



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Maestría en Ciencias Farmacéuticas

Línea de investigación:

Diseño y evaluación de formas farmacéuticas

Proyecto

“Evaluación farmacocinética y farmacodinámica de implantes subcutáneos de sílice mesoporosa de glibenclamida en modelo murino con diabetes *mellitus* inducida”

Idónea Comunicación de Resultados para obtener el grado de Maestro en Ciencias
Farmacéuticas

Presenta:

Q.F.B. José Ignacio Vázquez Olvera

Matricula 2163804851

Comité Tutorial:

Dra. Norma Angélica

Noguez Méndez

No. Eco. 17902

Co-tutora

Dr. Vicente Jesús

Hernández Abad

Co-tutor

Dr. Luis Alfonso Moreno

Rocha

No. Eco. 35135

Asesor

Agosto, 2021

Evaluación farmacocinética y farmacodinámica de implantes subcutáneos de sílice mesoporosa de glibenclamida en modelo murino con diabetes *mellitus* inducida

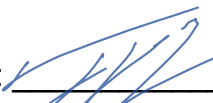
Comité Tutorial

Vo. Bo.:  _____

Dra. Norma Angélica
Noguez Méndez

No. Eco. 17902

Co-tutora

Vo. Bo.:  _____

Dr. Vicente Jesús
Hernández Abad

Co-tutor

Vo. Bo.:  _____

Dr. Luis Alfonso Moreno
Rocha

No. Eco. 35135

Asesor

 _____

Q.F.B. José Ignacio Vázquez Olvera

Matrícula 2163804851

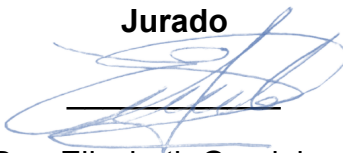
Alumno sustentante

Evaluación farmacocinética y farmacodinámica de implantes subcutáneos de sílice mesoporosa de glibenclamida en modelo murino con diabetes *mellitus* inducida



Dra. Helgi Helene Gisela
Franziska Jung
Presidenta

Jurado



Dra. Elizabeth Guadalupe
Sánchez González
Vocal



Dra. Norma Angélica
Noguez Méndez
Secretaria

Resumen

La diabetes *mellitus* tipo II es una enfermedad degenerativa crónica que, de acuerdo la Federación Mexicana de Diabetes, A.C., tuvo una prevalencia en 2018 de 10.3 % de la población mexicana de mujeres y 8.4 % de la de hombres y continúa siendo un problema de salud no solo nacional, sino mundial por sus complicaciones y necesidad de recursos que le exigen al sistema de salud público para su control, tratamiento y prevención. La glibenclamida, una sulfonilurea de segunda generación, continúa siendo una de las primeras elecciones para el tratamiento y control de la hiperglucemia en pacientes con diabetes *mellitus* tipo II, pero debido a su baja solubilidad, suele presentar problemas de absorción; además de la posibilidad de presentar reacciones adversas, como el evento hipoglucémico. Con el propósito de proponer una alternativa para los problemas de la terapia multidosis de glibenclamida en tabletas orales de liberación inmediata, fue desarrollado un implante subcutáneo de sílice mesoporosa, para la incorporación y liberación modificada de glibenclamida, con el objetivo de compararlo frente a una dosis equivalente administrada por la vía intraperitoneal en forma de suspensión, para simular la liberación inmediata. Para ello, el implante fue caracterizado y ambos tratamientos fueron administrados a ratas de la cepa Long-Evans, diabéticas y normoglicémicas. En el estudio se obtuvieron los resultados de glucemia sanguínea y concentración plasmática del fármaco para la construcción de los perfiles correspondientes, evaluación del efecto hipoglucemiante en función del tratamiento y la estimación del modelo farmacocinético-farmacodinámico. El implante demostró uniformidad de contenido, adecuado control del proceso de su fabricación, una disolución sostenida y ventajas farmacológicas importantes: una absorción y biodisponibilidad mejorada; una magnitud del efecto equivalente a la administración intraperitoneal, con un perfil de concentraciones plasmáticas estable, eficiente, prolongado y seguro; la ausencia de eventos hipoglucémicos severos y, con ello, un control glucémico eficiente. Con lo anterior, se sugiere la ventaja farmacoterapéutica del implante subcutáneo de glibenclamida, con perspectivas para una siguiente fase de evaluación más comprensiva del fenómeno farmacocinético-farmacodinámico.

Agradecimientos institucionales

A la Universidad Autónoma Metropolitana, con particular énfasis a la Unidad Xochimilco, por abrirme las puertas, poner a mi disposición una basta variedad de recursos, actividades académicas y extracurriculares; en espacios seguros e idóneos para mi formación integral. Agradezco por supuesto al personal administrativo que guio mi gestión escolar en todo momento. Agradezco a la comunidad de alumnos y docentes de la maestría en ciencias farmacéuticas, con quienes aprendí y colaboré. Sé que influyeron en lo que soy y seré; corresponderé con responsabilidad y ética social el pertenecer a ustedes. Especialmente, agradezco a los profesores-investigadores y compañeros alumnos del Laboratorio de Farmacia Molecular y Liberación Controlada.

Reconozco y agradezco la guía, retroalimentación, enseñanza y compromiso de los miembros de mi Comité Tutoral. Agradezco también su paciencia y comprensión en los momentos que me enfrenté a dificultades para el desarrollo y conclusión de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología el haberme otorgado la beca de estudios de Programas Nacionales de Posgrado de Calidad para el sustento de los gastos durante la ejecución del proyecto.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme llevar a cabo el proyecto en su mayoría con sus recursos e instalaciones. Agradezco al Laboratorio de Investigación Farmacéutica por permitirme llevar a buen término el proyecto, a la vez que me proporcionó formación en docencia universitaria y en gestión de proyectos de servicio social y de tesis de licenciatura.

El desarrollo de este proyecto fue financiado en su totalidad con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, proyecto PAPIIT IT201619 “Diseño de matrices multiparticuladas de liberación controlada preparadas mediante el proceso sol-gel, aplicables en el tratamiento de la diabetes *mellitus* tipo 2”, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

Agradecimientos personales

A mis padres, Elvira e Ignacio, por su crianza y por las bases en su educación social y humana que me permite plantear y conseguir metas en mi formación integral, no solo la profesional.

A mis hermanos, Jonatan, Diana, Carmen, Alma, así como a la familia que tenemos ahora y al vínculo que nos une para crecer, disfrutar, enfrentar y a vivir la realidad que se nos presenta.

A mi tía Julieta, por el cariño y cuidado que me da. Por el impulso que me inspira su persona.

A Amaranta, por querer que seamos lo mejor que podemos ser juntos.

A Vicente, Elizabeth y Cynthia, mis mentores, profesores y mi inspiración para trabajar incansablemente por las ciencias farmacéuticas, por la formación de sus estudiantes, por el avance en la disciplina y por la extensión de sus beneficios a la sociedad.

A Marco Vicente, Alma Rojas y a Marco Salazar, cuyo apoyo, inventiva y colaboración fue imprescindible para el buen término del proyecto.

A mis amigos, colegas y a todos aquellos por quienes soy. Me sé con ustedes y los sé en mí.

Contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	2
2.1	<i>Diabetes mellitus tipo II</i>	2
2.1.1	Etiología y fisiopatología	2
2.1.2	Incidencia y prevalencia	2
2.1.3	Gasto en salud pública	3
2.1.4	Prevención y tratamiento	3
2.1.5	Optimización y mantenimiento del control glucémico	4
2.1.5.1	Control glucémico con sulfonilureas	6
2.2	<i>Glibenclamida</i>	7
2.2.1	Propiedades físicas y químicas de relevancia biofarmacéutica de la glibenclamida	8
2.2.2	Propiedades de relevancia biológica de la glibenclamida	8
2.2.2.1	Farmacocinética de la glibenclamida	8
2.2.2.2	Farmacodinámica de la glibenclamida	12
2.2.2.3	Modelaje farmacocinético-farmacodinámico de la glibenclamida	13
2.3	<i>Liberación modificada de fármacos</i>	14
2.3.1	Vía de administración subcutánea	14
2.3.1.1	Liberación	14
2.3.1.2	Absorción	14
2.3.1.3	Distribución, biotransformación y eliminación	15
2.3.2	Materiales de Sílice Mesoporosa (MSM) como sistemas de liberación de fármacos	16
2.3.2.1	Síntesis de los MSM	17
2.3.2.2	Seguridad de los MSM	18
2.3.2.3	Aspectos farmacocinéticos de los MSM	18
2.4	<i>Modelaje Farmacocinético-Farmacodinámico</i>	19
3	Planteamiento del problema y justificación	24
4	Hipótesis	25
5	Objetivo general	26

5.1	<i>Objetivos específicos</i>	26
6	Material y métodos	27
6.1	<i>Materiales</i>	27
6.1.1	Sustancias	27
6.2	<i>Individuos experimentales</i>	27
6.2.1	Matriz biológica	27
6.2.1.1	Procedimiento para la toma de sangre por punción cardiaca	27
6.2.1.2	Separación y obtención del plasma	28
6.3	<i>Metodología analítica</i>	28
6.3.1	Adecuabilidad del sistema cromatográfico	29
6.3.2	Validación del sistema analítico	29
6.3.3	Método analítico para la valoración del contenido de glibenclamida en el implante	30
6.3.3.1	Procedimiento del método analítico para la valoración de contenido	30
6.3.3.2	Curva de calibración del método analítico para la valoración de contenido	31
6.3.3.3	Validación del método analítico para la valoración del contenido	32
6.3.4	Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en el medio de disolución	33
6.3.4.1	Procedimiento del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución	34
6.3.4.2	Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución	34
6.3.4.3	Validación del método para la cuantificación en el medio de disolución	35
6.3.5	Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en plasma	36
6.3.5.1	Procedimiento del método analítico para la cuantificación en plasma	37
6.3.5.2	Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en plasma	38
6.3.5.3	Validación del método analítico para la cuantificación en plasma	39
6.4	<i>Implante subcutáneo de glibenclamida</i>	40
6.4.1	Fabricación	40

6.4.2	Evaluación farmacotécnica del implante subcutáneo de glibenclamida	41
6.4.2.1	Variación de peso	41
6.4.2.2	Dureza	42
6.4.2.3	Valoración del contenido	42
6.4.2.4	Uniformidad de dosis	42
6.4.2.5	Perfil de disolución.....	43
6.5	<i>Estudio farmacocinético y farmacodinámico del implante subcutáneo de glibenclamida</i>	45
6.5.1	Conformación de los grupos de experimentación	45
6.5.2	Preparación de los individuos de experimentación	46
6.5.2.1	Inducción de la patología	46
6.5.2.2	Colocación de la vía para toma de muestra	46
6.5.3	Ejecución del estudio	47
6.5.3.1	Administración del implante subcutáneo. Grupos P-Ng y P-Di.....	48
6.5.3.2	Administración de placebo. Grupos C(-) y C(+)	49
6.5.3.3	Administración de la suspensión intraperitoneal. Grupos R-Ng y R-Di.....	49
6.5.3.4	Toma y tratamiento de muestras	49
6.5.4	Análisis de las muestras	50
6.5.4.1	Cuantificación de la concentración plasmática de glibenclamida	50
6.5.4.2	Determinación de los valores de glucemia sanguínea.....	50
6.5.5	Tratamiento de los datos	50
6.5.5.1	Perfiles plasmáticos de glibenclamida	50
6.5.5.2	Perfiles glucémicos	50
6.5.6	Determinación del modelo farmacocinético	51
6.5.7	Determinación del modelo farmacodinámico	52
6.5.8	Comparación estadística de los tratamientos	52
6.5.9	Modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD).....	53
7	Resultados y discusión	54
7.1	<i>Metodología analítica</i>	54
7.1.1	Adecuabilidad del sistema cromatográfico.....	54
7.1.2	Validación del sistema analítico	54

7.1.2.1	Linealidad	54
7.1.2.2	Precisión	55
7.1.3	Método para la valoración del contenido de glibenclamida en el implante	56
7.1.3.1	Curva de calibración del método para la valoración del contenido	56
7.1.3.2	Validación del método para la valoración del contenido	58
7.1.4	Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en el medio de disolución	60
7.1.4.1	Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución	60
7.1.4.2	Validación método analítico para la cuantificación en el medio de disolución	62
7.1.5	Método para la cuantificación de glibenclamida en plasma	65
7.1.5.1	Curvas de calibración del método analítico para la cuantificación en plasma	65
7.1.5.2	Validación del método analítico para la cuantificación en plasma	67
7.2	<i>Evaluación farmacotécnica del implante subcutáneo de glibenclamida</i>	70
7.2.1	Variación de peso	71
7.2.2	Dureza	71
7.2.3	Valoración del contenido	72
7.2.4	Uniformidad de dosis	73
7.2.5	Perfil de disolución	74
7.3	<i>Estudio farmacocinético y farmacodinámico del implante subcutáneo de glibenclamida</i>	78
7.3.1	Análisis farmacocinético	79
7.3.1.1	Perfil plasmático de glibenclamida	79
7.3.1.2	Modelo farmacocinético	82
7.3.2	Análisis farmacodinámico	92
7.3.2.1	Perfiles glucémicos	92
7.3.2.2	Efecto farmacodinámico	102
7.3.3	Modelo FC-FD	106
7.3.3.1	Relación directa entre el efecto farmacodinámico y el componente	

farmacocinético	106
7.3.3.2 Componente farmacodinámico del modelo	110
7.3.3.3 Enlace entre los componentes farmacocinético y farmacodinámico.....	115
8 Conclusiones	123
9 Referencias	124
10 Anexos	136
10.1 <i>Anexo 1. Validación de los métodos analíticos.....</i>	136
10.1.1 Especificidad	136
10.1.2 Linealidad	137
10.1.3 Repetibilidad	139
10.1.4 Precisión intermedia.....	140
10.1.5 Exactitud	141
10.1.6 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)	142

1 Introducción

La meta de lograr mejores terapias farmacológicas se torna especialmente urgente en padecimientos crónico-degenerativos, tales como la diabetes *mellitus*, en el que la terapia con fármacos hipoglucemiantes como la rosiglitazona, metformina, glimepirida y glibenclamida, entre otros¹, es ampliamente usada². Estos compuestos pueden desencadenar severas reacciones adversas, principalmente la hipoglucemia, debido a que su acción hipoglucemiante es independiente de la concentración de glucosa plasmática^{3,4}. Debido al riesgo de provocar estas reacciones adversas, el adecuado control de la administración de dosis orales se torna especialmente importante para mantener los efectos terapéuticos durante los eventos hiperglucémicos sin que, por otro lado, se llegue a la hipoglucemia.

El actual desarrollo de formas farmacéuticas de liberación modificada pretende cubrir muchas de las necesidades que exigen en la terapéutica de algunos padecimientos como el lograr el apego al tratamiento, esto corresponde a los efectos asociados a la toma de medicamentos de liberación inmediata (terapias multidosis). La finalidad de lograr mejores terapias empleando formas farmacéuticas de liberación modificada es reducir los posibles efectos adversos, mantener la concentración del fármaco dentro de la ventana terapéutica y evitar los riesgos por toxicidad, asegurando una concentración óptima tanto sistémica como local y manteniendo el efecto terapéutico durante un periodo de tiempo prolongado⁵⁻⁷. Los materiales de sílice mesoporosa fabricados por la técnica sol-gel, han emergido como un prometedor mecanismo de transporte de fármacos debido primordialmente a su estructura mesoporosa, la que mientras preserva un nivel de estabilidad química y biocompatibilidad, asegura la liberación modificada de diversos fármacos.⁸⁻¹⁰

Como parte fundamental del desarrollo farmacéutico, la evaluación farmacocinética de nuevas formas de liberación de fármacos debe conducirse para asegurar la seguridad y eficacia de esta, demostrar una ventaja significativa por sobre las formas de liberación convencionales e impactar mejorando la calidad de vida del paciente^{6,10}.

Con base en lo anterior, el propósito de este trabajo consistió en la elaboración y evaluación, farmacotécnica, farmacocinética y farmacodinámica de un implante subcutáneo de glibenclamida, fabricado de sílice mesoporosa, para el tratamiento de diabetes *mellitus* tipo 2, con la finalidad de mejorar la absorción del fármaco, modificar la duración del efecto

(reducción de la glucemia sanguínea) de manera sostenida y promover la disminución de los eventos adversos asociados (hipoglucemia).

2 Marco teórico

2.1 Diabetes *mellitus* tipo II

2.1.1 Etiología y fisiopatología

Además de los factores genéticos y epigenéticos, los principales causantes de la epidemia global de Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DMT2) son el incremento en la obesidad, estilos de vida sedentarios, dietas energéticamente densas y envejecimiento de la población¹¹⁻¹³.

Entre los factores genéticos que promueven una determinación hacia la DMT2, se encuentran los antecedentes familiares de la enfermedad, alelos de riesgo en el gen TCF7L2, entre otros; en cuanto a los factores epigenéticos, se ha encontrado fuerte evidencia relacionada con el consumo regular de bebidas azucaradas y carnes rojas, dietas desbalanceadas, tabaquismo y sedentarismo y, en torno al estilo de vida, el sobrepeso y obesidad, los factores dietéticos insalubres, sedentarismo, así como algunos tratamientos farmacológicos, estrés psico-social y depresión, entre otros factores, constituyen los principales determinantes de DMT2^{11,12}.

En la DMT2 se observa una alteración en los ciclos de respuesta fisiológica en dos procesos biológicos importantes en torno a la acción y a la producción de la insulina. Por un lado, la acción de insulina en tejidos sensibles a su acción, tales como el hepático, muscular y adiposo se ve disminuida. Este fenómeno se conoce como resistencia a la insulina en la DMT2. Por otro lado, también se disminuye la secreción de la insulina por las células β . Fenómeno conocido como disfunción de las células β en DMT2. Consecuentemente, ambos fenómenos resultan en niveles anormales y erráticos de glucemia sanguínea¹³.

2.1.2 Incidencia y prevalencia

El inicio del padecimiento frecuentemente ocurre algunos años antes de ser diagnosticado. Se estima que el 45.8 % de todos los casos en adultos, globalmente, son no-diagnosticados. De un estimado de 415 millones de personas con el padecimiento, alrededor de 5 millones de muertes en 2015 fueron causadas por este. La proyección para 2040 es que 642 millones de personas tendrán DMT2^{12,13}.

La incidencia y prevalencia varían de acuerdo con la región geográfica, pero la tendencia general indica que ambas van en aumento a nivel mundial desde 1981. Más del 80 % de los pacientes afectados habitan en países de ingresos bajos a medios, incluyendo a Indonesia, Pakistán, México y Egipto¹². De hecho México paso del lugar 15° (1980) al 10° (2014) en la lista de países con más adultos con diabetes¹⁴.

En México, la prevalencia de diabetes diagnosticada está entre el 8.2 y 11 %; siendo la media mayor para hombres que para mujeres. Considerando a los casos no diagnosticados, la prevalencia total está entre el 12 y el 15.5 %¹⁵.

Hacia el año 2001, se estimaba una incidencia de 1.4 casos por cada 100,000 habitantes por año. Sin embargo, para 2010, la estimación establece aproximadamente 2.75 casos por cada 100,000 habitantes por año con un incremento exponencial, duplicando este valor, aproximadamente cada 10 años^{16–18}.

2.1.3 Gasto en salud pública

Un incremento del 20 % en el número de adultos con DMT2 se verá entre 2010 y 2030 en países desarrollados, mientras que, en países en vías de desarrollo, el incremento será de 69 %. La estimación más conservadora establece que durante 2015 \$ 673 mil millones de dólares fueron gastados en el tratamiento de la diabetes *mellitus* y sus complicaciones^{13,19}.

En países de América Latina este padecimiento es el principal causante de disminución en la expectativa de vida. El gasto para este padecimiento en países como Brasil y México es de al menos el 25 % del gasto total en salud pública^{13,17}.

En México, el costo anual promedio por paciente diagnosticado está entre los \$700 a \$3,200 dólares. Mientras que el costo directo por diabetes es de \$ 717 mil dólares por el tratamiento a pacientes ambulatorios y de \$223 mil dólares por cuidados hospitalarios¹⁶.

El 65.2 % de los pacientes diagnosticados presentaron, al momento de cohorte del estudio, un descontrol glucémico. Es decir, niveles mayores que HbA1c $\geq$ 7 %, lo cual remarca la relevancia de los tratamientos, prevención y programas de mitigación de la epidemia por DMT2¹⁵.

2.1.4 Prevención y tratamiento

Tanto el descontrol glucémico prevalente entre la población de pacientes mexicanos con

DMT2, como el incremento del riesgo de mortalidad de cualquier causa por efecto de enfermedad diabética, son factores que resaltan la importancia del control y tratamiento en el paciente diabético, así como de su prevención¹².

La metformina continúa siendo el primer fármaco de elección para el tratamiento de DMT2, seguido por el tratamiento dual con metformina y fármacos de la familia de las sulfonilureas. Estos fármacos estimulan una secreción de insulina por las células β . Sin embargo, el tratamiento con estos fármacos está asociado con eventos hipoglucémicos^{12,20}.

Otras familias de fármacos y terapias, como las meglitinidas, con acción similar y menos efectiva que la de las sulfonilureas; las tiazolidinedionas, que promueven un aumento de la sensibilidad a la insulina en órganos afectados; terapias basadas en incretina, cuya acción involucra el incremento de la secreción de insulina, reducción de la secreción de glucagón, retraso del vaciamiento gástrico e incremento del estímulo de saciedad; los inhibidores del cotransportador de sodio glucosa II (SGLT2, por sus siglas en inglés), que representan a una de las estrategias más recientes para el control glucémico y cuya acción implica el aumento de la excreción renal de glucosa y el tratamiento con insulina, cuya acción es la más efectiva en la reducción y control de la glucemia sanguínea, pero también posee la mayor incidencia de eventos hipoglucémicos y aumento de peso^{12,20}.

2.1.5 Optimización y mantenimiento del control glucémico

A pesar de que el número de personas en estados preclínicos de regulación alterada de la glucosa es igual de importante, una modificación intensiva del estilo de vida y farmacoterapia, pueden mitigar el avance o retrasar el desarrollo del padecimiento.

Además de los factores clínicos, el apego ineficiente al tratamiento farmacológico, y en sentido integral a la intervención médica, representa una de las mayores dificultades que se encuentran en el manejo y control de la glucemia sanguínea. La no adherencia al tratamiento implica una carga financiera considerable, toda vez que se desperdicia un tratamiento o medicación que no va a ser utilizado¹².

Las Figuras 1 y 2 muestra la matriz de factores que confluyen en el control glucémico. En ella, destacan la necesidad de medicina personalizada y regímenes de tratamiento simplificados.

