs between humans and rats: mean allometric coefficient of 0.66. *Pharm Res* 1998;15(9):1474-1479.
- (156) Tang H, Hussain A, Leal M, Mayersohn M, Fluhler E. Interspecies prediction of human drug clearance based on scaling data from one or two animal species. *Drug Metab Dispos* 2007;35(10):1886-1893.
- (157) Macha S, Yong CL, MacGregor TR, Castles M, Quinson AM, Rouyrre N, et al. Assessment of nevirapine bioavailability from targeted sites in the human gastrointestinal tract. *J Clin Pharmacol* 2009;49(12):1417-1425.
- (158) Perry PJ, Zeilmann C, Arndt S. Tricyclic antidepressant concentrations in plasma: an estimate of their sensitivity and specificity as a predictor of response. *J Clin Psychopharmacol* 1994;14(4):230-240.
- (159) Pinheiro PF, Marinho AT, Antunes AM, Marques MM, Pereira SA, Miranda JP. Sex differences in hepatic and intestinal contributions to nevirapine biotransformation in rats. *Chem Biol Interact* 2015;233:115-121.
- (160) Sharma AM, Novalen M, Tanino T, Uetrecht JP. 12-OH-nevirapine sulfate, formed in the skin, is responsible for nevirapine-induced skin rash. *Chem Res Toxicol* 2013;26(5):817-827.
- (161) FDA. Guidance for Industry. Drug Interaction Studies: Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. 2012; Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>. Accessed 21 Septiembre, 2015.
- (162) Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K. Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 2007;35(2):246-255.