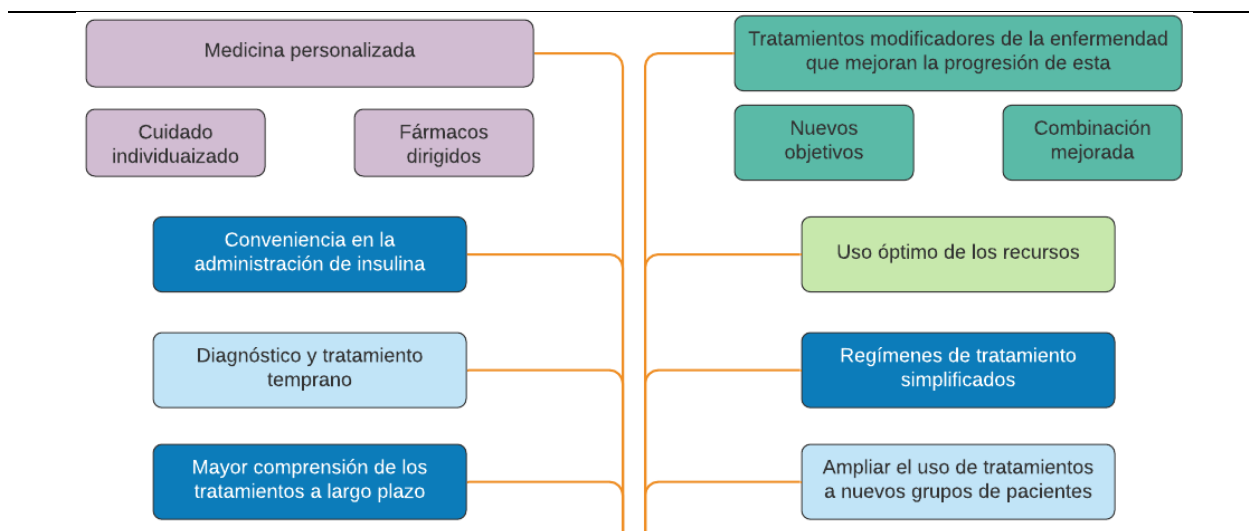


Figura 1. Optimización de las estrategias existentes para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Adaptado de ¹².

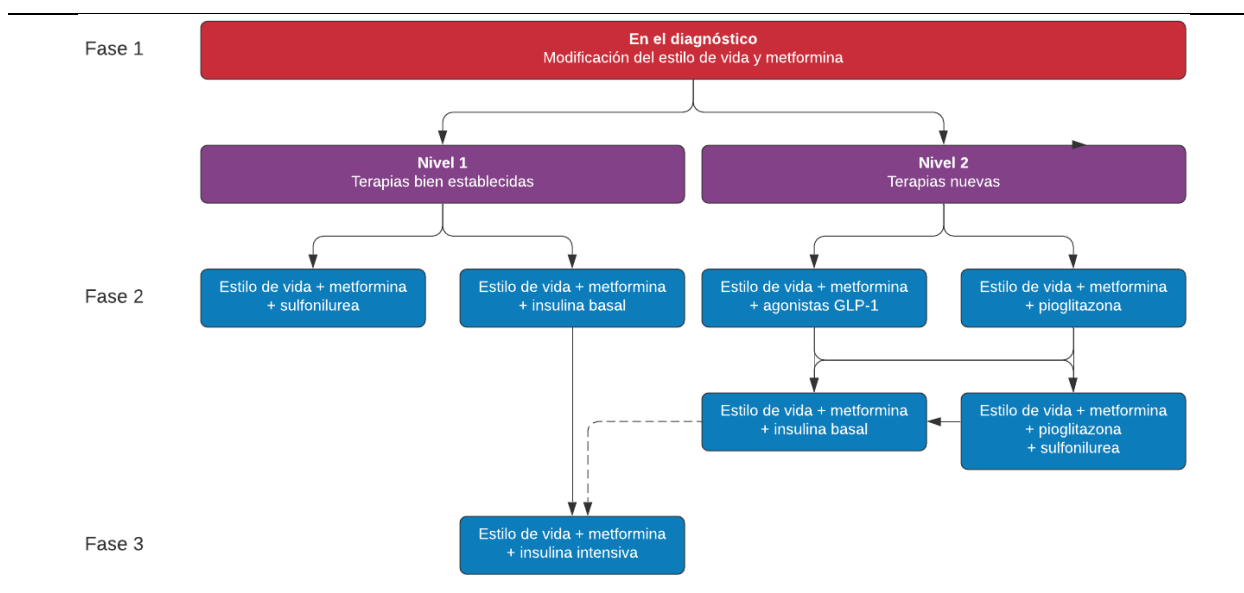


Figura 2. Algoritmo para el control de la diabetes tipo 2.

Consenso de la Asociación Americana de Diabetes y de la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes. Adaptado de ²⁰.

2.1.5.1 Control glucémico con sulfonilureas

Como consecuencia de su eficacia en el control glucémico y su bajo costo, las sulfonilureas son ampliamente empleadas en conjunto con metformina. Sin embargo, estos fármacos están asociados con eventos hipoglucémicos (elevando el riesgo de estos eventos hasta en seis veces más, comparado con el tratamiento con metformina) y con el aumento de peso^{12,21,22}. A pesar de que su posición como segundo tratamiento de elección está siendo retada por el surgimiento de nuevos productos biológicos¹², estudios de efectividad muestran que la combinación de sulfonilureas con metformina sigue siendo el tratamiento, después de metformina sola, de elección para el tratamiento y control glucémico en DMT2²³. Como se muestra en la Figura 2. El algoritmo que establecen dos de las principales agencias en el control de DMT2, mantienen a la combinación de metformina con sulfonilureas como un segundo tratamiento de elección bien establecido²⁰.

El tratamiento individual con sulfonilureas puede ser la primera elección para pacientes que no toleran el tratamiento con metformina, o para quienes es requerido una más rápida y efectiva respuesta al tratamiento, debido su hiperglucemia²⁰.

- **Liberación controlada de sulfonilureas**

Diversos estudios han mostrado la potencial reducción de los riesgos de presentar eventos hipoglucémicos, causados por hipoglucemiantes de esta familia de fármacos, cuando son administrados bajo sistemas de liberación modificada y/o controlada^{21–30}.

2.2 Glibenclamida

La glibenclamida (Figura 3), es un fármaco clase II, de acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), debido a su baja solubilidad (véase la Tabla 1), representa el arquetipo de la familia de las sulfonilureas de segunda generación, ampliamente usadas en el control de la diabetes *mellitus*³¹, y además es la sulfonilurea de primera elección en el primer nivel de atención clínica en México¹. Su administración es en forma de tabletas con dosis bajas (5 mg), y con dosis máximas diarias de 20 mg^{32–36}.

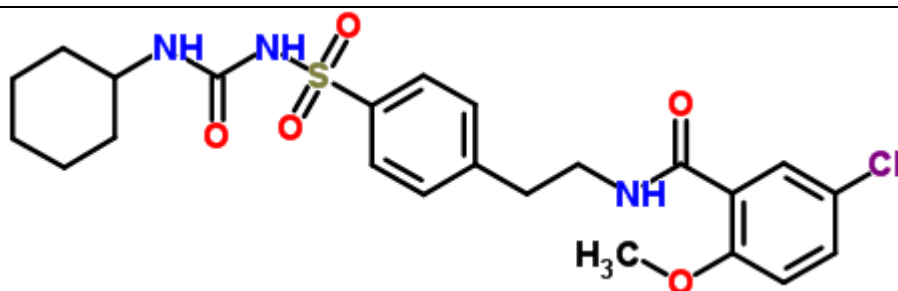


Figura 3. Estructura química de la glibenclamida³¹.

Tabla 1. Propiedades físicas, químicas y biológicas más relevantes de la glibenclamida.

Fórmula condensada	C ₂₃ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S
Peso molecular (Da)	494.004
Solubilidad en agua, a 27°C (mg/L)	4
Solubilidad en etanol, 20 °C (mg/mL)	5
Solubilidad en dimetilsulfóxido, 20°C (mg/mL)	25
Coeficiente de partición, LogP	3.754
Punto de fusión (°C)	174
DL ₅₀ , en ratas, administración intraperitoneal, (mg/kg)	3,750
DL ₅₀ , en ratas, administración oral, (mg/kg)	20,000
Obtenido de <i>ChemSpider</i> ³¹	

2.2.1 Propiedades físicas y químicas de relevancia biofarmacéutica de la glibenclamida

Es un polvo cristalino blanco, inodoro y prácticamente insípido. Es virtualmente insoluble en agua y éter; soluble en 330 partes de etanol, en 36 partes de cloroformo y en 250 partes de metanol. Puede formar sales hidrosolubles con hidróxidos alcalinos. Es un ácido débil que tiene la misma constante de disociación que la tolbutamida (5.3 ± 0.1) y ya que su insolubilidad en agua imposibilita la determinación de su K_a , esta ha sido determinado en mezclas de metanol-agua y estimada en 100% de agua³⁴. Su solubilidad acuosa está fuertemente influida por el pH del medio. A medida que incrementa (por encima del valor del pK_a) la solubilidad incrementa considerablemente. Mientras que a pH=5.3 es menor que 5 µg/mL, a pH= 7.4 la solubilidad puede aumentar a 45 µg/mL en un medio intestinal simulado en estado de ayuno^{37,38}.

2.2.2 Propiedades de relevancia biológica de la glibenclamida

2.2.2.1 Farmacocinética de la glibenclamida

- **En humanos**

En humanos, los pacientes mayores de 60 años alcanzaron una $C_{p_{max}}$ de 211 a 315 ng/mL con un $t_{Cp_{max}}$ de 0.9 a 1.0 h, mientras que los pacientes jóvenes alcanzaron una $C_{p_{max}}$ de 144 a 302 ng/mL en un $t_{Cp_{max}}$ de 1.3 a 3.0 h. El $ABCp$ resultó en 358 ng h mL⁻¹³⁹.

Absorción

La glibenclamida puede ser absorbida de manera casi completa (superior al 90 %) en el tracto gastrointestinal. La $C_{p_{max}}$ suele presentarse entre las 1.5 y 2 h. La administración e ingesta concomitante de alimentos impacta de manera significativa en la absorción^{39,40}. El tiempo de vida media de absorción oscila entre las 0.9 y 3 h³⁶.

Distribución

El volumen de distribución oscila los 0.2 L/kg^{35,41}. La unión a proteínas es completa, con 99% a la albúmina³⁵. El curso temporal de la glibenclamida es bien explicado por el modelo abierto de dos compartimentos^{36,39}.

Biotransformación

Los grandes grupos no polares unidos al centro sulfónico de la glibenclamida son resistentes a la alteración metabólica. El grupo ciclohexilo es hidroxilado por el hígado para formar los dos principales metabolitos: la 4-trans-hidroxiglibenclamida y la 3-cis-hidroxiglibenclamida⁴¹. A pesar de que en un inicio se les atribuyó solamente un 0.25 y 2.5 % de la potencia hipoglucemiante de la glibenclamida⁴⁰, actualmente el estudio farmacodinámico de la glibenclamida y estos metabolitos ha demostrado que éstos poseen una mayor potencia hipoglucemiante que la glibenclamida por sí misma⁴².

Eliminación

A diferencia de otras sulfonilureas, la glibenclamida es excretada en un 50 % por la vía renal y 50 % en heces^{40,41}. Debido a esto, su prescripción está contraindicada en pacientes con falla renal, toda vez que el tiempo de vida media se amplía considerablemente³⁵.

En términos generales, el tiempo de vida media de la glibenclamida está entre las 5 y 7 h³⁵, aunque puede oscilar des las 1.5 hasta las 8.3 h³⁶. Cuando el perfil se ajustó a un modelo abierto de un compartimento, el tiempo de vida media de eliminación fue de 5.251 ± 0.198 h⁴³. Cuando el modelo se ajustó a un MADC, los valores de tiempo de vida media para la fase inicial y terminal de la eliminación resultaron de 9.7 ± 1.2 y 3.3 ± 1.5 h, respectivamente³⁹.

El aclaramiento varía entre los 2.47 y 4.11 L/h^{36,41}. El aclaramiento se ve modificado (positivamente) de manera importante en pacientes con función renal disminuida (véase la Tabla 2)³⁶.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos relevantes de la glibenclamida determinados en humanos.

	Estudio		
	Coppack ³⁹	Rambiritch ³⁶	Jonsson ⁴⁴
Características			
Condiciones	22 p (9f/13m); 54-80 a; 44-95 kg; hospitalizados	Diversos grupos	11 p (3f/8m); 31-68 a; 73 (51-103) kg; hospitalizados
DMT2	Estabilizada	No	Estabilizada
Función renal	Normal	Normal	Normal
Administración de GB (mg)	Oral, 10.0	Oral, 10.0	Oral, 7.0
Parámetros			
	MADC	ANC y MADC	MAUC
$t_{1/2,abs}$ (h)	No reportado	1.3 ± 0.11	0.38 ± 0.17
C_{max} (µg/mL)	0.354 ± 0.033	0.422 ± 0.119	0.463 ± 0.226
$t_{C,max}$ (h)	3.2 ± 0.86	1.62 ± 1.16	1.4 ± 0.2
$ABC_{0-\infty}$ (µg/mL/h)	No reportado	4.276 ± 0.179	2.086 ± 0.707
$t_{1/2}$ (h)	Inicial: 3.1 ± 1 ; terminal: 10.4 ± 1.8	8.08 ± 2.25	2.5 ± 0.77
V_d (L)	No reportado	32.48 ± 14.46	13.4 ± 5.9
CL (L/h)	No reportado	2.78 ± 1.03	3.70 ± 1.15
MAUC, Modelo Abierto de Un Compartimento; ANC, Análisis No Compartimental; GB, glibenclamida; f, sexo femenino; m, sexo masculino; a, años.			

- **En modelo murino**

La farmacocinética que exhibe es explicada, según lo reportado por Liu³² y Samala⁴⁵, mediante el modelo abierto de un compartimento (MAUC). Otros resultados, obtenidos mediante modelos estadísticos no compartimentales, también se han reportado^{46,47}. En la Tabla 3 se enumeran los principales parámetros farmacocinéticos reportados en ambos casos.

Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos relevantes de la glibenclamida determinados en modelo murino.

	Estudio			
	MAUC		MENC	
	Liu ³²	Samala ⁴⁵	Neerati ⁴⁶	Elbahwy ⁴⁷
Características				
Cepa (peso, g)	Sprague-Dawley machos (286 ± 5.3)	Wistar machos (180-250)	Wistar (180-230)	Sprague-Dawley machos (200 ± 20)
¿Diabetes inducida? (método)	No	Sí (estreptozotocina, 55 mg/kg, i.p.)	Sí (aloxano, 100, 50 mg/kg, i.p.)	Sí (aloxano, 140 mg/kg, i.p.)
Administración de GB (mg/kg)	*Oral, 1.0	*Oral, 10.0	*Oral, 10.0	**Oral, 5.0
Matriz	Plasma	Suero	Suero	Plasma
Duración e intervalos de muestreo (h)	24 h Cada 1 h	24 h Cada 2 h	12 h Cada 2 h	24 h Cada 2 h
Punto de muestreo	Punción retro-orbital y con volúmenes de 1 a 1.5 mL			
Parámetros				
C _{max} (µg/mL)	0.134 ± 0.044	68.0 ± 1.5	14.71 ± 2.97	7.57 ± 0.64
t _{C,max} (h)	2 ± 0.76	2	4	4
ABC _{Total} (µg/mL/h)	0.860 ± 0.249	305.2 ± 8.9	108.99 ± 10.95	94.63 ± 6.65
t _{1/2} (h)		1.87 ± 0.1	3.44 ± 0.29	9.07 ± 0.79
V _d (mL)	No reportado	87.1 ± 4.5	241.32 ± 38.60	No reportado
CL (mL/min)	No reportado	32.4 ± 1.1	36.57 ± 3.34	No reportado
MAUC, Modelo Abierto de Un Compartimento; MENC, Modelo Estadístico No Compartimental; GB, glibenclamida.				
*A partir de una solución.				
**A partir de una suspensión.				

Existen similitudes y diferencias claras en los estudios que se sintetizan en el Tabla 3. Comenzando por el acondicionamiento de los animales, que es bastante similar entre los estudios, es decir, bajo condiciones estándar de laboratorio: contenidos en cajas de polipropileno individuales, ambiente de 20 a 25 °C de temperatura y 50 % de humedad

relativa, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h; alimentación *ad libitum* con dieta estándar para las cepas y ayuno previo, de 12 a 18 h, a los tratamientos experimentales^{32,45–47}. Sin embargo, los estudios difieren en la metodología de inducción de diabetes, así como en la toma de muestras y en el tratamiento y análisis de estas. Además, algunos parámetros de ejecución del estudio, como la temperatura y tiempo de almacenamiento de las muestras (de -70 o -20 °C y “tiempo hasta su análisis”); fuerza y tiempo de la centrifugación (4,000 a 10,000 rpm, de 5 y hasta 15 min); reactivos y técnicas para la precipitación de proteínas; así como su preparación y dilución para la cuantificación es diversa entre las metodologías de los estudios.

Por otro lado, la inducción de diabetes *mellitus* difiere entre los estudios. Los dos métodos mostrados en la Tabla 3, tanto el método con administración de estreptozotocina como por administración de aloxano, son métodos no quirúrgicos y se fundamentan en el daño tisular, específicamente de los islotes de Langerhans, destruyendo las células β -pancreáticas, tras la administración de alguna de estas sustancia tóxica⁴⁸. La administración de una dosis única (de entre 25 y 100 mg/kg) de estreptozotocina, una nitrosurea; metabolito secundario producido por *Streptomyces achromogenes*, puede inducir diabetes *mellitus* en roedores⁴⁹, probablemente como resultado de diversos efectos tóxicos, basados en mecanismos tales como la interferencia con el transporte de glucosa, con la función de la glucoquinasa y por ruptura de las cadenas de ADN^{48,50}. Mientras que una administración de entre 100 y 150 mg/kg de aloxano⁵¹, un fármaco sintético, puede causar diabetes *mellitus* mediante el daño a las mismas células β -pancreáticas por la generación de radicales hidroxilo⁵⁰. En ambos métodos, suele verificarse la hiperglucemia hasta las 48 a 72 h después de la administración, y, dependiendo del criterio del investigador, suele establecerse el modelo como diabético cuando la glucosa determinada por el método de la glucosa-oxidasa peroxidasa supera los 250 o 300 mg/dL⁵⁰.

2.2.2.2 Farmacodinámica de la glibenclamida

La glibenclamida es una sulfonilurea de segunda generación, que estimula la secreción de insulina a través del cierre de los canales de potasio sensibles de ATP, en las células beta del páncreas, aumentando las concentraciones de potasio y calcio intracelular. Tiene una duración prolongada y regímenes terapéuticos amplios, que pueden partir desde los 0.75 mg por dosis, pero pueden incrementarse hasta 10 mg por dosis en algunos casos. Es

ampliamente recomendado nunca exceder de 20 mg diarios⁵²⁻⁵⁴.

En condiciones normales, el receptor en el cuál actúa la glibenclamida (denominado SUR1) se mantiene abierto mientras las concentraciones de glucosa sanguínea son bajas, permitiendo el ingreso de potasio y la creación de un potencial de membrana de -70mV. Normalmente, el receptor cierra ante un incremento de glucemia sanguínea, promoviendo el aumento del potencial de membrana y despolarizando a la célula. Esto permite que los canales de calcio sensibles a voltaje se abran, permitiendo el flujo de iones calcio hacia la célula. Finalmente, el incremento de calcio intracelular estimula la liberación de gránulos que contienen insulina. La glibenclamida promueve esta cascada de estímulos manteniendo cerrado el receptor SUR1⁵².

2.2.2.3 Modelaje farmacocinético-farmacodinámico de la glibenclamida

La mayoría de los fármacos hipoglucémicos de la familia de las sulfonilureas no producen un efecto inmediato, sino retrasado en comparación con la aparición del fármaco en el compartimento central. Este retraso depende del mecanismo de acción farmacológico del fármaco en cuestión⁵⁵.

Los modelos de distribución a la biofase son una alternativa para caracterizar este retraso en la aparición del efecto. En este modelo se asume que el retraso es debido al tiempo necesario para que el fármaco difunda, desde el compartimento central, hacia el sitio de efecto; es decir, a la biofase.

La biofase está representada por un compartimento hipotético de efecto. Este es el concepto de un espacio teórico que describe un lugar que puede tener las mismas propiedades de distribución que el espacio biológico donde el fármaco causa su efecto, que se encuentra alejado pero unido al compartimento central y cuyos parámetros de volumen, cantidad de fármaco y constante de velocidad son despreciables en comparación con los parámetros que describen el perfil farmacocinético del compartimento central. Dicho de otra manera, la inclusión de este compartimento de efecto hipotético en el modelaje de los datos no supone un cambio significativo en el perfil de concentraciones plasmáticas del fármaco, ni en su curso temporal a través del organismo⁵⁶⁻⁵⁹.

2.3 Liberación modificada de fármacos

2.3.1 Vía de administración subcutánea

2.3.1.1 Liberación

La velocidad de liberación y la duración del efecto farmacodinámico pueden ser modificadas positivamente por la administración desde esta ruta. Ya sea para incrementar el tiempo de vida medio de eliminación, o para disminuir la frecuencia de las administraciones y asegurar el apego terapéutico. Sin embargo, el volumen de líquido intersticial presente en el espacio subcutáneo, velocidad del flujo sanguíneo, presión osmótica y presencia de proteínas plasmáticas son factores que también participan, tanto favoreciendo como inhibiendo, la mejora de la liberación del fármaco. La administración subcutánea, por sí misma, está limitada por el volumen de la administración, por lo tanto, también de la solubilidad y la dosis del fármaco. A pesar de que está establecido que parámetros farmacocinéticos, especialmente el aclaramiento, distribución y biotransformación son propiedad intrínseca del fármaco y no pueden ser manipulados directamente, no sin modificar químicamente a la sustancia o bien, modificar la interacción con estructuras, fluidos y compuestos endógenos⁶⁰.

2.3.1.2 Absorción

Tras una administración subcutánea, la absorción puede ser más lenta que por la vía intramuscular, aunque puede incrementarse para algunos fármacos, y no necesariamente es más rápida que la vía oral. Es precisamente por esta razón que la vía de subcutánea es elegida; es decir, para promover una administración lenta sostenida y (o) controlada, o bien para evitar una respuesta demasiado intensa, demasiado corta o bajo regímenes de administraciones frecuente. El ejemplo clásico es precisamente un fármaco hipoglucemiante, la hormona insulina. Algunas de las posibles desventajas de esta administración incluyen la irritación local, la preparación de administraciones estériles, aunque no siempre es necesaria la supervisión médica^{61,62}.

Al igual que con la administración intravenosa e intraarterial, la administración de fármacos por la vía subcutánea (o la intramuscular) son ejemplos de rutas parenterales. La vía subcutánea se usa con frecuencia a fin de evitar el tracto gastrointestinal, ya sea porque el medicamento se destruiría en el fluido gastrointestinal, su eficiencia se ve disminuida por la

biotransformación pre-sistémica en el hígado o porque un medicamento es demasiado polar o grande para penetrar en la membrana gastrointestinal⁶³. Además, esta ruta de administración permite una liberación lenta y sostenida del fármaco en el sitio de la administración y, por lo tanto, son requeridas un menor número de administraciones⁶⁴. Los fármacos administrados por vía subcutánea aún deben ser absorbidos en la circulación sistémica, y es generalmente el tamaño del fármaco el que dicta si serán absorbidos a través de los capilares vasculares del epitelio (moléculas menores a 5,000 g/mol) o a través de la circulación linfática (moléculas mayores a 20,000 g/mol). Además de esto, las membranas capilares disponibles en el sitio de administración permiten la penetración paracelular, incluso de moléculas polares y (o) grandes⁶⁵. Los fármacos administrados por vía subcutánea pueden alcanzar la circulación sistémica más rápido de lo que lo harían por la vía entérica. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de un fármaco (por ejemplo, el tamaño de partícula) pueden manipularse para proporcionar una absorción más gradual de estas rutas⁶³.

2.3.1.3 Distribución, biotransformación y eliminación

A pesar de que la ruta de administración subcutánea supone modificaciones importantes en los parámetros que caracterizan a los procesos de liberación y absorción, los parámetros farmacocinéticos posteriores, tales como velocidades de distribución, eliminación y el aclaramiento no suponen un cambio directamente relacionado con la administración subcutánea, sino que resultan consecuentes con las propiedades fisicoquímicas y parámetros intrínsecos del fármaco (cuya manipulación directa es improbable, a menos que se modifique químicamente al fármaco) y de la cantidad de fármaco presente en el compartimento central, factor que es el que se ve modificado por la alteración del proceso de absorción.⁶⁰ Un cambio en los parámetros farmacocinéticos de biotransformación y eliminación puede deberse a que la cinética de absorción ha cambiado de primer orden, a una absorción de orden cero o semiorden cero o a que los parámetros farmacocinéticos están en función de la concentración plasmática alcanzada en cada tiempo⁶⁵.

Un sistema de liberación modificada de fármacos puede influir de manera importante en la farmacocinética de un fármaco⁶⁶, al incrementar su absorción, asegurando una concentración plasmática óptima y biodisponibilidad⁶, destaca la posibilidad de mejorar los perfiles farmacocinéticos de fármacos poco solubles o lipofílicos^{5,8,67}. Sin embargo, uno de

los principales retos en el desarrollo de sistemas de liberación modificada, a base de materiales mesoporosos de sílice, para proponerlos como un posible acarreador de fármaco y que mejore la administración de este, es la evaluación farmacocinética y farmacodinámica para establecer su potencial aplicación terapéutica *in vivo*⁶⁸.

2.3.2 Materiales de Sílice Mesoporosa (MSM) como sistemas de liberación de fármacos

La liberación modificada de fármacos en un sitio determinado dentro del organismo es un área de estudio importante en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas⁵. Una forma farmacéutica de liberación modificada, pretende reducir los potenciales efectos secundarios asociados a terapias multidosis con medicamentos de liberación inmediata⁵ o aquellos efectos involucrados desde la liberación y la absorción y maximizar los efectos terapéuticos mediante la obtención de la concentración óptima en los sitios de acción, o bien, en la circulación sistémica^{6,7}.

El desarrollo de formas farmacéuticas con base en sistemas de liberación modificada, tiene cada vez más registro de su alcance como una alternativa para tratamientos con fármacos poco solubles^{5,6,8}; con estrecho margen terapéutico^{9,10}. Los materiales de sílice mesoporosa han emergido, como un prometedor vehículo para fármacos, debido primordialmente a su estructura, la cual resguarda la estabilidad química, la funcionalización de superficie y biocompatibilidad, asegurando la liberación modificada de diversos fármacos⁶⁸, en estos materiales, la liberación de diversos compuestos depende y se puede controlar a través de canales de poros estrechos, que permiten al proceso de liberación del fármaco llevarse a cabo con precisión. Las propiedades de la forma mesoporosa de la sílice permiten que puedan ser incorporados fármacos u otros agentes terapéuticos en grandes cantidades^{5,66}.

Se han desarrollado formas de dosificación parenteral de liberación modificada en las que el fármaco está atrapado o encapsulado en matrices poliméricas o lipofílicas inertes que liberan lentamente el fármaco *in vivo* durante una semana o hasta varios años. Los polímeros o vehículos lipofílicos utilizados para administrar los fármacos en sistemas de liberación modificada parenterales pueden o no ser biodegradables *in vivo*. Los sistemas no comestibles y no biodegradables se eliminan al final de la terapia. Los medicamentos, incluidos los péptidos y las proteínas, también se han formulado como emulsiones, suspensiones, liposomas y nanopartículas para inyección parenteral. Un cambio en un

medicamento parenteral de una solución a una emulsión, liposoma, etc. alterará la distribución del medicamento y el perfil farmacocinético⁶¹.

2.3.2.1 Síntesis de los MSM

Las entidades terapéuticas se incorporan durante la misma síntesis (o fabricación) de los materiales de sílice mesoporosa cuando esta se realiza por la técnica sol-gel (Figura 4). La carga también puede conseguirse una vez que el material ha sido fabricado, para esto se cuenta con 2 estrategias generales, aunque existen metodologías sumamente específicas para la carga de cada tipo de entidad terapéutica. La primera y más sencilla de estas consiste en sumergir al material en una solución que contenga de manera saturada a la entidad terapéutica, de esta manera el fármaco se adsorbe en toda la red tridimensional porosa del material. La segunda técnica, basada en la primera, consiste en incluir una molécula de tipo polimérica (usualmente un agente surfactante) en la red tridimensional de poros durante el proceso de síntesis, misma que es retirada por acción térmica o por disolución con un disolvente apropiado; después de esto, el fármaco es incorporado mediante adsorción en los poros liberados. La carga máxima de fármaco dentro de los materiales de sílice mesoporosa depende siempre de la geometría del poro, así como de la técnica de carga^{69,70}.

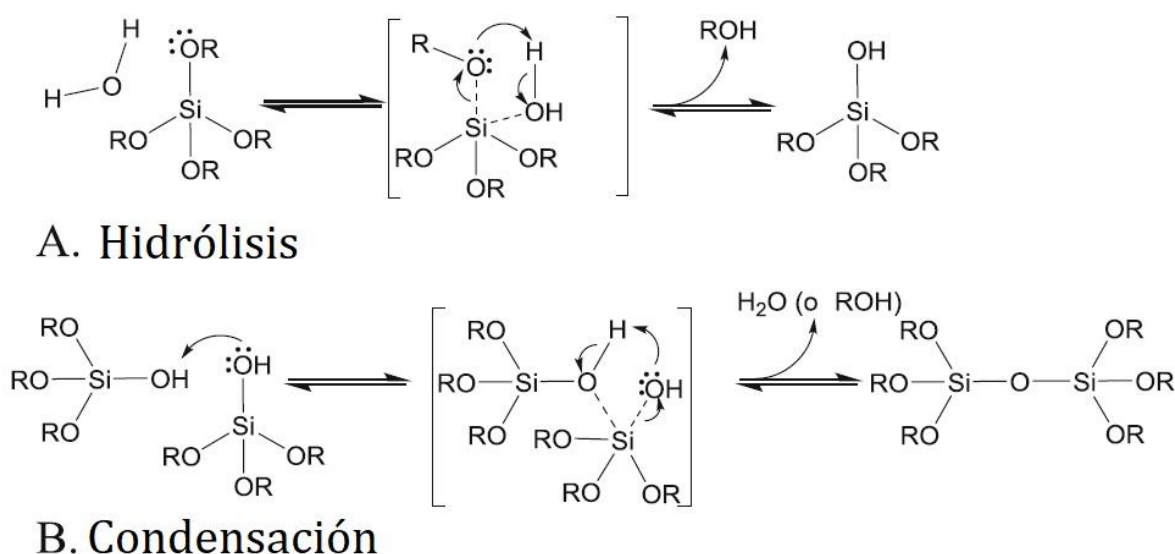


Figura 4. Reacciones generales para la fabricación de materiales de sílice mesoporosa⁶⁶.

2.3.2.2 Seguridad de los MSM

Las nanopartículas de sílice fueron aprobadas por la FDA para estudios clínicos de fase I en humanos en 2011⁷¹.

2.3.2.3 Aspectos farmacocinéticos de los MSM

Como sistema de liberación modificada, los MSM prometen un incremento en la solubilidad aparente, una liberación sostenida, modificación indirecta de los parámetros de biotransformación y farmacocinéticos, resultando en la mejoras por acumulación del fármaco en el tejido u órgano objetivo y reducción simultánea de la distribución fuera de este sitio y las complicaciones toxicológicas de ésta⁷².

- **Liberación**

La liberación de fármacos a partir de materiales mesoporosos puede exhibir un patrón bifásico, tanto *in vitro* como *in vivo*. Debido a la presencia de moléculas de fármaco en la superficie de estos materiales, así como de los poros más superficiales, es posible alcanzar rápidamente las concentraciones terapéuticas efectivas y posteriormente liberar de manera modificada o controlada el fármaco contenido en la red de poros⁷³. En general, la liberación a partir de los MSM se rige por un proceso de difusión (con la entrada previa del medio de disolución a la red de poros), más que por un proceso de erosión de la matriz⁷⁴.

Además, la liberación puede ser controlada además por modificaciones de las propiedades del MSM, en su superficie y en el tipo de interacción con las moléculas de fármaco, así como por estímulos internos y externos ampliamente diversos⁶⁷.

- **Absorción**

Diversos estudios han demostrado la capacidad de los MSM para incrementar significativamente la biodisponibilidad de los fármacos que son administrados y liberados a partir de estos^{73–79}.

- **Biotransformación**

El tiempo de vida media, así como la duración del efecto, pueden llegar a ser mayores si se libera un fármaco desde materiales mesoporosos, en comparación con el mismo fármaco administrado en la misma vía, pero bajo una liberación inmediata. Cuando un fármaco es administrado desde un sistema este tipo, la actividad metabólica se ve prolongada, es decir

que se abate la tasa de eliminación por la vía de la biotransformación⁸⁰.

- **Eliminación**

Un efecto esperado de la liberación modificada a partir de los MSM es el aumento significativo de los tiempos de vida media de eliminación⁷³. El aumento en los tiempos de vida media de eliminación suele ser promovida por la funcionalización de las superficies de los poros en los MSM, por ejemplo con la inclusión de macromoléculas como el propilenglicol⁸¹. Si bien la cinética de eliminación de esta ruta parenteral sigue, en la mayoría de los casos con fármacos no peptídicos o proteicos, un orden lineal, fenómenos como la interacción con estructuras celulares y tisulares del sitio de administración pueden ser relevantes⁸².

2.4 Modelaje Farmacocinético-Farmacodinámico

Los modelos farmacocinéticos describen la relación entre la dosis y la concentración plasmática (o sérica) que se presentan tras dicha administración. Esta relación normalmente es descrita como el perfil de concentraciones en función del tiempo, para una determinada dosis. El modelo farmacodinámico, por otro lado, describe el enlace entre las concentraciones de fármaco y el efecto medible, independientemente del tiempo al cuál se presente. Los modelos Farmacocinéticos/Farmacodinámicos (FC/FD o PK/PD por sus siglas en inglés) han sido propuestos como un abordaje más generalizado. Esto permite que el efecto farmacodinámico sea relacionado directamente con el tiempo después de administrar una determinada dosis de fármaco.⁸³ De hecho, para crear un modelo completo de la respuesta a un fármaco, un modelo farmacocinético que describa las concentraciones plasmáticas en cualquier tiempo después de su administración debe ser enlazado a un modelo farmacodinámico que describa la respuesta producida por la concentración dada en el sitio de efecto⁶³. Es así como los modelos combinados FC/FD proveen elementos para el entendimiento del curso temporal del efecto de un fármaco, en tanto a tres propiedades importantes: la magnitud del efecto, su inicio y su duración. El efecto farmacodinámico puede ser ya sea una respuesta clínica medible o la determinación de un biomarcador del efecto farmacológico. La exploración del modelaje FC/FD puede ser llevado a cabo mediante dos métodos principales: experimentos de estado estacionario y no estacionario⁸³. La principal limitación de todos los modelos basados en evidencia biológica y empírica, es

que la información empírica representa en todos los casos una medida indirecta del fenómeno fisiológico que ocurre a nivel de la interacción fármaco receptor (incluidas sus fases previas y posteriores), por lo que esta información carece del detalle en el entendimiento de los mecanismos farmacocinético y farmacodinámico que ocurren en este nivel⁸³.

La mayoría de la respuesta farmacológica debida al fármaco es atribuible a la unión de éste con un receptor (o parte de uno). Cuando el paso limitante para el curso temporal del efecto farmacodinámico es esta interacción fármaco-receptor, el curso temporal del inicio del efecto estará relacionado con la constante de disociación de dicha interacción. Cuando el valor de esta constante de disociación es grande (promoviendo un tiempo de vida media de la interacción fármaco-receptor corta), el efecto farmacodinámico demostrará un efecto inmediato. Cuando un fármaco exhibe este tipo de comportamiento, el modelo establecido es uno de Acción Directa⁸³. Este modelo, también llamado de Enlace Directo, también es empleado cuando se asume que la concentración de fármaco en el sistema circulatorio es la misma que en el sitio del receptor⁸⁴. Estrictamente hablando, esta suposición expresa ya sea el caso en el que el receptor se encuentre en el propio sistema circulatorio (o como parte de él) y se dé una administración intravascular⁸³ o bien, exprese el equilibrio en el sitio del pre-receptor y el modelo resultante no utilice concentraciones en el sitio de efecto⁸⁴. De esta manera el modelo mecanístico más simple es el modelo sigmoideal del efecto máximo⁶³, presentado en la Ecuación 1.

$$E(t) = \frac{E_{max} \cdot C(t)^{\gamma}}{k_d + C(t)^{\gamma}}$$

Ecuación 1. Relación sigmoidea del efecto directo máximo.

Donde

E(t) es el efecto farmacológico al tiempo t

E_{max} el efecto máximo atribuible al fármaco

k_d la constante de disociación del complejo fármaco – receptor

C(t) la concentración plasmática (o en el pre – receptor) al tiempo t

γ el factor de sigmoicidad

Consecuentemente, la concentración determinada está directamente enlazada con el efecto observado. Bajo estas suposiciones, la concentración plasmática máxima y el efecto máximo ocurrirán en el mismo tiempo^{84,85}. Un diagrama ejemplificando este modelo se muestra en la Figura 5.

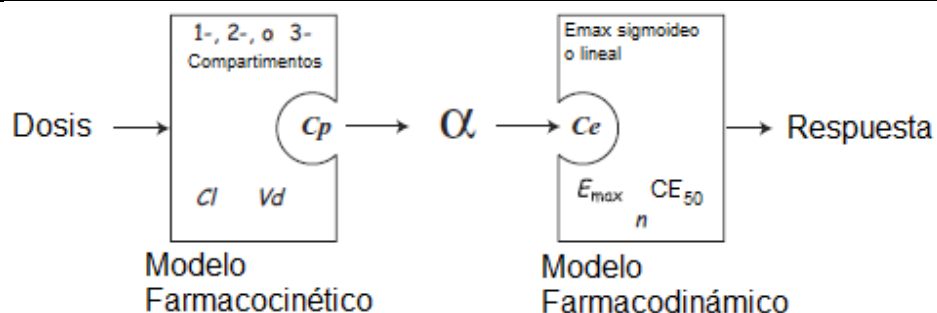


Figura 5. Modelo empírico FC/FD directo. Tomado de ⁶³.

Para muchos fármacos, el sitio de efecto es distante al compartimento vascular (central). En este caso, el modelo añade un mayor nivel de complejidad para satisfacer el retraso en la distribución del fármaco hacia el compartimento de efecto hipotético.⁸³ Cuando la concentración de fármaco en el plasma no está equilibrada en todo momento con la concentración en el sitio de efecto, ocurre un fenómeno conocido como histéresis. Este fenómeno es resultado del retraso en la distribución entre el incremento y decremento de las concentraciones plasmáticas de fármaco y el incremento y decremento del efecto. El retraso en esta distribución puede ser resuelto usando un compartimento de efecto para enlazar el modelo farmacocinético con el farmacodinámico.⁸⁶ El compartimento de efecto es el concepto de un espacio teórico que describe un lugar que puede tener las mismas propiedades de distribución que el espacio biológico donde el fármaco se causa su efecto y se encuentra unido al compartimento central. La biofase corresponde con la suposición del verdadero sitio de acción de fármaco y se representa a través del compartimento de efecto.⁶³

La distribución hacia y desde el compartimento de efecto se modela como un proceso de primer orden. Se asumen que la cantidad de fármaco que se distribuye hacia este compartimento es muy pequeña, entonces la redistribución desde el compartimento de efecto no retorna hacia el central, sino que se pierde del sistema (con el fin de simplificar el modelo farmacocinético). La prominencia de la histéresis y la magnitud del retraso en la respuesta están determinados por el tiempo que le toma al sitio de efecto (la biofase) en equilibrarse con el compartimento central. La constante de redistribución (o de pérdida) de fármaco desde el compartimento central es la que indica estos dos aspectos. De tal manera que una histéresis reducida está asociada con valores grandes de la constante de redistribución desde el compartimento de efecto y viceversa. Ya que la redistribución es un proceso cinético de primer orden, es posible establecer que cuando transcurren entre 3 y 5

tiempos de vida media de redistribución, ésta será completa. Si bien cuando la redistribución sea completa las concentraciones en el sitio de efecto igualen a las del compartimento central, puede no ocurrir así, pero una vez que el proceso esté completado, el cociente entre las concentraciones de ambos compartimentos se mantendrá constante (el curso de ambos perfiles de concentración será paralelo entre sí). Esto supone que la histéresis no se observa en condiciones de estado estacionario. Dado que solo es posible establecer el valor de la constante de redistribución a partir de la histéresis y a que no es posible determinar el valor de la constante contraria (la de distribución hacia el sitio de efecto), usualmente los valores de ambas constantes se asumen iguales. Solo cuando el proceso de distribución haya sido completado y cuando el compartimento de efecto se relaciona con el modelo del efecto máximo, el valor de la concentración efectiva que promueve la mitad del efecto máximo estará establecido en términos de los valores de la concentración plasmática⁶³.

Mecanísticamente, este modelo solo aplica cuando el paso limitante en la descripción temporal del efecto del fármaco es el fenómeno de distribución hacia la biofase, por lo tanto, atribuible únicamente al componente farmacocinético del modelo⁸³. Sin embargo, otros fenómenos más bien fisiológicos, como los efectos indirectos del fármaco, largos procesos de transducción de la señal o la participación de segundos mensajeros son bien incorporados en los modelos de efecto indirecto o de distribución a la biofase⁶³. El modelo de efecto máximo puede satisfacer este retraso cuando se presenta en función de las concentraciones en el compartimento de efeto, como se muestra en la Ecuación 2.

$$E(t) = \frac{E_{max} \cdot C_e(t)^\gamma}{EC_{50} + C_e(t)^\gamma}$$

Ecuación 2. Relación sigmoidea del efecto como función de las concentraciones de fármaco en la biofase

Donde

E(t) es el efecto farmacológico al tiempo t E_{max} el efecto máximo atribuible al fármaco

EC₅₀ la concentración que promueve el 50% del efecto máximo

C_e(t) la concentración en el compartimento de efecto al tiempo t

γ el factor de sigmoicidad

El retraso en la distribución del fármaco que provoca este fenómeno está representado en la Figura 6.

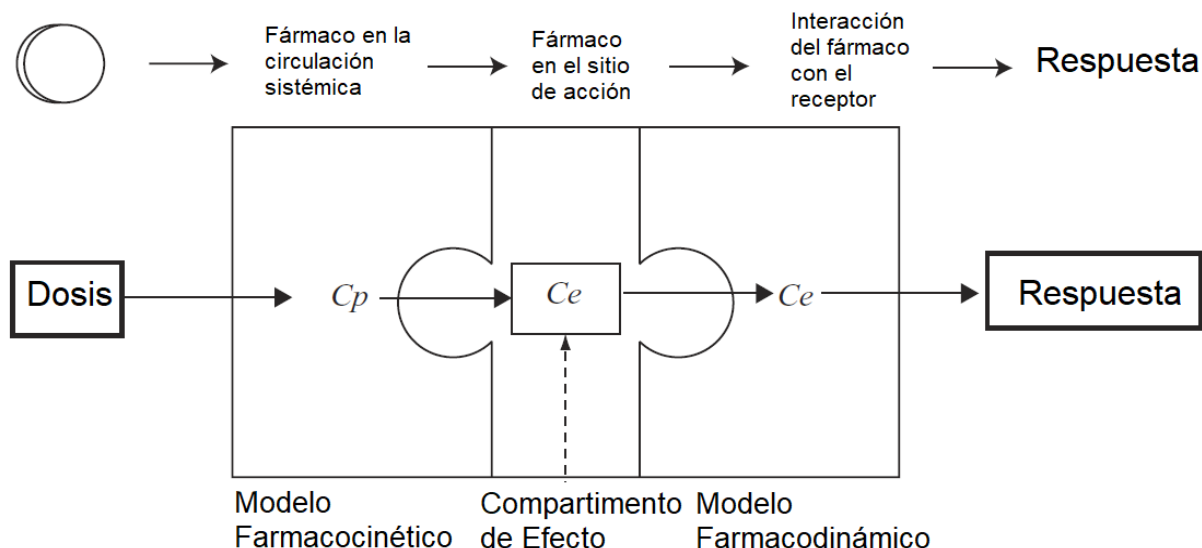


Figura 6. Esquema del modelo empírico FC/FD de la Biofase. Tomado de ⁶³.

Existe por supuesto una amplia variedad de modelos FC/FD que por sus supuestos no serán revisados en esta sección. A manera de mención, los modelos que consideran la acción de los segundos mensajeros o la conversión de intermediarios biológicos se ejemplifican en la Figura 7. Esos componentes fisiológicos presentan un curso temporal propio, ajeno a los parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos. Los modelos que incorporan un modelo de enlace que describa el curso temporal de estos intermediarios biológicos y conecten los modelos FC y FD son llamados generalmente de conversión (*turnover*) o de efecto indirecto. La principal diferencia con los modelos de la biofase es que el tiempo de efecto máximo en este último es independiente de la dosis, mientras que en los modelos de efecto indirecto este tiempo dependerá de la dosis⁸³.

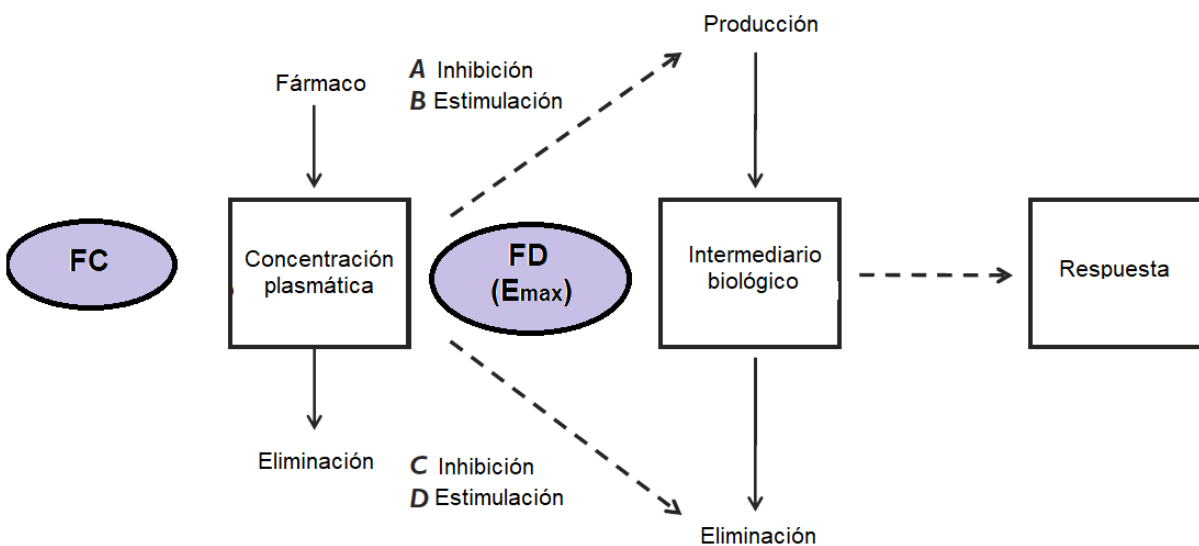


Figura 7. Esquema de los cuatro modelos mecánicos FC/FD indirectos. Tomado de ⁸³.

3 Planteamiento del problema y justificación

La glibenclamida posee propiedades físicas (una baja solubilidad) y farmacológicas (absorción limitada y generación de reacciones adversas —como la hipoglucemia—) que impactan negativamente en el desarrollo, eficacia y seguridad de los tratamientos hipoglucemiantes, basados en esquemas de liberación inmediata y de administración multidosis diaria por la vía oral, establecidos nacional e internacionalmente en la actualidad para pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2.

Una de las alternativas, para ofrecer una solución a los problemas asociados con las terapias multidosis de las formas farmacéuticas de liberación inmediata, es el desarrollo de formas farmacéuticas con base en sistemas de liberación modificada, para los cuales cada vez más se tiene registro de su potencial como una alternativa para desarrollar y emplear tratamientos con fármacos poco solubles, con estrecho margen terapéutico y para padecimientos degenerativos crónicos como el cáncer y diabetes *mellitus*, donde es necesario un control preciso de concentraciones sistémicas eficientes y seguras. Dentro de la vasta variedad de estrategias y tecnologías existentes, para la resolución de estos problemas, destacan los sistemas producidos con base en los materiales de sílice mesoporosa, como los implantes fabricados como monolitos mesoporosos de sílice. Estos

materiales han emergido como una estrategia farmacéutica potencial, debido primordialmente a su estructura, la cual resguarda la estabilidad química del fármaco que se incorpora en la red mesoporosa y posibilita la modificación del fenómeno de liberación (que ya de por sí es sostenida de manera intrínseca) y a su biocompatibilidad. De esta manera, la liberación de diversos compuestos depende y se puede controlar de manera precisa a través de canales de poros estrechos. Además, las propiedades de la forma mesoporosa de la sílice permiten que puedan ser incorporados fármacos en grandes cantidades, con lo que se puede reducir la frecuencia de las administraciones.

Por otra parte, si bien el desarrollo de un producto de liberación modificada para administración subcutánea supone la resolución de los problemas de la terapia que están asociados con la farmacocinética del fármaco en cuestión, los parámetros farmacodinámicos están sujetos al enlace entre el modelo farmacodinámico y el farmacocinético. A pesar de que el efecto depende de las concentraciones de fármaco, este enlace no es obvio y en muchas ocasiones no es directo. Así, el establecer un modelo más generalizado (Farmacocinético-Farmacodinámico —FC-FD—), permite que el efecto farmacodinámico sea relacionado directamente con el tiempo después de administrar una determinada dosis de fármaco. Consecuentemente, los modelos FC-FD proveen elementos para el entendimiento del curso temporal del efecto de un fármaco, en tanto a tres propiedades importantes: la magnitud del efecto, su inicio y su duración.

Por lo anterior, el desarrollo de un implante subcutáneo para la liberación modificada de glibenclamida, como alternativa a la administración oral y de liberación inmediata de este fármaco, contempla no solo su caracterización farmacotécnica, sino también su evaluación farmacológica mediante la determinación del modelo FC-FD que permita establecer la ventaja de esta propuesta en el control glucémico (en magnitud y duración de un efecto hipoglucemiante seguro) tanto en individuos normoglicémicos como en diabéticos.

4 Hipótesis

El curso temporal de las concentraciones plasmáticas de la glibenclamida, administrada desde un implante subcutáneo de sílice mesoporosa para la liberación modificada del fármaco en un modelo murino, será más uniforme en comparación con una administración equivalente por vía intraperitoneal de liberación inmediata.

5 Objetivo general

Comparar los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de las administraciones de glibenclamida a modelos murinos normoglicémicos y con diabetes *mellitus* inducida, a partir de un implante subcutáneo y de una inyección unidosis intraperitoneal, para evaluar las ventajas y desventajas del implante.

5.1 Objetivos específicos

- Caracterizar los atributos farmacotécnicos del implante fabricado por la técnica sol-gel, que permitan determinar el tamaño del implante por usar y sustentar el análisis de resultados del estudio farmacocinético-farmacodinámico.
- Implementar y validar la metodología analítica por CLAR, que permita determinar la pureza del principio activo, así como su concentración de este en el implante.
- Implementar y validar la metodología analítica por CLAR, que permita determinar la concentración del fármaco en la prueba de disolución y en el plasma tras la administración a los grupos experimentales.
- Diseñar el protocolo de estudio *in vivo* para llevar a cabo el estudio de farmacocinética y farmacodinamia tras la administración de los dos tratamientos a distintos grupos experimentales.
- Construir los modelos farmacocinético, farmacodinámico y de enlace entre estos, mediante la selección basada en los valores de verosimilitud logarítmica de los modelos más probables evaluados en el programa Monolix.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos empleando el análisis no compartimental, y realizar la comparación farmacocinética entre los dos tratamientos.
- Evaluar estadísticamente las diferencias entre perfiles y parámetros de los modelos farmacodinámico y farmacocinético, para sustentar la comparación entre los dos tratamientos.

6 Material y métodos

6.1 Materiales

6.1.1 Sustancias

Se emplearon estándares de referencia primarios: glibenclamida (Sigma-Aldrich) y felodipino (Sigma-Aldrich), con una pureza del 98.75 y 99.16, respectivamente; reactivos para la fabricación de los implantes: glibenclamida (Química Alkano), ortosilicato de tetraetilo (JT-Baker), ácido clorhídrico (JT-Baker), hidróxido de sodio (JT-Baker), etanol absoluto (JT-Baker); reactivos para los análisis, grado cromatográfico, en su caso, o grado analítico: acetonitrilo (Teqsiquim), fosfato monobásico de potasio (JT-Baker), ácido fosfórico (JT-Baker), octil-sulfonato de sodio (Sigma-Aldrich); para la preparación de los grupos experimentales: estreptozotocina mezcla de anómeros (Sigma-Aldrich); para el tratamiento de muestras biológicas: ácido acético glacial (JT-Baker), metanol (Teqsiquim); reactivos para la administración y tratamiento de los animales de experimentación: EtOH al 70 %, éter (JT-Baker), solución inyectable de heparina al 100 UI/mL agua desionizada y agua inyectable (Pisa).

6.2 Individuos experimentales

La evaluación biológica se llevó a cabo en ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Long-Evans, hembras, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de 300 ± 30 g de peso; mantenidas mínimamente durante un periodo de 24 h previo al desarrollo de los experimentos (descritos en las secciones siguientes) en cajas de polipropileno individuales, limpias y abastecidas para acceso a alimento estándar para roedores (*Purina Laboratory Rodent Diet 5001*) y agua *ad libitum*, bajo ciclos de luz-oscuridad de 12 h y condiciones ambientales de 20 ± 5 °C y 50 ± 10 % de humedad relativa. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la fase de luz, así como siguiendo las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de laboratorio y con apego a los requisitos establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999⁸⁷). La anestesia previa a las intervenciones quirúrgicas se realizó empleando una cámara saturada de éter.

6.2.1 Matriz biológica

6.2.1.1 Procedimiento para la toma de sangre por punción cardiaca

La matriz biológica fue tomada para fines de preparación de las muestras control, así como

para la validación del método bioanalítico.

Un grupo de 4 individuos fueron llevados hasta anestesia profunda en cámara saturada de éter dietílico. Una vez en anestesia, se colocó al individuo en posición dorsal y se realizó una punción cardiaca con aguja de calibre 21 G x 38 mm conectada a un adaptador para tubo colector de 4 mL. La punción se realizó comprobando que el individuo se encontraba, bajo anestesia profunda y sin alteraciones de la actividad respiratoria (se empleó un algodón impregnado de éter dietílico dentro de un tubo y acercando este al hocico del individuo).

La punción fue en un ángulo de 90 ° accediendo por el lado derecho del esternón, entre el espacio intercostal, y en el punto en que se detectó pulso cardiaco (aproximadamente 1.5 cm antes del diafragma) e introduciendo la aguja no más de 1 cm y hasta percibir haber atravesado el músculo cardiaco. Inmediatamente después de haber accedido correctamente al corazón, se colocó en el otro extremo de la aguja un tubo colector con sistema de llenado por vacío, con capacidad de 4 mL y que contenía 0.72 mg de EDTA dipotásico, el cual se dejó llenar completamente con sangre. El contenido del tubo, una vez lleno y retirado, fue homogeneizado sin agitación vigorosa. En cada caso se extrajeron 12 mL de sangre mediante una sola punción. Una vez finalizado, se sacrificó el individuo empleando 4 mL de éter dietílico en una cámara de 4 L.

6.2.1.2 Separación y obtención del plasma

Las muestras se centrifugaron a 6,000 rpm, a 4 °C y durante 10 min, para separar el plasma y recolectarlo en tubos de vidrio, llenándolos hasta un 75 % de su capacidad y tapándolos con tapón de baquelita. El plasma se mantuvo en congelación ($-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante al menos 12 h antes de ser empleado.

Con este procedimiento se obtuvieron aproximadamente 24 mL de plasma.

6.3 Metodología analítica

Se implementó la metodología analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la determinación de: 1, la pureza del principio activo; 2, la cantidad de este en el implante fabricado; 3, la cantidad disuelta en la prueba de disolución y 4, la concentración plasmática del fármaco. Las condiciones y parámetros de partida forman parte de investigaciones previas de la línea de investigación de implantes subcutáneos fabricados por la técnica sol-gel^{88,89}.

La adecuabilidad de la metodología fue comprobada mediante una validación parcial, siguiendo los criterios correspondientes en cada caso establecidos en la guía Q2 de la *International Council for Harmonisation (ICH)*⁹⁰.

Las condiciones generales de análisis fueron: técnica CLAR de fase reversa; una fase estacionaria de sílice C₈, de 150 x 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 µm; una fase móvil compuesta por acetonitrilo:solución amortiguadora de fosfatos 1X10⁻² M/octil-sulfonato de sodio 1X10⁻⁵ M, pH 3.5, en una proporción 55:45, con una velocidad de flujo de 2.2 mL/min; muestras de 25 µL con estándar interno de felodipino a 5 µg/mL y detectado por UV a λ=254 nm. El factor de respuesta se obtuvo como el cociente del área bajo la curva correspondiente al fármaco entre el área bajo la curva del estándar interno, de acuerdo con la Ecuación 3.

$$Respuesta = \frac{ABCC_f}{ABCC_{ei}}$$

Ecuación 3. Respuesta analítica

6.3.1 Adecuabilidad del sistema cromatográfico

A partir de una solución de glibenclamida en metanol, preparada a 250 µg/mL, y de otra solución de estándar interno a 50 µg/mL, se preparó una solución a 12.5 µg/mL de glibenclamida y 5 µg/mL de estándar interno. Esta se inyectó por sextuplicado (a partir del mismo vial) bajo las condiciones cromatográficas establecidas en la *sección 6.3*.

Se calcularon los valores de la media, desviación estándar y desviación estándar relativa de los valores de área bajo la curva del fármaco y del estándar interno, así como de la respuesta (Ecuación 3).

El sistema cromatográfico se consideró adecuado para realizar las determinaciones analíticas de cada día, si la desviación estándar relativa de cada variable fue menor que el 2%.

6.3.2 Validación del sistema analítico

Las concentraciones esperadas, después de aplicar los diferentes tratamientos y llevar muestras a análisis cromatográfico abarcan desde, 0.25 µg/mL (límite inferior de la curva de calibración del método analítico para la cuantificación de glibenclamida en medio de disolución) y hasta 12.5 µg/mL (límite superior de la curva de calibración del método analítico para la cuantificación de glibenclamida en plasma).

A partir de una solución de glibenclamida en metanol, preparada a 250 µg/mL, se tomaron los volúmenes necesarios para preparar soluciones a 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, y 12.5 µg/mL (véase la Tabla 6). A las soluciones se les adicionó el estándar interno y se analizaron directamente en el sistema cromatográfico.

Para los niveles 5.0 y 10 µg/mL se prepararon 3 repeticiones adicionales, a partir de la misma solución de glibenclamida.

A partir de los resultados de área bajo la curva, obtenidos tras el análisis cromatográfico de dichas soluciones, se construyó el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados de la Respuesta (Ecuación 3) en función de la concentración adicionada.

Las 24 determinaciones (3 repeticiones de 8 niveles), así como las 6 determinaciones para el nivel 5.0 y las 6 determinaciones para el nivel 10 µg/mL, se evaluaron estadísticamente según se establece en el *Anexo 1*, a fin de determinar la linealidad (respuesta en función de la concentración adicionada) y la precisión, respectivamente.

6.3.3 Método analítico para la valoración del contenido de glibenclamida en el implante

Considerando una administración de 7.5 mg/kg de glibenclamida a individuos de 300 ± 30 g de peso, las unidades de dosis (implantes) evaluadas con este método contuvieron 2.25 ± 0.225 mg de glibenclamida. El implante se tomó considerando el contenido teórico de glibenclamida por cada implante.

Dado que el fármaco se incorpora en la red mesoporosa del implante, el análisis contempló la trituración del implante y la extracción del fármaco con un disolvente orgánico.

6.3.3.1 Procedimiento del método analítico para la valoración de contenido

El implante fue triturado en un papel encerado, el polvo fue pesado y agregado a un matraz volumétrico de 25 mL con 20 de metanol. El matraz y su contenido fueron llevados a agitación por ultrasonido en un baño de agua a 20 ± 2 °C, durante 10 minutos, para finalmente ser llevados a volumen de 25 mL con el mismo disolvente.

Una solución de felodipino preparada a 50 µg/mL utilizando metanol como disolvente fue empleada como solución de estándar interno.

En un matraz volumétrico de 10 mL se colocó 1 mL de cada una de las dos soluciones

anteriores y se llevó a volumen con metanol. Esta solución, que contenía 10 µg/mL de glibenclamida y 5.0 µg/mL de estándar interno fue llevada a análisis cromatográfico. En la Figura 8 se resume el procedimiento descrito.

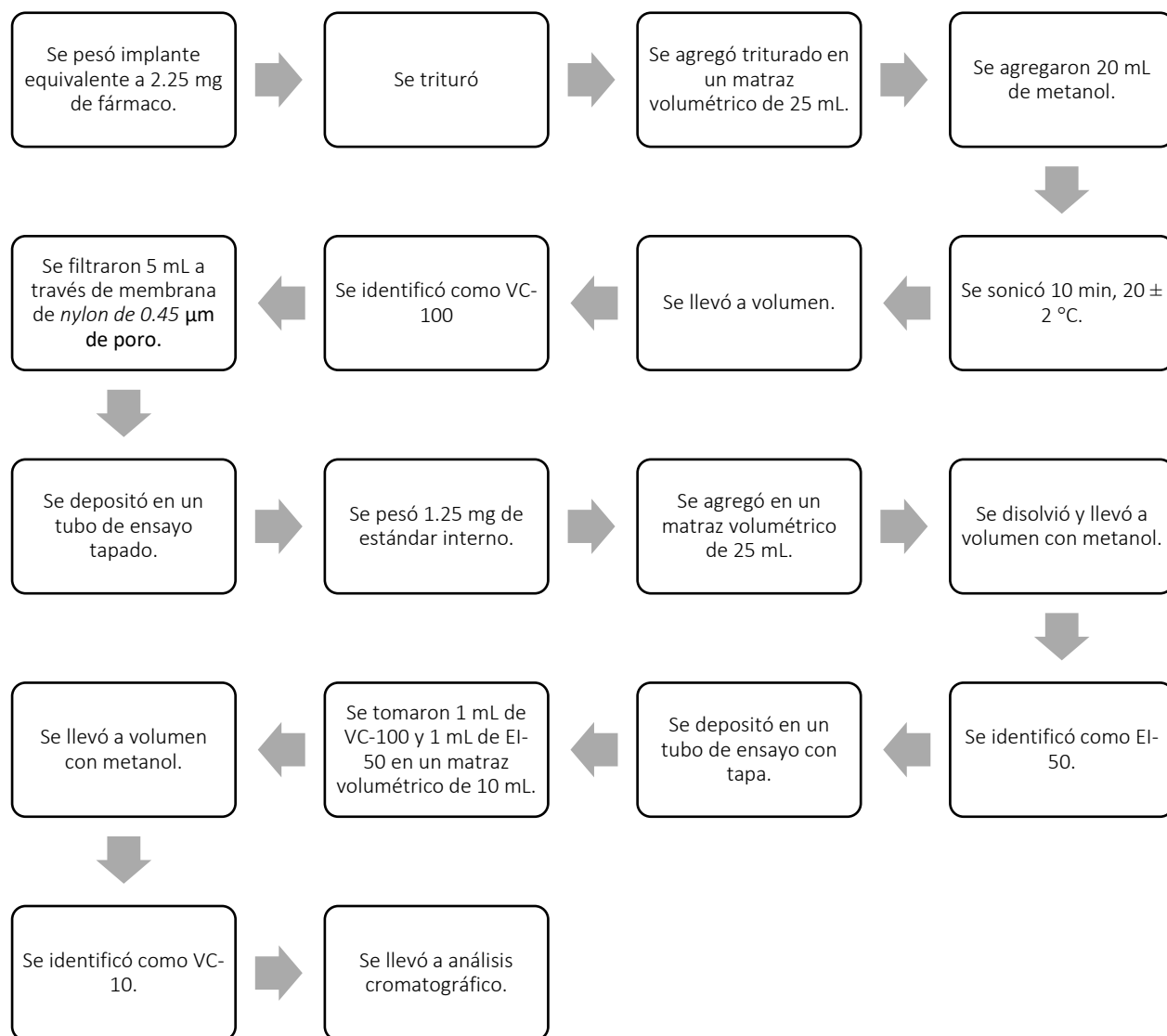


Figura 8. Diagrama de flujo para la valoración del contenido de glibenclamida en los implantes.

6.3.3.2 Curva de calibración del método analítico para la valoración de contenido

En la Tabla 4 se presenta la preparación de las soluciones para la construcción de la curva de calibración, a partir de una solución a 200 µg/mL. El procedimiento de análisis que se siguió se describe en la *sección 6.3.3.1*. A partir de pesadas independientes, se prepararon

tres repeticiones de cada uno de los cinco niveles indicados en la Tabla 4, para contar con 15 determinaciones.

Tabla 4. Soluciones para la construcción la curva de calibración del método analítico para la valoración del contenido de glibenclamida en los implantes.

Solución	Alícuota* (mL)	C (µg/mL)	Contenido equivalente (mg)*
Doble cero	-	-	0
Cero	Sólo 1 mL de estándar interno	-	0
80%	0.40	8	2.00
90%	0.45	9	2.25
100%	0.50	10	2.50
110%	0.55	11	2.75
120%	0.60	12	3.00

*La solución de partida tuvo una concentración de 200 µg/mL de glibenclamida. El volumen final de estas muestras fue de 10 mL de metanol.

- **Tratamiento de los datos**

A partir de los resultados de área bajo la curva, se construyó el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados de la respuesta (Ecuación 3) en función de la concentración adicionada. El modelo fue construido en *SPSS Statistics* v. 23.0 para registrar los coeficientes β_0 y β_1 ; el coeficiente de determinación r^2 y otros parámetros que también fueron utilizados para la validación de este método, como se describe en el *Anexo 1*. Esta ecuación fue empleada para interpolar las respuestas de las muestras de concentración desconocida.

6.3.3.3 Validación del método analítico para la valoración del contenido

Todas las determinaciones corresponden a muestras preparadas de acuerdo con lo establecido en la *sección 6.3.3.2*.

- **Especificidad**

Los resultados de cinco mediciones de muestras cero, cinco mediciones de muestras doble cero; así como cinco mediciones de implante placebo, cinco mediciones correspondientes al 100 % (Tabla 4), y cinco mediciones de muestras al 100 % adicionadas con implante

placebo, fueron evaluados estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*. Las cinco muestras cero, las cinco muestras doble cero y las cinco muestras de placebo no debieron presentar interferencias en el tiempo de retención de la señal del analito.

- **Linealidad**

Con las quince determinaciones, obtenidas a partir de la construcción de la *Curva de calibración*, se determinó la relación respuesta-concentración, mediante el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Repetibilidad**

A partir de seis mediciones de los niveles al 80, 100 y 120 %, considerando las tres determinaciones análogas de la curva de calibración/linealidad y de acuerdo con la Tabla 4, fue evaluada la varianza estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Precisión intermedia**

El analista auxiliar y el analista principal, ambos en dos días diferentes, realizaron por triplicado determinaciones independientes de los niveles 80, 100 y 120 %, respectivamente. El Análisis de Varianza fue realizado según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Exactitud**

A partir de las determinaciones usadas en *Repetibilidad*, se obtuvieron los porcentajes de recobro. Estos fueron evaluados estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

6.3.4 Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en el medio de disolución

Considerando una administración de 7.5 mg/kg de glibenclamida a individuos de 300 ± 30 g de peso, las unidades de dosis (implantes) evaluadas en la prueba de disolución contuvieron 2.25 ± 0.225 mg de glibenclamida. Dado a que el implante liberó solo el fármaco soluble, las muestras tomadas en cada tiempo de muestreo serán llevadas directamente al análisis cromatográfico sin filtración.

6.3.4.1 Procedimiento del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución

Se tomó un implante íntegro conteniendo el equivalente a 2.25 ± 0.225 mg de glibenclamida. El implante se sometió a la prueba de disolución según la metodología descrita en la *sección* 6.4.2.5.

Este método no empleó la adición de estándar interno (a fin de no diluir la muestra), por lo que las muestras tomadas de la prueba de disolución fueron llevadas inmediatamente a análisis cromatográfico. En la Figura 9 se resume el procedimiento descrito.

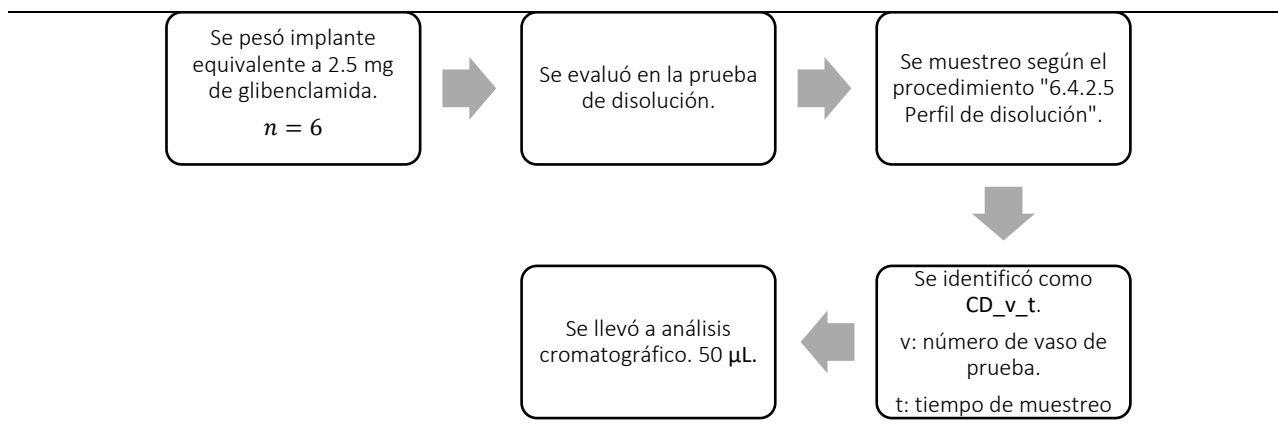


Figura 9. Diagrama de flujo para la cuantificación de la cantidad disuelta en la prueba de disolución.

6.3.4.2 Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución

A partir de una solución de glibenclamida en metanol, preparada a 50 µg/mL, en la que se agregó un implante placebo íntegro y equivalente en peso al que se sometió a la prueba de disolución, se prepararon soluciones a concentraciones de 0.25, 1.25, 2.5, 3.75 y 5 µg/mL, como se muestra en la Tabla 5. Las soluciones fueron preparadas en el medio de disolución y analizadas como se establece en la *sección* 6.3.4.1. A partir de pesadas independientes, se prepararon tres repeticiones de cada uno de los cinco niveles indicados en la Tabla 5, para contar con 15 determinaciones.

Tabla 5. Soluciones para la construcción de la curva de calibración del método analítico para la cuantificación de glibenclamida en el medio de disolución.

Nivel	Alícuota* (mL)	C (µg/mL)	Contenido disuelto equivalente (mg de la unidad de dosis)
Cero	0	0	0
5%	0.05	0.25	0.13
25%	0.25	1.25	0.63
50%	0.50	2.50	1.25
75%	0.75	3.75	1.88
100%	1.00	5.00	2.50

*La solución de partida tuvo una concentración de 50 µg/mL de glibenclamida. El volumen final de estas muestras fue de 10 mL de medio de disolución.

● Tratamiento de los datos

A partir de los resultados obtenidos se construyó el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados del Área Bajo la Curva del pico cromatográfico correspondiente al fármaco ($ABCC_f$) en función de la concentración adicionada. El modelo fue construido en *SPSS Statistics* v. 23.0 para registrar los coeficientes β_0 y β_1 ; el coeficiente de determinación r^2 y otros parámetros a ser utilizados para la validación de este método, como se describe en el *Anexo 1*. La ecuación que describa el modelo fue empleada para interpolar las señales analíticas de muestras de concentración desconocida. A partir de los valores de concentración interpolada, se calculó, por ajuste del factor de dilución, la cantidad disuelta.

6.3.4.3 Validación del método para la cuantificación en el medio de disolución

Todas las determinaciones corresponden a muestras preparadas de acuerdo con lo establecido en la *sección 6.3.4.2*.

● Especificidad

Los resultados de cinco mediciones de muestras cero, cinco mediciones de muestras preparadas a partir de implante placebo; así como cinco mediciones de muestras al 100 % de la curva de calibración (Tabla 5) y cinco mediciones de estas muestras al 100 % adicionadas con implante placebo fueron evaluadas estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*. Las cinco muestras cero y las cinco muestras de placebo, no debieron presentar interferencias en el tiempo de retención de la señal del analito.

- **Límite de detección y de cuantificación**

Mediciones por triplicado, preparadas y equivalentes al 5, 1 y 0.2 %, de acuerdo con la Tabla 5, fueron determinadas de acuerdo con lo establecido en la *sección 6.3.4.2*. De cada determinación fue obtenida su relación señal/ruido. Los límites de detección y de cuantificación se establecieron según los criterios presentados en el *Anexo 1*.

- **Linealidad**

Las quince determinaciones, obtenidas a partir de la construcción de la *Curva de calibración*, fueron evaluadas en función de la concentración adicionada, mediante el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Repetibilidad**

A partir de seis mediciones de los niveles al 5, 50 y 100 %, considerando las tres determinaciones análogas de la curva de calibración/linealidad y de acuerdo con la Tabla 5, fue evaluada la varianza estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Precisión intermedia**

El analista auxiliar y el analista principal, ambos en dos días diferentes, realizaron por triplicado determinaciones independientes de los niveles al 5, 50 y 100 %, respectivamente. El Análisis de Varianza fue realizado según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Exactitud**

A partir de las determinaciones usadas en *Repetibilidad*, se obtuvieron los porcentajes de recobro. Estos fueron evaluados estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

6.3.5 Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en plasma

La cantidad de muestra necesaria para ser tratada y analizada es de 0.3 mL de sangre, en cada caso (volumen de muestra en cada tiempo, de cada individuo del estudio farmacocinético y farmacodinámico). Considerando que fueron 11 puntos de muestreo para cada individuo, esto supuso extraer 3.3 mL de sangre a individuos de 300 ± 30 g de peso. Esto fue establecido para no comprometer el equilibrio fisiológico del modelo animal de manera innecesaria.⁹¹

6.3.5.1 Procedimiento del método analítico para la cuantificación en plasma

Para el presente estudio se fijó el volumen a 100 μL de muestra de plasma obtenido de la correspondiente muestra sanguínea.

Para el desarrollo del método se utilizó felodipino como estándar interno, preparado a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ utilizando solución al 1 % de ácido acético en metanol ($\text{AcOH}:\text{MeOH}$, 1:99) como disolvente.

En cada vial se agregaron 100 μL del plasma de cada muestra. A cada una de ellas les fue agregado 200 μL de la solución de felodipino. Las muestras fueron agitadas vigorosamente (2,500 rpm) en un vórtex durante 1.5 min, para luego agregarles 100 μL de una solución amortiguadora de fosfatos, 0.05 M, pH 6.8 ($\text{SA}_{\text{pH}=6.8}$), posteriormente las muestras fueron agitadas a 100 rpm en un vórtex durante 5 s. Se tomaron y transfirieron 350 μL de la muestra a un microtubo de polipropileno que fue llevado a centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante, fueron tomados 200 μL , en porciones de 50 μL , asegurando no se arrastrase parte del precipitado en esta toma y transferidos a un microvial de vidrio.

Finalmente, las muestras fueron analizadas empleando el método cromatográfico previamente validado. En la Figura 10 se resume el procedimiento descrito.

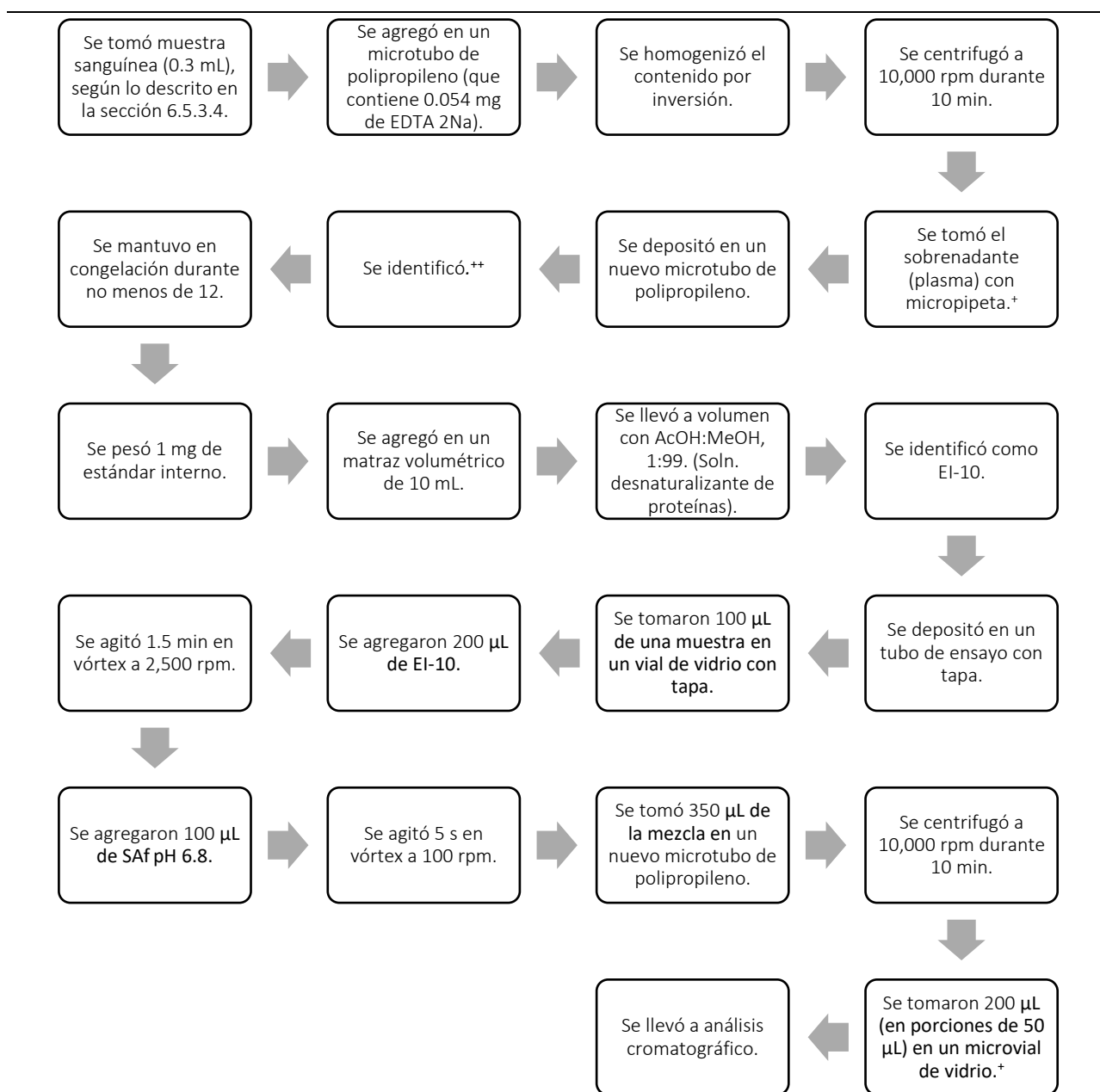


Figura 10. Diagrama de flujo para la cuantificación de las concentraciones de glibenclamida en plasma.

+Después de las operaciones de centrifugación, la toma de volumen de sobrenadante con micropipeta fue cuidadosa de no tomar material sedimentado.

++La clave de identificación de cada muestra fue preservada en cada cambio de contenedor de ésta hasta su disposición y eliminación.

6.3.5.2 Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en plasma

En la Tabla 6 se presenta la preparación de las soluciones para la construcción de la curva de calibración, a partir de una solución a 250 µg/mL. El procedimiento de análisis que se siguió se describe en la Figura 10. Las soluciones fueron tratadas con la adición de estándar interno y analizadas como se establece en la *sección 6.3.5.1*. A partir de pesadas

independientes, se prepararon tres repeticiones de cada uno de los seis niveles indicados en la Tabla 6, para contar con 18 determinaciones.

Tabla 6. Soluciones para la construcción de la curva de calibración del método para la cuantificación de glibenclamida en plasma

Nivel	Alícuota* (mL)	C (µg/mL)
Doble cero	-	-
5%	0.02	0.5
25%	0.10	2.5
50%	0.20	5.0
75%	0.30	7.5
100%	0.40	10.0
125%	0.50	12.5

*La solución de partida tuvo una concentración de 250 µg/mL de glibenclamida. El volumen final de estas muestras fue de 10 mL de plasma.

- **Tratamiento de los datos**

A partir de los resultados de área bajo la curva, obtenidos tras el análisis cromatográfico de dichas soluciones, se construyó el modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados de la respuesta (Ecuación 3) en función de la concentración adicionada. El modelo fue construido en *SPSS Statistics* v. 23.0 para registrar los coeficientes β_0 y β_1 ; el coeficiente de determinación r^2 y otros parámetros que también fueron utilizados para la validación de este método, como se describe en el *Anexo 1*. La ecuación que describió el modelo fue empleada para interpolar las señales analíticas de muestras de concentración desconocida.

6.3.5.3 Validación del método analítico para la cuantificación en plasma

- **Especificidad**

Los resultados de cinco mediciones de muestras cero, cinco mediciones de muestras doble cero; así como cinco mediciones correspondientes al 100 % (Tabla 6) y cinco mediciones de estas muestras al 100 % adicionadas en plasma fueron evaluadas estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*. Las cinco muestras cero y las cinco muestras doble cero, no debieron presentar interferencias en el tiempo de retención de la señal del analito.

- **Límite de detección y de cuantificación**

Mediciones por triplicado, equivalentes al 5, 2.5, 1.25, 0.75 y 0.5 %, de acuerdo con la Tabla 6, fueron determinadas de acuerdo con lo establecido en la *sección 6.3.5.2*. De cada determinación fue obtenida su relación señal/ruido. Los límites de detección y de cuantificación se establecieron según los criterios presentados en el *Anexo 1*.

- **Linealidad**

Con las dieciocho determinaciones, obtenidas a partir de la construcción de la *Curva de calibración*, se determinó la relación respuesta-concentración, mediante el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Repetibilidad**

A partir de seis mediciones de los niveles de concentración 0.5, 5.0 y 12.5 µg/mL (considerando las tres determinaciones análogas de la curva de calibración/linealidad) fue evaluada la varianza estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Precisión intermedia**

El analista auxiliar y el analista principal, ambos en dos días diferentes, realizaron por triplicado determinaciones independientes de los niveles de concentración 0.5, 5.0 y 12.5 µg/mL. El Análisis de Varianza fue realizado según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

- **Exactitud**

A partir de las determinaciones usadas en *Repetibilidad*, se obtuvieron los porcentajes de recobro. Estos fueron evaluados estadísticamente según el modelo presentado en el *Anexo 1*.

6.4 Implante subcutáneo de glibenclamida

6.4.1 Fabricación

Se fabricó 1 lote. La técnica inicial de fabricación de implantes subcutáneos⁸⁸ fue optimizada para quedar como se describe a continuación.

Un lote consistió en, primero, preparar 100 mL de sol por reacción de hidrólisis, para lo cual se tomaron 50 mL de ortosilicato de tetraetilo, 50 mL de etanol absoluto, 4 mL de agua desionizada y 0.16 mL de solución de ácido clorhídrico 1 M que se mezclaron en un matraz

bola con agitación mecánica constante, a 450 rpm, bajo sistema cerrado y con termómetro de inmersión parcial. El sistema se calentó hasta 60 °C con canastilla de calentamiento conectada a reóstato, manteniendo esta temperatura durante 1.5 h. Transcurrido este periodo, se agregaron al sistema 4 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico 1 M, a la vez que se retiró del calentamiento, pero manteniendo la agitación hasta que alcanzó una temperatura de 30 °C. Para la adición de la glibenclamida, 875 mg de esta se disolvieron, bajo un baño de ultrasonido durante 30 min, en 40 mL de etanol para después añadir 100 mL de sol. La mezcla anterior se mantuvo bajo agitación mecánica constante (100 rpm) y a 30 °C.

Para generar el gel, por reacción de condensación, se mezclaron en un tubo de poliestireno 1.8 mL de sol cargado con fármaco con 0.9 mL de solución de hidróxido de sodio 0.15 M. Los tubos fueron cerrados con polipropileno adherible y homogeneizados por inmersión del tubo. Los tubos fueron colocados en posición horizontal dentro de una charola de aluminio, y llevadas a estufa de convección mantenida previamente a 60 °C. Tras 72 h, los implantes subcutáneos resultantes (xerogeles monolíticos) fueron separados de los tubos de poliestireno.

Cada implante fue pesado y acondicionado en un tubo de polipropileno de tamaño adecuado para todos ellos. El peso individual y el número de monolitos obtenidos fue debidamente registrado, así como las observaciones que hubiese tras el proceso de fabricación. El lote acondicionado fue resguardado en desecador a vacío hasta el momento de su uso o análisis.

Para los tratamientos control (descritos en la *sección 6.5.3.2*), se fabricó un lote de implantes placebo; es decir, sin la adición de glibenclamida.

A partir de los datos de peso individual, número de implantes obtenidos y cantidad de glibenclamida adicionado en el proceso de fabricación, se obtuvo el contenido teórico por implante, como unidad, y por unidad de masa ($\% m/m$).

6.4.2 Evaluación farmacotécnica del implante subcutáneo de glibenclamida

6.4.2.1 Variación de peso

La variación de peso intralote se determinó por cálculo de la desviación estándar relativa de todos los pesos individuales de cada implante obtenido tras la fabricación del lote.

6.4.2.2 Dureza

La resistencia mecánica de los implantes se evaluó por determinación de su dureza. En un durómetro se colocó una muestra de implante al que se determinó, por avance longitudinal, la resistencia a la ruptura en kg. La determinación se realizó por triplicado, por cada lote, y con muestras de 1 cm de longitud.

6.4.2.3 Valoración del contenido

El contenido de glibenclamida incorporado en los implantes subcutáneos fue determinado según se establece en la *sección 6.3.3.1*. La determinación del contenido fue realizada por triplicado.

6.4.2.4 Uniformidad de dosis

La uniformidad de dosis se estableció según el procedimiento de Uniformidad de Contenido, establecido en la F. E. U. M. 11^a Ed⁹², para lo cual se consideró el valor de la valoración del contenido de 10 implantes para calcular, considerando una carga del 100 %, con respecto al valor teórico de glibenclamida, un valor máximo de aceptación (VA) de 15 % para la media (y) del contenido, expresada en porcentaje con base en la carga de glibenclamida añadida.

Una vez determinado el contenido de los 10 implantes, se calculó la media del contenido de glibenclamida en los implantes analizados y se expresó en porcentaje con base a la cantidad de glibenclamida añadida en la fabricación del lote. Si la media del contenido fuese mayor o igual que 98.5 % y menor o igual que 101.5 %, el valor de aceptación se calcularía con la Ecuación 4; mientras que si la media del contenido fuese menor que 98.5 %, el valor de aceptación se calcularía con la Ecuación 5 y, si la media del contenido resultase mayor que el 101.5 %, el valor de aceptación se calcularía de acuerdo con la Ecuación 6.

$$VA = kDE$$

Ecuación 4. Valor de aceptación si $y=100 \pm 1.5$ %

$$VA = 98.5 - y + kDE$$

Ecuación 5. Valor de aceptación si $y < 98.5$ %

$$VA = y - 101.5 + kDE$$

Ecuación 6. Valor de aceptación si $y > 101.5$ %

Donde

k es la constante de aceptabilidad. Para $n = 10$, $k = 2.0$; para $n = 30$, $k = 2.4$

y la media del contenido de las muestras, expresado en porcentaje

DE la desviación estándar de la muestra

En cualquier caso, se establece la uniformidad de dosis si:

$$VA \leq 15 \%$$

En el caso en que el valor de aceptación hubiese sido mayor a 15 %, se procedería a determinar el contenido de 20 implantes adicionales, se calcularía la media del contenido de glibenclamida en los implantes analizados y se expresaría en porcentaje con base a la cantidad de glibenclamida añadida en la fabricación del lote. El valor de aceptación se calcularía con las ecuaciones 4, 5 o 6, según corresponda y considerando una $n = 30$.

En cualquier caso, se establecería la uniformidad de dosis si:

$$VA \leq 25 \%$$

y todos los valores individuales de contenido cumplen con:

$$0.75M \leq y_i \leq 1.25M$$

Donde

M es el valor de referencia de la media de la muestra, expresada en porcentaje.

Si la media del contenido resultase mayor o igual que 98.5 % y menor o igual que 101.5 %, $M = y$; mientras que si la media del contenido hubiese sido menor que 98.5 %, $M = 98.5 \%$ y, si la media del contenido hubiese resultado mayor que el 101.5 %, $M = 101.5 \%$.

Los resultados de contenido de glibenclamida en cada implante analizado, el número de implantes analizados, promedio del contenido valorado y los resultados de las ecuaciones correspondientes, fueron debidamente registrados para el lote fabricado.

6.4.2.5 Perfil de disolución

De acuerdo con los datos de valoración del lote, se seccionaron y pesaron 6 unidades de implante subcutáneo (unidades de dosis), conteniendo 2.5 ± 0.25 mg de glibenclamida. Una vez pesados, los implantes se resguardaron en tubos de ensayo con tapa, de manera independiente y debidamente identificados.

En 6 vasos de fondo redondo, con capacidad para 900 mL, se vaciaron 500 mL de medio de disolución. El medio de disolución consistió en una solución amortiguadora de fosfatos

0.05 M, pH 6.5, filtrada a través de membrana de nylon, de 0.45 μm de diámetro de poro y desgasificada.

Los vasos fueron colocados y asegurados debidamente en un disolutor Varian, modelo Vankel 700 previamente calificado. Para el estudio se empleó el aparato 2 (paletas) a 2.5 cm de distancia del fondo del vaso, una velocidad de agitación de 75 rpm y a una temperatura de 32 ± 1 °C.

Los implantes fueron agregados con desfase temporal, según se establece en la Tabla 7.

Tabla 7. Programación para el inicio y toma de muestras en la prueba de disolución.

Muestra	Unidad de prueba					
	1	2	3	4	5	6
	Desfase (min)					
	+0	+ 1.5	+ 3.0	+ 4.5	+ 6.0	+ 7.5
	t_m (min)					
15	15	16.5	18	19.5	21	22.5
30	30	31.5	33	34.5	36	37.5
45	45	46.5	48	49.5	51	52.5
60	60	61.5	63	64.5	66	67.5
120	120	121.5	123	124.5	126	127.5
180	180	181.5	183	184.5	186	187.5
240	240	241.5	243	244.5	246	247.5
300	300	301.5	303	304.5	306	307.5
390	390	391.5	393	394.5	396	397.5
480	480	481.5	483	484.5	486	487.5

En cada $t_m \pm 2$ s fueron tomados 5 mL. Dado que la unidad de dosis integra, sometida a la prueba, libera solo el fármaco soluble, las muestras obtenidas en cada punto de muestreo no fueron filtradas. La cantidad de glibenclamida disuelta fue determinada según se establece en la *sección 6.3.4.1*.

El valor de cantidad disuelta, la media, desviación estándar y desviación estándar relativa, fueron registrados. El perfil de disolución de las 6 unidades de prueba se representó gráficamente como el porcentaje de la cantidad disuelta en función del tiempo, mostrando para cada punto de muestreo la desviación estándar. Por ajuste matemático, se determinó

el modelo que mejor describiera la cinética del proceso de disolución.

A partir del modelo establecido, y del perfil mismo, se obtuvieron los valores de eficiencia de la disolución, tiempo medio de disolución, constante de la disolución y tiempo de vida media de la disolución.

6.5 Estudio farmacocinético y farmacodinámico del implante subcutáneo de glibenclamida

6.5.1 Conformación de los grupos de experimentación

La evaluación farmacológica del implante subcutáneo consistió en la comparación de este frente a la administración intraperitoneal de una suspensión del fármaco, en dos clases de individuos de experimentación: diabéticos inducidos y normoglicémicos. La administración de implantes subcutáneos placebos en individuos de ambas clases fue realizada para contar con grupos control positivo y negativo, respectivamente. Se conformaron aleatoriamente seis grupos de seis individuos cada uno, que fueron identificados individualmente, así como grupalmente tal como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Grupos experimentales			
Grupo	Tipo de individuos	Tratamiento	Clave
1	Diabéticos inducidos	Prueba: Implante subcutáneo	P-Di
2	Normoglicémicos	Prueba: Implante subcutáneo	P-Ng
3	Diabéticos inducidos	Referencia: Suspensión intraperitoneal	R-Di
4	Normoglicémicos	Referencia: Suspensión intraperitoneal	R-Ng
5	Diabéticos inducidos	Control: Implante subcutáneo placebo	C (+)
6	Normoglicémicos	Control: Implante subcutáneo placebo	C (-)

En una base de datos se registró, para cada individuo identificado, su peso y el grupo

experimental asignado.

6.5.2 Preparación de los individuos de experimentación

6.5.2.1 Inducción de la patología

Un par de días antes de la administración de los tratamientos, a los grupos R-Di, P-Di y C(+). se les indujo diabetes *mellitus*, empleando el método descrito por Junod⁴⁹. Para lo cual, tras 8 horas de ayuno, se preparó la cantidad suficiente de una solución salina fisiológica (0.9 % NaCl) ajustada a pH 4.5 con una solución amortiguadora de citratos (ácido cítrico/citrato de sodio) y se disolvió en esta la cantidad necesaria de estreptozotocina (ETZ) para administrar un volumen de 2.5 mL/kg, equivalente a una dosis única de 55 mg/kg.

Transcurrido un periodo de 48 h después de la administración de ETZ, se determinó el nivel de glucosa en sangre, mediante el método de la glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD-POD)⁹³ y se consideró a los individuos como diabéticos si el nivel de glucosa en sangre fue mayor que 250 mg/dL. Se verificó, además, la glucemia en los individuos de los grupos R-Ng, P-Ng y C(-). Se aseguró el resguardo de los individuos según lo descrito en la *sección 6.2*.

6.5.2.2 Colocación de la vía para toma de muestra

El mismo día, y previo a la administración de los diferentes tratamientos, se insertó externamente una vía de canalización para administración y toma (catéter) directamente en la vena lateral de la cola, mediante la cual se tomaron las muestras durante el estudio.

Cada animal fue inmovilizado dentro de una camisa de felpa diseñada específicamente para contener y poder manipular al individuo, sin afectar su respiración ni ejercer presión innecesaria⁹¹. Una vez inmovilizado, y en posición dorsal, se sumergió la cola del animal en agua a 45 ± 2 °C, durante no más de 1 min y hasta observar a través de la piel la dilatación de la vena lateral.

El punto localizado aproximadamente a 5 cm de la punta de la cola se tomó con los dedos índice y pulgar, doblándola en un ángulo de casi 30 ° para insertar la aguja con el catéter a través de la piel e introducirlos 0.5 cm dentro de la vena. Esta operación se realizó sosteniendo firmemente la cola, pero sin generar presión innecesaria que pueda incomodar o hacer reaccionar al animal o, inclusive, evitar el retorno sanguíneo, y verificando que la inserción se realizara en un ángulo de 0 ° una vez atravesada la piel; asegurando que el catéter entre en la vena.

La aguja hipodérmica se retiró y con esto se comprobaba la canalización efectiva, por observación de un flujo constante y abundante de sangre. Este flujo fue recolectado en un tubo de polipropileno que contiene solución de EDTA disódico como agente anticoagulante. Esta muestra recolectada correspondió en cada individuo a su muestra $t=0$. Una vez que se purgó todo el volumen del catéter con sangre, se colocó un tapón con vía de acceso puncionable. El catéter se aseguró a la cola del individuo con cinta adhesiva.

A través de la vía de acceso (tapón) se administró 0.3 mL de solución de heparina sódica a 100 UI/mL.

6.5.3 Ejecución del estudio

El estudio se llevó a cabo, de manera independiente, en dos fases:

- Fase I. Individuos normoglicémicos. Grupos P-Ng, R-Ng y C(-)
- Fase II. Individuos diabéticos. Grupos P-Di, R-Di y C(+)

En cada fase, se trabajó con un individuo de cada grupo correspondiente, cada día durante 6 días consecutivos, para abarcar a los 18 individuos de cada fase.

Los individuos, ya preparados con vía para toma de muestra, fueron llevados a anestesia profunda en una cámara saturada de éter, para inmediatamente ser administrados con los diferentes tratamientos. A fin de poder tomar las muestras sanguíneas con prontitud y sin omisiones o traslapes, la programación se estableció según la Tabla 9.

Tabla 9. Programación para el inicio y toma de muestras en el estudio FC/FD.

Muestra	Grupo		
	R-Ng o R-Di	C(-) o C(+)	P-Ng o P-Di
	Desfase (min)		
	+ 0 min	+ 5 min	+ 10 min
	Tiempo en el cronómetro para la toma de muestra		
0	0	5	10
15	15	20	25
30	30	35	40
45	45	50	55
60	60	65	70
120	120	125	130
180	180	185	190
240	240	245	250
300	300	305	310
390	390	395	400
480	480	485	490

6.5.3.1 Administración del implante subcutáneo. Grupos P-Ng y P-Di

Considerando el peso de cada individuo, y el contenido de glibenclamida en el implante, éste se seccionó y se pesó una porción adecuada para administrar 7.5 ± 0.25 mg/kg a cada individuo. Una vez pesado, el implante se resguardó en un tubo de ensayo con tapón, debidamente identificado con el código del individuo correspondiente.

En la mesa de trabajo se dispuso del material quirúrgico necesario para administrar de manera subcutánea el implante correspondiente en la zona de la nuca del individuo. Además, una solución desinfectante fue empleada, tanto para la piel como para el instrumental quirúrgico, y fue consistente en una solución de yoduro de potasio al 2.5 % en etanol al 50 %.

El implante fue colocado dentro de un tubo quirúrgico de acero inoxidable en su extremo frontal. Por el otro extremo, una varilla fue empleada para mantener al implante en posición. El individuo fue llevado a anestesia general profunda en una cámara saturada de éter dietílico. La anestesia se mantuvo durante todo el procedimiento. A través de un corte transversal en la nuca del individuo (previamente desinfectada) se introdujo el implante y se

aseguró su inserción con ayuda de la varilla. En este punto fue retirada la anestesia para que comenzara con su recuperación. Concluido el procedimiento, se aplicó solución desinfectante por sobre la incisión y se permitió al individuo salir de la anestesia en un espacio ventilado. La dosis y peso del implante administrado se registró debidamente para cada individuo, de cada grupo.

6.5.3.2 Administración de placebo. Grupos C(-) y C(+)

A los individuos de estos grupos se les colocó un implante sin fármaco (placebo), el mismo procedimiento descrito en la sección anterior. El peso del implante administrado se registró debidamente para cada individuo, de cada grupo.

6.5.3.3 Administración de la suspensión intraperitoneal. Grupos R-Ng y R-Di

A estos grupos, se les administró un volumen mínimo de 0.8 mL y máximo de 1.2 mL. Para ello se suspendió la cantidad necesaria de glibenclamida en un vehículo consistente en propilenglicol al 2 % en solución fisiológica inyectable, para administrar una dosis de 7.5 ± 0.25 mg/kg.

La administración se realizó de manera intraperitoneal, en la zona abdominal derecha. La dosis y volumen de la suspensión administrada se registró debidamente para cada individuo, de cada grupo.

6.5.3.4 Toma y tratamiento de muestras

Se tomaron muestras de 300 μ L a los 15, 30, 45 y 60 min de haber iniciado el estudio; posteriormente a las 2, 3, 4, 5, 6.5 y 8 h. En todos los casos, terminada la toma de muestra, la vía de acceso fue heparinizada con 300 μ L (o un volumen igual al recolectado en sangre) de heparina sódica (100 UI/mL). Las muestras fueron transferidas a microtubos de polipropileno que contenían 0.54 mg de EDTA dipotásico; se homogeneizó el contenido y se mantuvieron en refrigeración (5 °C) durante no más de 30 min. El plasma se obtuvo por centrifugación empleando una centrifuga adaptada a 4 °C, a 10,000 rpm y durante 10 minutos. El plasma fue transferido a un nuevo microtubo de polipropileno, el cual fue mantenido en congelación (-18 °C) durante al menos 12 h y hasta el momento de su análisis. El volumen de muestra tomado de cada individuo se registró debidamente para cada tiempo de muestreo,

Al finalizar la serie de tomas de muestra, el individuo fue llevado a una cámara de dióxido

de carbono para ser sacrificado.

6.5.4 Análisis de las muestras

Una vez obtenidas las muestras, se determinaron las concentraciones plasmáticas de glibenclamida, así como la glucemia sanguínea.

6.5.4.1 Cuantificación de la concentración plasmática de glibenclamida

La concentración plasmática de glibenclamida de las muestras fue determinada según se establece en la *sección 6.3.5.1*. El valor de concentración plasmática fue obtenido por interpolación en la curva de calibración.

6.5.4.2 Determinación de los valores de glucemia sanguínea

Durante la ejecución del estudio, una vez tomada la muestra fue colocada sobre una tira reactiva de un glucómetro, para obtener la lectura correspondiente.

6.5.5 Tratamiento de los datos

6.5.5.1 Perfiles plasmáticos de glibenclamida

Los datos de concentración plasmática de glibenclamida, de cada grupo, fueron representados gráficamente en función del tiempo, con sus respectivas desviaciones estándar, para todos los tiempos de muestreo. Además del análisis basado en los parámetros farmacocinéticos obtenidos, se realizó un análisis con base en la comparación visual de los perfiles. Los valores de concentración plasmática de glibenclamida fueron empleados directamente (sin transformación) como la variable farmacocinética del modelo FC-FD.

6.5.5.2 Perfiles glucémicos

La glucemia de cada grupo (n=6) fue representada gráficamente en función del tiempo, con sus respectivas desviaciones estándar para todos los puntos de muestreo. A partir de los datos de cada perfil glucémico, se calculó el Área Bajo la Curva del perfil glucémico (ABC_g), de acuerdo con las Ecuaciones 7 y 8.

$$ABC_g = \frac{gl_{i-1} + gl_i}{2} (t_i - t_{i-1})$$

Ecuación 7. Área bajo la curva del perfil glucémico por segmento.

$$ABCg_{total} = \sum_{s=1}^n ABCg_s$$

Ecuación 8. Área bajo la curva total del perfil glucémico.

Donde

$ABCg_s$ es el Área Bajo la Curva del perfil glucémico del segmento s

s el segmento del perfil glucémico comprendido de t_{i-1} a t_i

gl_i la glucemia resultante al punto de muestreo t_i

gl_{i-1} la glucemia resultante al punto de muestreo t_{i-1}

t_i el tiempo de muestreo i

t_{i-1} el tiempo de muestreo previo a t_i

$ABCg_{total}$ el Área Bajo la Curva Total del perfil glucémico

$n = 9$

A partir de los valores de $ABCg$ se obtuvieron los valores que corresponden con la variable farmacodinámica: el índice de reducción del $ABCg$, como se muestra en la Ecuación 9.

$$\%rABCg = 100 \left(\frac{ABCg_{c_t} - ABCg_{T_t}}{ABCg_{c_t}} \right)$$

Ecuación 9. Índice de reducción del área bajo la curva del perfil glucémico por segmento.

Donde

$\%rABCg$ es el índice de reducción del área bajo la curva del perfil glucémico al tiempo t

$ABCg_{c_t}$ el área bajo la curva del perfil glucémico, del grupo control, al tiempo t

$ABCg_{T_t}$ el área bajo la curva del perfil glucémico, del grupo tratado, al tiempo t

El cálculo del efecto farmacodinámico de los grupos tratados (referencia y prueba) se realizó frente al grupo control normoglicémico o diabético, según correspondió. Así, los $\%rABC_{gl}$ de los grupos R-Ng y P-Ng se calcularon empleando las $ABCg$ del grupo C(-), mientras que los $\%rABC_{gl}$ de los grupos R-Di y P-Di, empleando las $ABCg$ del grupo C(+).

6.5.6 Determinación del modelo farmacocinético

Los valores de las observaciones (tanto de la variable farmacocinética —la concentración plasmática del fármaco—, como de la farmacodinámica —el índice de reducción del área bajo la curva del perfil glucémico) para cada tiempo de muestreo, de cada individuo fueron ingresadas al módulo de Estimación, empleando el modelaje de efectos mixtos no lineales, del programa de computadora Monolix, versión 2020R0, un grupo por vez. En los datos se incluyeron los pesos de los individuos como covariable. La estimación de los parámetros se realizó seleccionando los modelos farmacocinéticos de absorción de primer orden (para ambos tratamientos), con una distribución hacia 1 o 2 compartimentos y con una eliminación

de primer orden desde el compartimento central. De esta manera, cada uno de los cuatro grupos administrados con algún tratamiento, fueron evaluados empleando 2 modelos distintos (monocompartimental o bicompartimental).

Una vez realizada la estimación de los parámetros para cada modelo, se realizó el análisis de verosimilitud logarítmica. Este análisis entregó los valores de 4 diferentes parámetros para evaluar la bondad de ajuste: 1) la propia probabilidad logarítmica (-2LL), 2) el criterio de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés), 3) el criterio de información bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés) y 4), el BIC corregido (BICc). De estos, solo se consideraron el -2LL y el AIC, ya que los criterios de información bayesiana poseen menor confiabilidad cuando el número de observaciones es pequeño. De acuerdo con la definición de este análisis, el modelo cuyos valores de indicadores de verosimilitud sean los menores, fue el modelo más apropiado para estimar los parámetros del modelo y explicar a los datos reales. De esta manera, se seleccionó, para cada grupo experimental, el mejor modelo de acuerdo con el criterio anterior.

6.5.7 Determinación del modelo farmacodinámico

Establecido el modelo farmacocinético, y sus parámetros, para cada grupo, estos se establecieron como valores fijos. Fijos los parámetros farmacocinéticos, se agregó el modelo farmacodinámico de efecto máximo sigmoidal en función de un modelo de enlace farmacocinético-farmacodinámico basado en la biofase (compartimento de efecto, como se representa con la Ecuación 2). Con esto, la nueva ejecución del proceso resultó en la estimación de los parámetros del modelo farmacodinámico y del parámetro único del modelo de enlace, la constante de velocidad de redistribución del fármaco desde la biofase. Con base en el algoritmo de estimación recomendado por el proveedor del programa Monolix, la estimación final de todos los parámetros (farmacocinéticos y farmacodinámicos) se realizó retirando el carácter de fijo a los parámetros farmacocinéticos. Los nuevos valores de verosimilitud obtenidos fueron los registrados para cada modelo.

6.5.8 Comparación estadística de los tratamientos

Además del análisis compartimental descrito en las dos secciones previas, se realizó, para cada grupo que recibió un tratamiento, el análisis no compartimental, empleando el programa de computadora *PKAnálisis* versión 2020R0, en el que se determinaron los

parámetros de concentración plasmática máxima, tiempo de ocurrencia de ésta, área bajo la curva del perfil plasmático total, área bajo la curva del perfil plasmático extrapolada a infinito, el tiempo medio de residencia y la constante de primer orden asociada con la porción terminal del perfil.

Estos parámetros se evaluaron en función del tratamiento como factor experimental. Así, mediante análisis de comparación de medias, mediante el estadístico t de Student, se determinó si la diferencia entre los parámetros de los diferentes grupos fue o no significativa. Además, los valores determinados fueron contrastados con lo reportado en otros estudios similares, a fin de establecer las posibles relaciones con el tratamiento en cada caso.

6.5.9 Modelo farmacocinético/farmacodinámico (FC/FD)

Los modelos, y los parámetros de éstos, de cada grupo, establecidos tras la estimación final se registraron para calcular mediante las fórmulas provistas en el programa Monolix los perfiles de 1) concentraciones plasmáticas del fármaco, 2) índice de reducción del área bajo la curva del perfil glucémico y 3) concentraciones de glibenclamida en el compartimento hipotético de efecto. Los perfiles de cada grupo se contrastaron frente a las observaciones experimentales.

7 Resultados y discusión

7.1 Metodología analítica

7.1.1 Adecuabilidad del sistema cromatográfico

Los resultados de la media, desviación estándar y desviación estándar relativa de los valores de área bajo la curva del fármaco y del estándar interno, así como de la respuesta se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Adecuabilidad del sistema cromatográfico				
Variable	Media	DE	%DE	%DE límite
$ABCC_f (muA \cdot s)$	74111.33	619.26	0.84	2%
$ABCC_{ei} (muA \cdot s)$	70917.00	759.32	1.07	
Respuesta	1.05	0.02	1.66	

Los resultados de las tres variables evaluadas en la Tabla 10 permiten establecer como adecuado al sistema cromatográfico, ya que fue demostrado que la variación de la inyección por sextuplicado de la misma muestra en el mismo vial no fue mayor al 2%.

7.1.2 Validación del sistema analítico

7.1.2.1 Linealidad

Los resultados para los parámetros de la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación, para la función $Respuesta = f(|C|_{añ})$ se muestran en la Tabla 11, mientras que la función e intervalos de confianza para las estimaciones a partir del modelo de regresión se muestran en la Figura 11.

Tabla 11. Evaluación estadística de la linealidad de la función $Respuesta = f(C _{añ})$ para el sistema cromatográfico.					
Parámetro	Valor	I.C. (95%)	Estadístico	Valor P	Decisión
Pendiente (B1)	0.084	$0.083 < \beta_1 < 0.086$	$t=132.76$	1.901×10^{-33}	H_0 se rechaza.
Ordenada al origen (B0)	3.38×10^{-4}	$-0.008 < \beta_1 < 0.009$	$t=0.0806$	0.9364	H_0 no se rechaza.
Coeficiente de determinación (r^2)	0.9987	-	$F=17626.22$	1.901×10^{-33}	H_0 se rechaza.

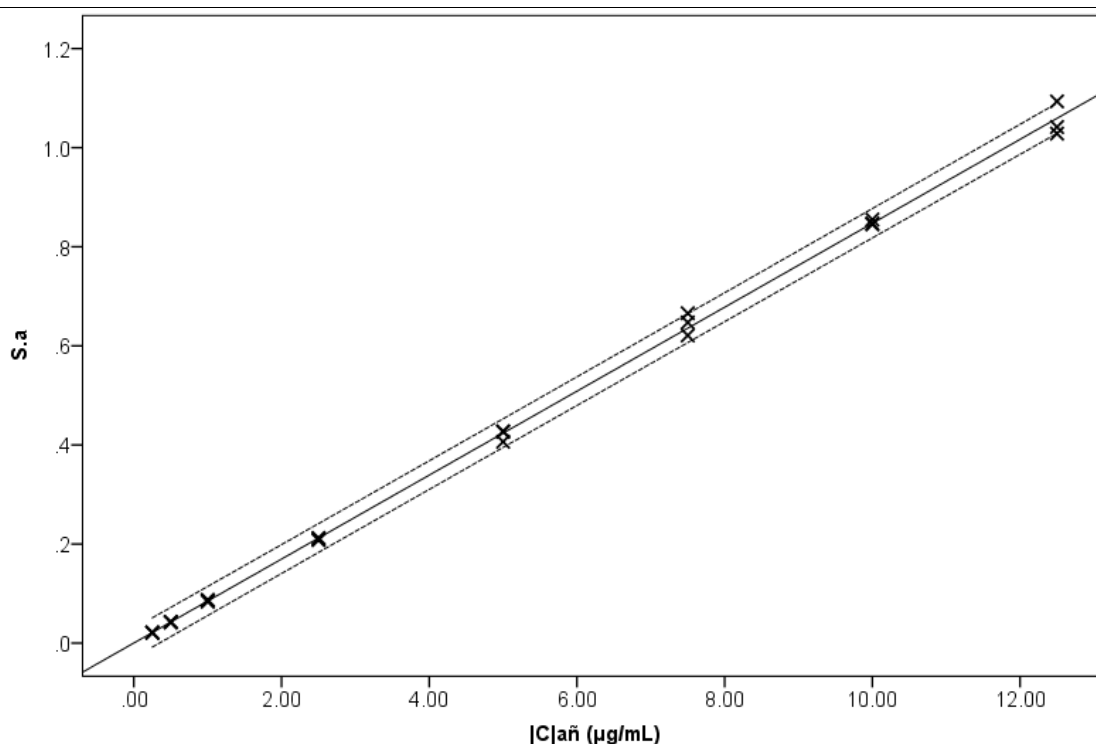


Figura 11. Evaluación de la linealidad para la relación de la respuesta analítica como función de la concentración de glibenclamida adicionada ($[C]_{añ}$). Validación del sistema analítico.

La evaluación de los parámetros de la Tabla 11 cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Esto permite establecer que la relación que el sistema analítico es adecuado para ser utilizado en las metodologías propuestas.

7.1.2.2 Precisión

Los valores de desviación estándar relativa (%DE) para las 6 determinaciones del nivel 5.0 µg/mL (100 % del método analítico para la cuantificación en medio de disolución) y las 6 determinaciones del nivel 10.0 µg/mL (100 % de los métodos analíticos para la valoración del contenido en el implante y para la cuantificación en plasma) se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Evaluación estadística de la precisión del sistema cromatográfico entre las determinaciones al 100 %.

Nivel (µg/mL)	%DE de la muestra	%DE límite	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
5	2.011	2.0	$\chi^2=5.032$	$\chi^2=11.070$	H ₀ no se rechaza.
10	1.762		$\chi^2=3.929$		H ₀ no se rechaza.

La evaluación de la varianza de las respuestas analíticas cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir que el sistema analítico es preciso entre las determinaciones realizadas en una misma corrida analítica.

7.1.3 Método para la valoración del contenido de glibenclamida en el implante

7.1.3.1 Curva de calibración del método para la valoración del contenido

Las 15 determinaciones con las cuales se construyó el modelo de regresión por mínimos cuadrados están representadas en el gráfico de la Figura 12. En esta se muestra el intervalo de confianza para las estimaciones individuales. El modelo (y su arreglo para interpolar muestras de concentración desconocida) están representados por la Ecuación 10 y los resultados de los parámetros de la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación para la *Respuesta* = $f(|C|_{añ})$, así como su evaluación estadística se muestran en la Tabla 13.

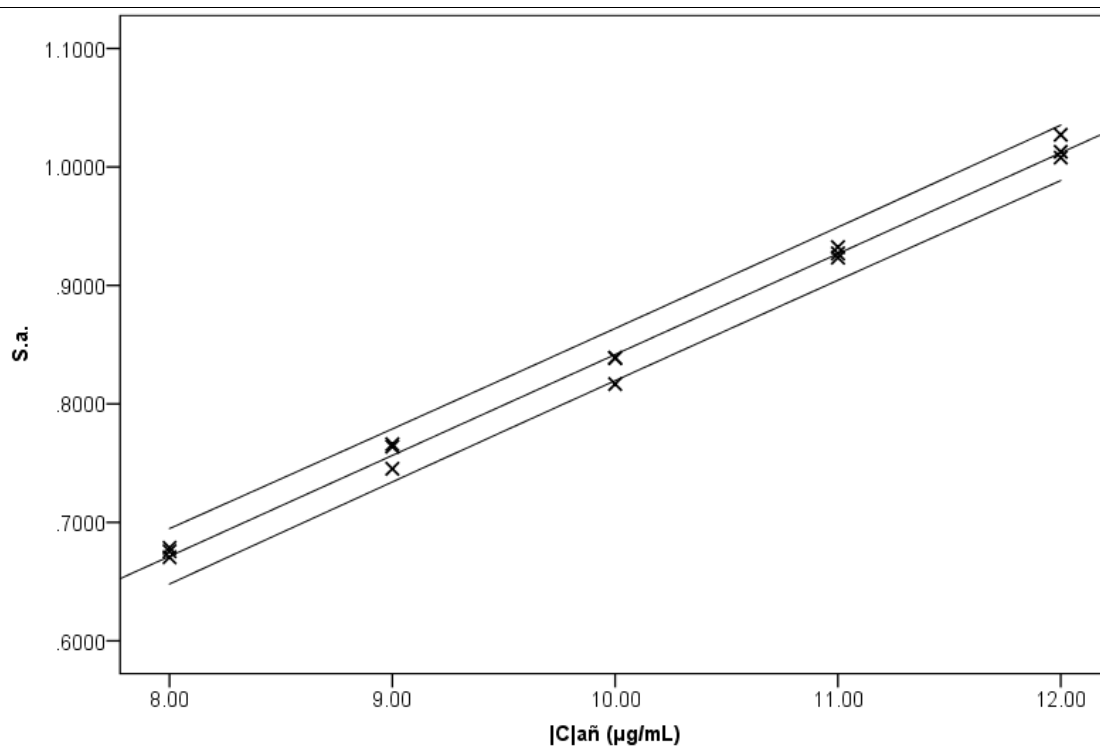


Figura 12. Curva de calibración del método analítico para la valoración del contenido.

$$S.a. = 0.0851|C|_{añ} - 0.0097$$

Ecuación 10. Relación Respuesta = $f(|C|)$. Método analítico para la valoración del contenido.

Tabla 13. Evaluación estadística de la curva de calibración y de la linealidad del método para la valoración del contenido.

Parámetro	Valor	I.C. (95%)	Estadístico	Valor P	Decisión
Pendiente (B1)	0.085	$0.081 < \beta_1 < 0.089$	$t=47.20$	6.32×10^{-16}	H_0 se rechaza.
Ordenada al origen (B0)	-0.009	$-0.049 < \beta_0 < 0.029$	$t=-0.532$	0.603	H_0 no se rechaza.
Coefficiente de determinación (r^2)	0.994	-	$F=2228.08$	6.32×10^{-16}	H_0 se rechaza.

La evaluación de los parámetros de la Tabla 13 cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Con base en esto, la Ecuación 10 se consideró adecuada para estimar el valor de muestras de concentración desconocida y dentro del intervalo establecido.

7.1.3.2 Validación del método para la valoración del contenido

- **Especificidad**

Como se muestra en la Figura 13, no existen señales debidas a los componentes de las muestras que no contienen fármaco (cero, doble cero y placebo).

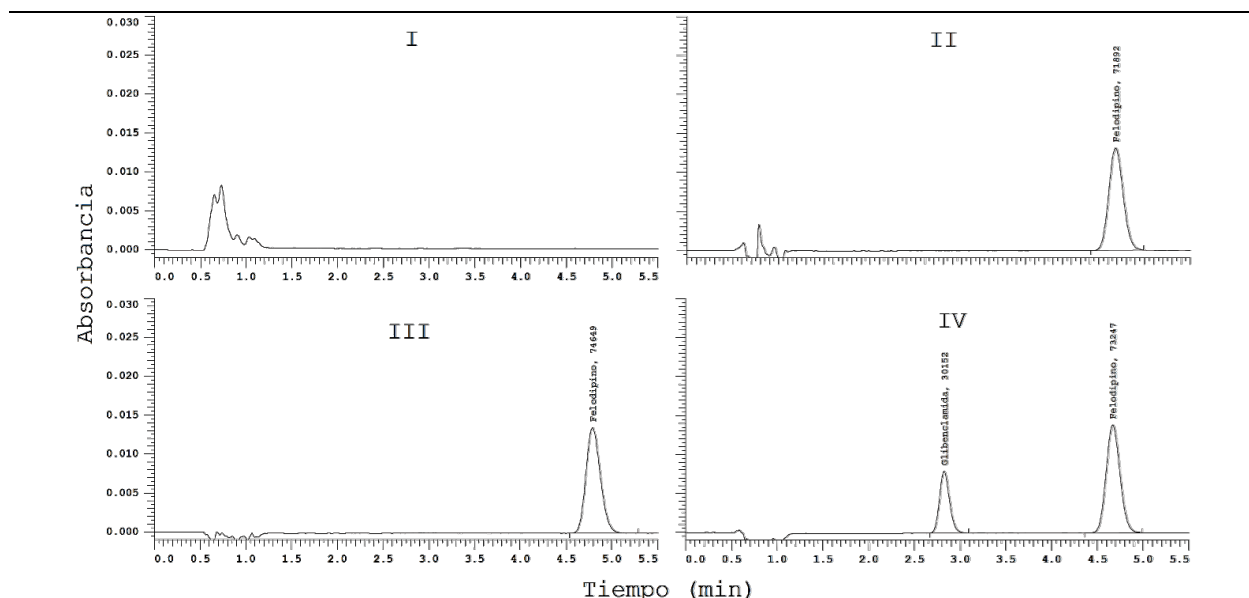


Figura 13. Determinación por observación de la especificidad para el método analítico para la cuantificación del contenido.

Del cromatograma I al IV se muestran: muestra doble cero, cero, placebo y placebo adicionado con la sustancia de referencia, respectivamente.

La Tabla 14 muestra los valores de la media de las respuestas analíticas de la sustancia de referencia y de ésta más la adición del placebo, así como de su comparación estadística.

Tabla 14. Determinación estadística de la especificidad para el método analítico para la valoración del contenido.

Muestra	Media (Respuesta)	Varianza (Respuesta)	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
S. ref.	0.852	2.26×10^{-4}	t=1.403	t=±2.228	H ₀ no se rechaza.
S. ref + placebo	0.842	1.37×10^{-4}			

La evaluación de la diferencia entre medias (de respuestas analíticas) cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, el contenido de la matriz analítica no interfiere de manera significativa en las determinaciones analíticas, por lo que este método analítico

es específico.

- **Linealidad**

Este método analítico es lineal, de acuerdo con lo determinado en la Tabla 13.

- **Repetibilidad**

Los valores de la desviación estándar relativa de la respuesta, para cada nivel de concentración del método para la valoración del contenido (bajo, medio y alto), así como la evaluación estadística frente al parámetro $\sigma \leq 0.02 \bar{y}$, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Determinación estadística de la repetibilidad para el método analítico para la valoración del contenido.

Nivel (µg/mL)	%DE de la muestra	%DE límite	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
8	1.692	2.0	$\chi^2=3.694$	$\chi^2=11.070$	H_0 no se rechaza.
10	1.352		$\chi^2=2.244$		H_0 no se rechaza.
12	1.482		$\chi^2=2.795$		H_0 no se rechaza.

La evaluación de la varianza de la respuesta analítica cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir que existe precisión entre las determinaciones realizadas en una misma corrida analítica, bajo las condiciones establecidas para la operación de este método analítico.

- **Precisión intermedia**

El análisis de la varianza para los factores día y analista se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Determinación estadística de la precisión intermedia entre analistas y días para el método analítico para la valoración del contenido.

Factor	Estadístico calculado	Intervalo de no rechazo del estadístico	Decisión
Analista	F=2.9652	0.152 < F < 6.553	H_0 no se rechaza.
Día	F=3.7390		H_0 no se rechaza.
Interacción	F=2.9052		H_0 no se rechaza.

El análisis de la varianza cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, existe precisión intermedia entre los factores analista y día.

- **Exactitud**

El valor de la desviación estándar relativa (%DE), para el porcentaje de recobro de la concentración estimada por el modelo en función de la concentración adicionada, así como la comparación estadística frente al parámetro $\mu=100\%$, se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Determinación estadística de la exactitud para el método analítico para la valoración del contenido.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	Media del %Recobro	%Recobro teórico	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
8	101.54	100.0	$t=2.219$	$t=\pm 2.570$	H_0 no se rechaza.
10	99.06		$t=-1.737$		H_0 no se rechaza.
12	100.88		$t=1.471$		H_0 no se rechaza.

La evaluación de la media del porcentaje de recobro cumple con el criterio establecido en el *Anexo 1*. Por lo que este método analítico es exacto en el intervalo estudiado. Además, la exactitud fue inferida por la interpretación del parámetro β_0 en la determinación de la linealidad en conjunto con la determinación de la repetibilidad de este mismo método.

7.1.4 Método analítico para la cuantificación de glibenclamida en el medio de disolución

7.1.4.1 Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución

Las 15 determinaciones con las cuales se construyó el modelo de regresión por mínimos cuadrados están representadas en la Figura 14. En esta se muestra el intervalo de confianza para las estimaciones individuales. El modelo está representado por la Ecuación 11 y los resultados de los parámetros de la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación para la función $\text{Respuesta} = f(|C|_{\text{añ}})$, así como su evaluación estadística se muestran en la Tabla 18.

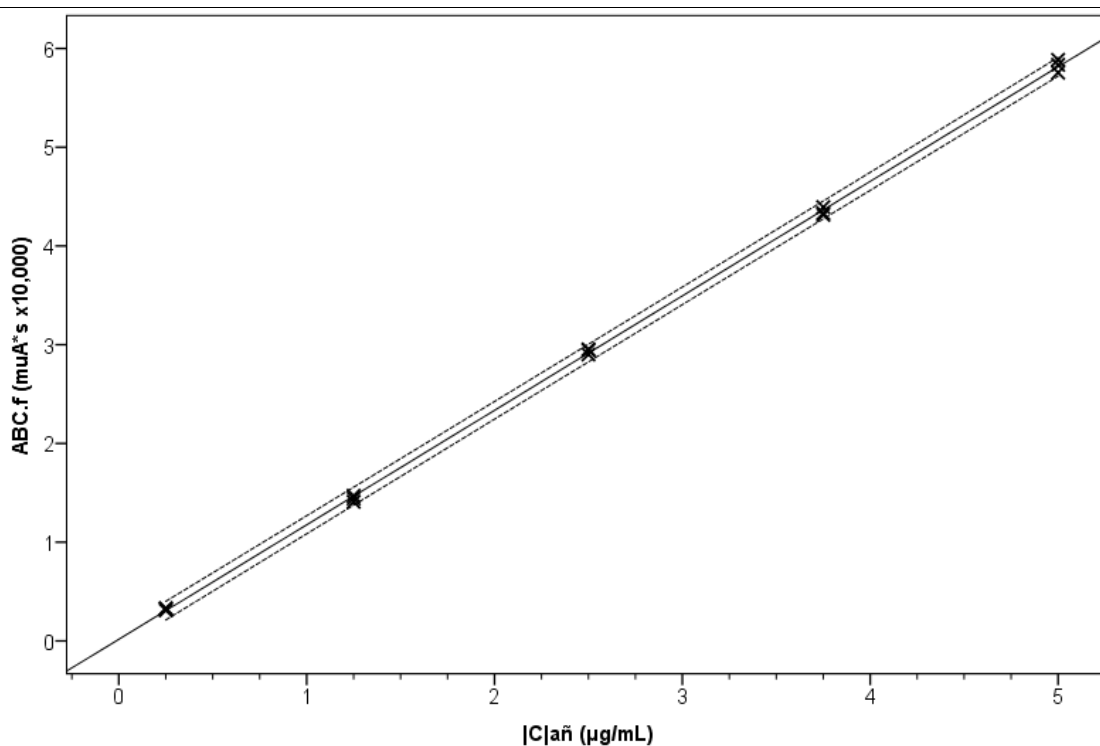


Figura 14. Curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

$$Respuesta = 11625.23 \frac{\mu A \cdot s \cdot mL}{\mu g} |C|_{añ} \left(\frac{\mu g}{mL} \right) + 168.35 \mu A \cdot s$$

Ecuación 11. Relación Respuesta = f(|C|). Método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Donde la Respuesta es el área bajo la curva del pico cromatográfico de la glibenclamida .

Tabla 18. Evaluación estadística del modelo de regresión lineal de la curva de calibración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Parámetro	Valor	I.C. (95%)	Estadístico	Valor P	Decisión
Pendiente (B1)	11625.23	11526.58< β_1 <11723.88	t=244.39	2.84x10 ⁻³⁹	H ₀ se rechaza.
Ordenada al origen (B0)	168.35	-140.182< β_0 <476.87	t=1.13	0.2700	H ₀ no se rechaza.
Coefficiente de determinación (r ²)	0.9996	-	F=36417.83	2.84x10 ⁻³⁹	H ₀ se rechaza.

La evaluación de los parámetros de la Tabla 18 cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Con base en estos resultados, la Ecuación 11 fue establecida como adecuada para estimar el valor de muestras de concentración desconocida y dentro del intervalo establecido.

7.1.4.2 Validación método analítico para la cuantificación en el medio de disolución

- **Especificidad**

Como se muestra en la Figura 15, no existen señales debidas a los componentes de las muestras que no contienen fármaco (cero y placebo).

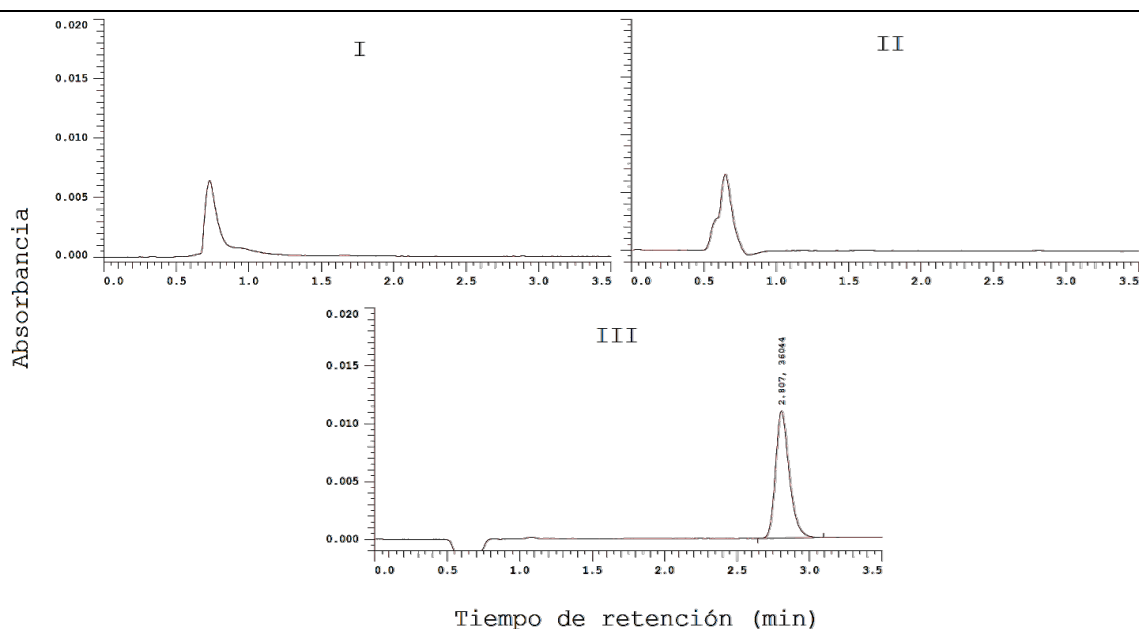


Figura 15. Determinación por observación de la especificidad para el método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Del cromatograma I al III se muestran: muestra cero, placebo y placebo adicionado con la sustancia de referencia, respectivamente.

La Tabla 19 muestra los valores de la media de las respuestas analíticas de la sustancia de referencia y de la solución adicionada con el placebo, así como de su comparación estadística.

Tabla 19. Determinación estadística de la especificidad para el método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Muestra	Media (Respuesta)	Varianza (Respuesta)	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
S. ref.	57880.67	9.60 x10 ⁴	t=2.0645	t=±2.2281	H ₀ no se rechaza.
S. ref. + placebo	58369.17	2.40 x10 ⁵			

La evaluación de la diferencia entre medias (de respuestas analíticas) cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, los componentes del medio de disolución no interfieren de manera significativa en las determinaciones analíticas, por lo que este método analítico es específico.

- **Límite de detección y de cuantificación**

En la Tabla 20 se muestran los valores de las relaciones señal/ruido determinadas para cada nivel de concentración preparado.

Tabla 20. Determinación matemática de los límites de detección y de cuantificación del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

C (µg/mL)	Relación señal/ruido
0.01	2.01:1
0.05	3.98:1
0.25	17.84:1

El límite de detección de este método analítico es, al menos, 0.01 µg/mL, mientras que el límite de cuantificación es, al menos, 0.05 µg/mL. Ambos valores se encuentran por debajo del primer valor evaluado en la curva de calibración (0.25 µg/mL), por lo que este método es apto para la estimación de muestras de concentración desconocida, iguales o superiores al 5 % de la dosis disuelta y necesarias para la construcción adecuada del perfil de disolución del implante subcutáneo.

- **Linealidad**

Este método analítico es lineal, de acuerdo con lo determinado en la Tabla 18.

- **Repetibilidad**

Los valores de la desviación estándar relativa de la respuesta, para cada nivel de

concentración del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución (bajo, medio y alto), así como la evaluación estadística frente al parámetro $\sigma \leq 0.03 \bar{y}$, se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Determinación estadística de la repetibilidad del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	%DE de la muestra	%DE límite	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
0.25	0.4762	3.0	$\chi^2=0.1263$	$\chi^2=11.0705$	H_0 no se rechaza.
2.50	1.3418		$\chi^2=1.0252$		H_0 no se rechaza.
5.00	0.9422		$\chi^2=0.4959$		H_0 no se rechaza.

La evaluación de la varianza de la respuesta analítica cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir que existe precisión entre las determinaciones realizadas en una misma corrida analítica, bajo las condiciones establecidas para la operación de este método analítico.

- **Precisión intermedia**

El análisis de la varianza para los factores día y analista se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Determinación estadística de la precisión intermedia entre analistas y días del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Factor	Estadístico calculado	Intervalo de no rechazo del estadístico	Decisión
Analista	F=0.959	0.138 < F < 7.209	H_0 no se rechaza.
Día	F=0.260		H_0 no se rechaza.
Interacción	F=0.677		H_0 no se rechaza.

El análisis de la varianza cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, existe precisión intermedia entre los factores analista y día.

- **Exactitud**

El valor de la desviación estándar relativa (%DE), para el porcentaje de recobro de la concentración estimada por el modelo en función de la concentración adicionada, así como la comparación estadística frente al parámetro $\mu=100\%$, se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Determinación estadística de la exactitud del método analítico para la cuantificación en el medio de disolución.

Nivel (µg/mL)	Media del %Recobro	%Recobro teórico	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
0.25	101.54	100.0	t= 1.694	t=±2.5706	H ₀ no se rechaza.
2.50	99.06		t=2.234		H ₀ no se rechaza.
5.00	100.88		t=0.702		H ₀ no se rechaza.

La evaluación de la media del porcentaje de recobro cumple con el criterio establecido en el *Anexo 1*. Por lo que este método analítico es exacto en el intervalo estudiado. Además, la exactitud de este método fue inferida por la interpretación del parámetro β_0 en la determinación de la linealidad en conjunto con la determinación de la repetibilidad este mismo método.

7.1.5 Método para la cuantificación de glibenclamida en plasma

7.1.5.1 Curvas de calibración del método analítico para la cuantificación en plasma

Cada día de análisis de muestras plasmáticas se construyó una curva de calibración con 18 determinaciones. La primera de ellas se muestra en la Figura 16. En esta se muestra el intervalo de confianza para las estimaciones individuales. El modelo de esta curva está representado por la Ecuación 12 y los resultados de los parámetros de la pendiente, ordenada al origen, coeficiente de determinación para la función $Respuesta = f(|C|_{a\tilde{n}})$, así como su evaluación estadística se muestran en la Tabla 24.

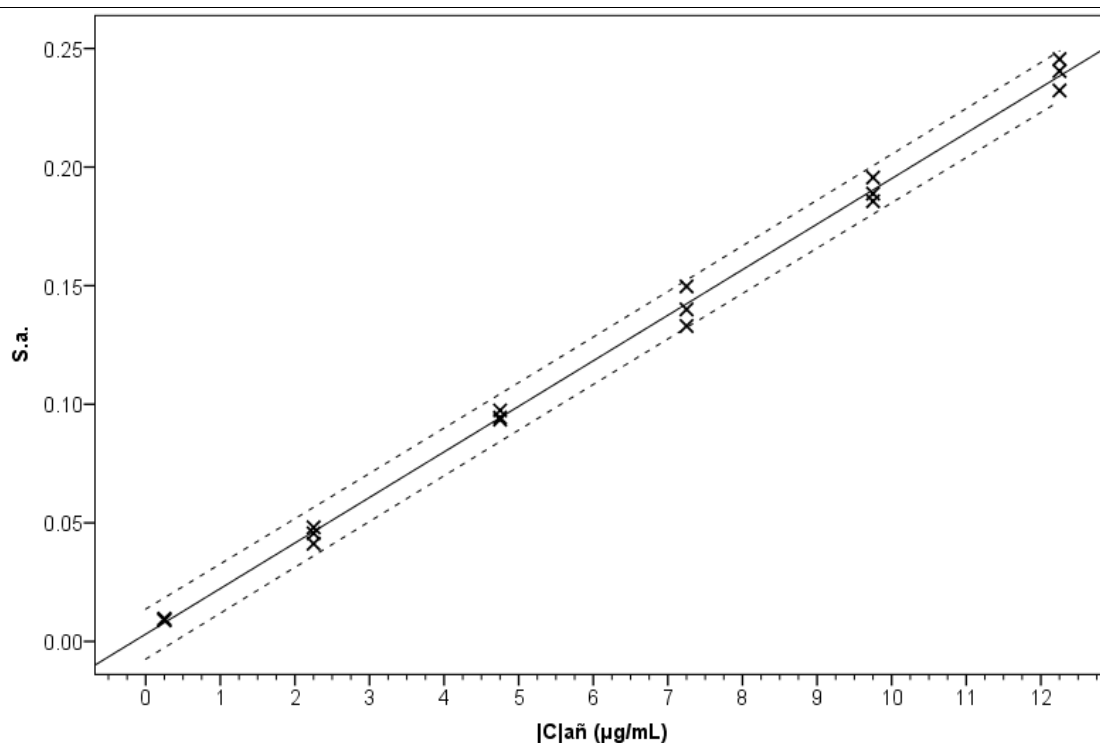


Figura 16. Curva de calibración 1 del método analítico para la cuantificación en plasma.

$$S.a. = 0.0192 |C|_{añ} - 0.0017$$

Ecuación 12. Relación Respuesta = $f(|C|)$. Método analítico para la cuantificación en plasma.

Tabla 24. Evaluación estadística del modelo de regresión lineal de la curva de calibración 1 del método analítico para la cuantificación en plasma.

Parámetro	Valor	I.C. (95%)	Estadístico	Valor P	Decisión
Pendiente (B1)	0.019	$0.018 < \beta_1 < 0.019$	$t=73.65$	1.10×10^{-21}	H_0 se rechaza.
Ordenada al origen (B0)	-0.001	$-0.0059 < \beta_0 < 0.002$	$t=-0.857$	0.403	H_0 no se rechaza.
Coefficiente de determinación (r^2)	0.997	-	$F=5425.40$	1.10×10^{-21}	H_0 se rechaza.

La evaluación de los parámetros de la Tabla 24 cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*.

7.1.5.2 Validación del método analítico para la cuantificación en plasma

- **Especificidad**

El análisis por observación del tiempo de retención de la glibenclamida en los cromatogramas de las muestras analizadas, (Figura 17), permite establecer que no existen señales debidas a los componentes de las muestras que no contienen fármaco (cero, doble cero y placebo).

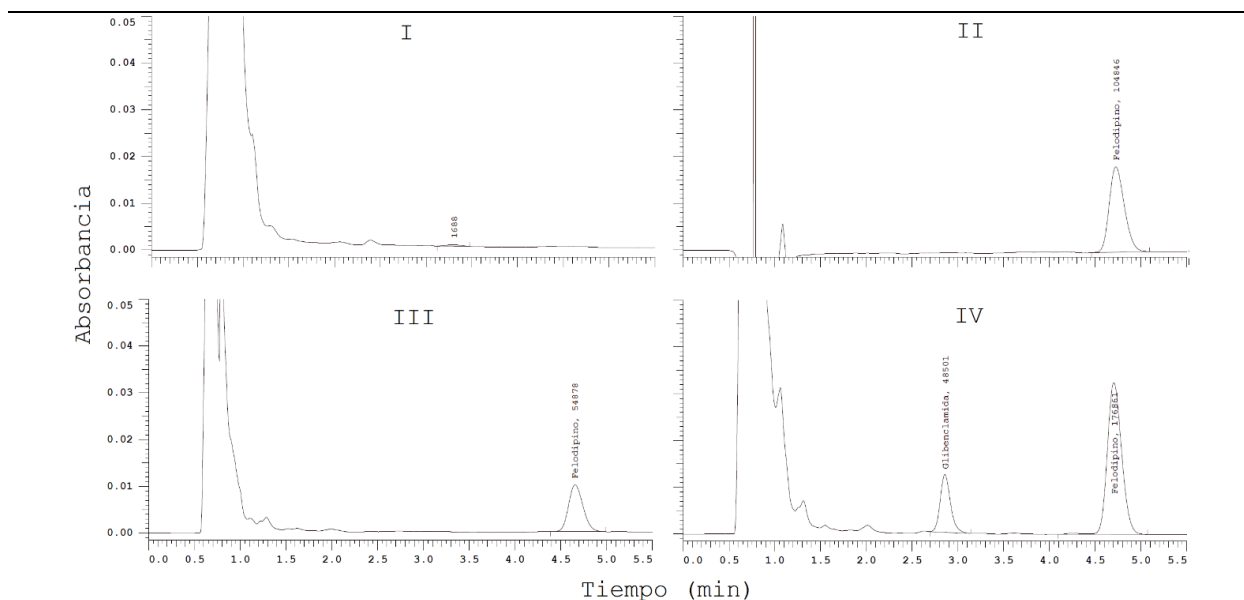


Figura 17. Determinación por observación de la especificidad para el método analítico para la cuantificación en plasma.

Del cromatograma I al IV se muestran: muestra doble cero, cero, plasma libre de fármaco y plasma adicionado con la sustancia de referencia, respectivamente.

Los valores de la media de las respuestas analíticas de la sustancia de referencia y de a solución adicionada con el placebo (muestra obtenida del grupo C(-)), así como de su comparación estadística, se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Determinación estadística de la especificidad del método analítico para la cuantificación en plasma.

Muestra	Media (Respuesta)	Varianza (Respuesta)	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
S. ref.	0.198	3.04×10^{-4}	$t=-1.290$	$t=\pm 2.228$	H_0 no se rechaza.
S. ref. + placebo	0.187	1.14×10^{-4}			

La evaluación de la diferencia entre medias (de respuestas analíticas) cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, los componentes del plasma de un individuo administrado con el tratamiento de prueba placebo no interfiere de manera significativa en las determinaciones analíticas.

- **Límite de detección y de cuantificación**

En la Tabla 26 se muestran los valores de las relaciones señal/ruido determinadas para cada nivel de concentración preparado.

Tabla 26. Determinación matemática de los límites de detección y de cuantificación del método analítico para la cuantificación en plasma.

C (µg/mL)	Relación señal/ruido
0.05	2.25:1
0.10	4.98:1
0.50	11.71:1

El límite de detección de este método analítico es, al menos, 0.05 µg/mL., mientras que el límite de cuantificación es, al menos, 0.1 µg/mL. Ambos valores se encuentran por debajo del primer valor evaluado en la curva de calibración (0.5 µg/mL), por lo que este método analítico es apto para la estimación de muestras de concentración desconocida, superiores al 5 % de la Cp_{max} y necesarias para la construcción adecuada del perfil de plasmático del fármaco tras la administración de los diferentes tratamientos establecidos en el estudio farmacocinético-farmacodinámico.

- **Linealidad**

Este método analítico es lineal, de acuerdo con lo determinado en la Tabla 24.

- **Repetibilidad**

Los valores de la desviación estándar relativa de la respuesta, para cada nivel de concentración del método analítico para la cuantificación en plasma (bajo, medio y alto), así como la evaluación estadística frente al parámetro $\sigma \leq 0.15 \bar{y}$, se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Determinación estadística de la repetibilidad para el método del método analítico para la cuantificación en plasma.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	%DE de la muestra	%DE límite	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
0.5	10.218	15.0	$\chi^2=2.738$	$\chi^2=11.0705$	H_0 no se rechaza.
5.0	6.418		$\chi^2=0.924$		H_0 no se rechaza.
12.5	8.235		$\chi^2=1.510$		H_0 no se rechaza.

La evaluación de la varianza de la respuesta analítica cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir que existe precisión entre las determinaciones realizadas en una misma corrida analítica, bajo las condiciones establecidas para la operación de este método analítico.

- **Precisión intermedia**

El análisis de la varianza para los factores día y analista, se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Determinación estadística de la precisión intermedia entre analistas y días del método analítico para la cuantificación en plasma.

Factor	Estadístico calculado	Intervalo de no rechazo del estadístico	Decisión
Analista	F=3.801	0.1525 < F < 6.553	H_0 no se rechaza.
Día	F=0.828		H_0 no se rechaza.
Interacción	F=0.191		H_0 no se rechaza.

El análisis de la varianza cumple con los criterios establecidos en el *Anexo 1*. Es decir, existe precisión intermedia entre los factores analista y día.

- **Exactitud**

El valor de la desviación estándar relativa (%DE), para el porcentaje de recobro de la concentración estimada por el modelo en función de la concentración adicionada, así como

la comparación estadística frente al parámetro $\mu=100\%$, se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Determinación estadística de la exactitud del método analítico para la cuantificación en plasma.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	Media del %Recobro	%Recobro teórico	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
0.5	107.11	100.0	$t=1.904$	$t=\pm 2.570$	H_0 no se rechaza.
5	100.49		$t=0.188$		H_0 no se rechaza.
12.5	100.11		$t=0.034$		H_0 no se rechaza.

La evaluación de la media del porcentaje de recobro cumple con el criterio establecido en el *Anexo 1*. Además, se evaluó que la desviación estándar relativa del porcentaje de recobro estuviese dentro del intervalo $\pm 15\%$. Los resultados se muestran en la misma Tabla 30.

Tabla 30. Determinación estadística de la exactitud para del método analítico para la cuantificación en plasma. Desviación del porcentaje del recobro.

Nivel ($\mu\text{g/mL}$)	Media de las desviaciones del %Recobro	Desviación máxima del %Recobro	Estadístico calculado	Estadístico límite	Decisión
0.5	9.78	$\pm 15\%$	$t=-2.3546$	$t=-2.0150$	H_0 se rechaza.
5	4.46		$t=-6.3441$		H_0 se rechaza.
12.5	3.99		$t=-11.2247$		H_0 se rechaza.

La evaluación de la media de las desviaciones (del porcentaje de recobro) cumple con el criterio establecido en el *Anexo 1*. Además de las dos interpretaciones anteriores, la exactitud fue inferida por la interpretación del parámetro β_0 en la determinación de la linealidad en conjunto con la determinación de la repetibilidad de este método analítico.

Con estos resultados y análisis estadístico se confirma la validez de las metodologías desarrolladas para cuantificar al fármaco en las diferentes matrices analíticas, de acuerdo con lo establecido con la guía ICH Q2 y con la normatividad mexicana aplicable^{90,95}.

7.2 Evaluación farmacotécnica del implante subcutáneo de glibenclamida

Los monolitos íntegros resultantes, de acuerdo con la dosis (7.5 mg/kg) y el contenido de glibenclamida se fraccionaron en unidades para ser administrados como implantes subcutáneos. El lote fabricado redituó en 35 unidades íntegras. Los resultados de los

análisis a continuación presentados corresponden con la media y su desviación estándar en cada caso.

7.2.1 Variación de peso

En la Tabla 31 se muestran los resultados del peso y su variación entre las unidades resultantes.

Tabla 31. Variación de peso de los monolitos fabricados.		
Media (mg)	DE (mg)	DER (%)
187.55	4.0058	2.14
n=35		

Esta variación en el peso demuestra el adecuado control en el proceso de fabricación del lote.

7.2.2 Dureza

En la Tabla 32 se muestran los resultados de dureza de los monolitos fabricados.

Tabla 32. Dureza de los monolitos fabricados.		
Media (kP)	DE (kP)	DER (%)
2.4	0.21	8.94
n=6		

La dureza y su relación con la fragilidad estructural (tendencia a la ruptura) están directamente afectados por la estructura porosa de tipo radial que presentan los monolitos (por ser xerogeles)⁶⁶. La baja variabilidad entre muestras es un indicio de la estructura uniforme, nuevamente dados los controles del proceso establecidos. Los resultados de dureza son consistentes con los obtenidos previamente llevando a cabo este método de fabricación⁹⁶.

Estas características de integridad les permiten su implantación en tejidos blandos, como lo es el espacio subcutáneo de regiones no articuladas⁹⁷, ya que el incremento en la dureza indica una menor incidencia del desgaste del implante, como es el caso de la nuca en los modelos murinos y el antebrazo en humanos^{98–100}. La dureza es un parámetro importante, ya que xerogeles con una dureza menor a los 2.0 kP son suaves, propensos a quebrarse y difíciles por lo tanto de manipularse⁹⁶.

7.2.3 Valoración del contenido

Los datos de este análisis, ajustados al contenido de glibenclamida por unidad de masa del monolito se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Valoración del contenido de glibenclamida en los monolitos fabricados.		
Media (mg/g)	DE (mg/g)	DER (%)
22.43	2.51	11.20
n=6		

Antes de realizar el ajuste con el peso de cada muestra analizada, la desviación fue ligeramente mayor (11.56 %) y, a diferencia de los resultados de variación de peso, la homogeneidad del contenido de glibenclamida resulta más variable que el peso por unidad, principalmente debido a que, si bien dentro del proceso existen controles para asegurar la reproducibilidad de cada unidad obtenida, tanto en su peso como en su contenido, estos se ven sobrepasados por la dispersión particular del fármaco en el sol, antes de ser sometido a la reacción de condensación.

El límite de solubilidad del fármaco en etanol (disolvente principal presente en el sol) y el requerimiento de incrementar la carga de glibenclamida en la fabricación son los factores que obligan a mantener en la sobresaturación al fármaco. Esta dispersión es la que promueve los mayores problemas en cuanto a la homogeneidad mencionada.

Dado que cada monolito presentó un peso de 187.55 ± 4.01 mg y el contenido fue de 22.43 ± 2.51 mg de glibenclamida por gramo de monolito, cada unidad (monolito íntegro) contuvo entonces una media de 4.20 ± 0.55 mg. Este valor es equivalente a 0.33 partes del contenido teórico (12.5 mg teóricos de glibenclamida por monolito), de acuerdo con la cantidad de glibenclamida adicionado en la fabricación. El bajo rendimiento de la incorporación del fármaco en el implante es proporcional con la cantidad de éste adicionada en la obtención del sol. Es decir, a menor cantidad de glibenclamida adicionado, menor es el grado de incorporación al monolito. Los experimentos preliminares para la optimización del proceso de fabricación de los monolitos (implantes) indican que esta es la carga máxima de glibenclamida (glibenclamida) que es posible incorporar en la estructura del monolito, dadas las condiciones establecidas para su fabricación. Esta capacidad máxima está directamente relacionada con a), las propiedades químicas de la superficie en la cual se adsorbe el fármaco, la cuál es de tipo hidrofílica y dominan las interacciones electrostáticas, por

ejemplo, el enlace de hidrógeno se ve favorecido y b), las propiedades geométricas: el volumen, diámetro y volumen del poro, así como la extensión de la superficie en la que el fármaco es susceptible de permanecer unido a la estructura del monolito⁶⁶.

A fin de evaluar el impacto de este sub-rendimiento de la incorporación del fármaco en la estructura de los monolitos, se evaluó la uniformidad de dosis de acuerdo con la prueba farmacopéica como se discute a continuación.

7.2.4 Uniformidad de dosis

Para el cálculo se tomó el valor obtenido de la media en la valoración como el valor de teórico (o nominal). Tomando esta consideración, la uniformidad de dosis cumple con un valor de aceptación del 23.2, según se describe en la Tabla 34.

Tabla 34. Uniformidad de dosis de los monolitos fabricados.						
Media (mg/g)	DE (mg/g)	Contenido 100% (mg/g)	(teórico, Valor de aceptación	(VA)	Criterio	
22.67	2.19	22.43		23.2		VA≤25
n=30						

Para los valores individuales, se muestra la Figura 18.

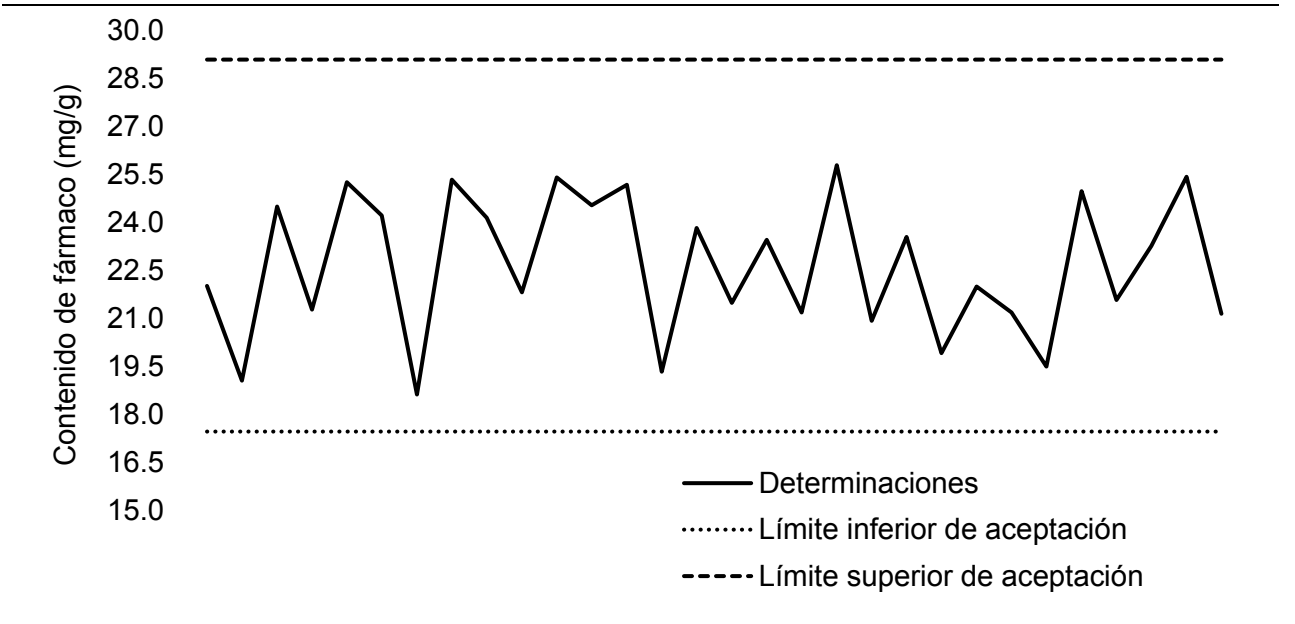


Figura 18. Uniformidad de dosis de los monolitos fabricados.
n=23

La determinación de la uniformidad de la dosis en cada monolito fabricado denota que, a

pesar del sub-rendimiento de la incorporación del fármaco en estos, el proceso de fabricación del lote se encuentra controlado y existe reproducibilidad entre los monolitos fabricados en cuanto a su peso y contenido de glibenclamida. Además, la modificación de la técnica permitió integrar mayor cantidad de glibenclamida y en mejor control que la técnica originalmente planteada⁹⁶.

La mayor parte de la variabilidad se debe a la heterogeneidad de la mezcla que contiene al fármaco (el sol) previo a ser condensado en el gel. Dado que la técnica con la cual se fabricaron los monolitos contempla la adición del fármaco (875 mg) suspendido en 40 mL de etanol (volumen suficiente para disolver 20 mg) a 100 mL de sol recién generado. Para obtener los 100 mL de sol fueron empleados 50 mL de etanol que pudieron disolver a 25 mg de glibenclamida. Lo anterior supone que, de los 875 mg adicionados, solo 45 mg (el 5.14 %) están solubilizados en etanol, mientras que el fármaco efectivamente disuelto en la totalidad del sistema es desconocido y se asume que la mayor parte del fármaco se encuentra suspendida en la mezcla, como de hecho se observó al momento de realizar la esta. Esta suspensión del fármaco es la razón por la cual la mezcla permaneció en agitación constante bajo baño de ultrasonido hasta el momento de ser mezclado con la solución condensante, la que finalmente generó el gel e inmovilizó al fármaco, tanto disuelto como suspendido, en su estructura de poros. La incorporación de una media de 4.20 ± 0.55 mg por cada monolito, frente a los 12.5 teóricos que debió contener cada uno, es reflejo de la capacidad de la estructura en tanto a la geometría y a la química de superficie de los monolitos obtenidos¹⁰¹.

7.2.5 Perfil de disolución

De acuerdo con los resultados de valoración y variación de peso, las secciones a analizadas pesaron $100 \text{ mg} \pm 10 \text{ mg}$. En la Figura 19 se muestra el perfil de la media y dispersión de la disolución de las 6 unidades de dosis evaluadas.

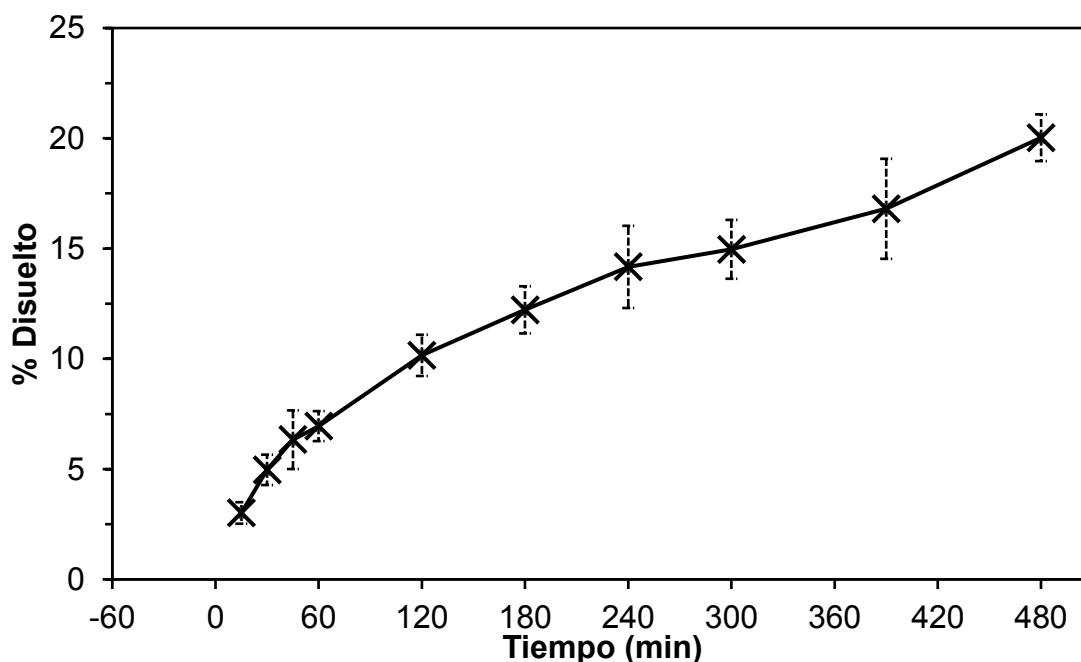


Figura 19. Perfil de disolución de glibenclamida a partir de los implantes subcutáneos.

Se muestra la media $\pm$ desviación de cada punto de muestreo $n=6$.

El hecho de que la prueba no consiga liberar más del 25 % de la cantidad contenida, es un indicador de que, efectivamente la liberación se lleva de manera lenta, en contraposición con el perfil de disolución de medicamentos de liberación inmediata que contienen glibenclamida^{38,96}. Por otro lado, la observación de la rápida liberación y disolución al inicio de la prueba (alcanzando en 15 minutos el 3 % y a los 45 minutos el 6 % de la cantidad disuelta) es un indicio de la presencia de glibenclamida en la superficie externa del implante subcutáneo. En consecuencia, el aparente cambio de la cinética de liberación en el intervalo 45-60 min sugieren la participación de los dos fenómenos (incluso de su participación simultánea). El primero es la rápida y brusca liberación de glibenclamida en la superficie de la estructura mesoporosa que no necesariamente se encuentra adsorbido en la superficie de esta y el segundo fenómeno probablemente se deba a la distribución en el tamaño (diámetro y longitud) de la red de poros dentro de toda la estructura. Es decir que existen poros que son mucho más accesibles a la entrada de medio de disolución que otros y que de esta manera promueven un incremento en la velocidad de disolución en diferentes momentos de la prueba. Ambos fenómenos pueden explicar el comportamiento general que demuestra la liberación del fármaco tras la prueba de disolución^{66,70,77,96,102-104}. A pesar de lo anterior, el perfil demuestra una liberación sostenida a través del tiempo por lo que se

evaluó el ajuste a diferentes modelos de disolución. La Tabla 35 muestra los resultados obtenidos. En ella se puede observar que el modelo de Korsmeyer-Peppas es el más adecuado para describir la velocidad de la disolución. La Ecuación 13 muestra y el perfil estimado se presenta en la Figura 20. En la Tabla 36 se muestran los percentiles de disolución estimados a los tiempos de disolución relevantes.

Tabla 35. Modelos para la descripción del proceso de liberación y disolución de glibenclamida de los implantes subcutáneos.

Modelo	Coefficiente de determinación
Cinética de orden cero	0.6011
Cinética de primer orden	0.6630
Higuchi	0.9688
Hixson-Crowell	0.6432
Korsmeyer-Peppas	0.9709
Korsmeyer-Peppas + %D ₀	0.9710

$$\%D = \left[(0.961 \pm 0.258) \frac{\%D}{min} \right] t (min)^{0.492 \pm (0.052)}$$

Ecuación 13. Modelo de la cinética de disolución de glibenclamida a partir del implante subcutáneo.

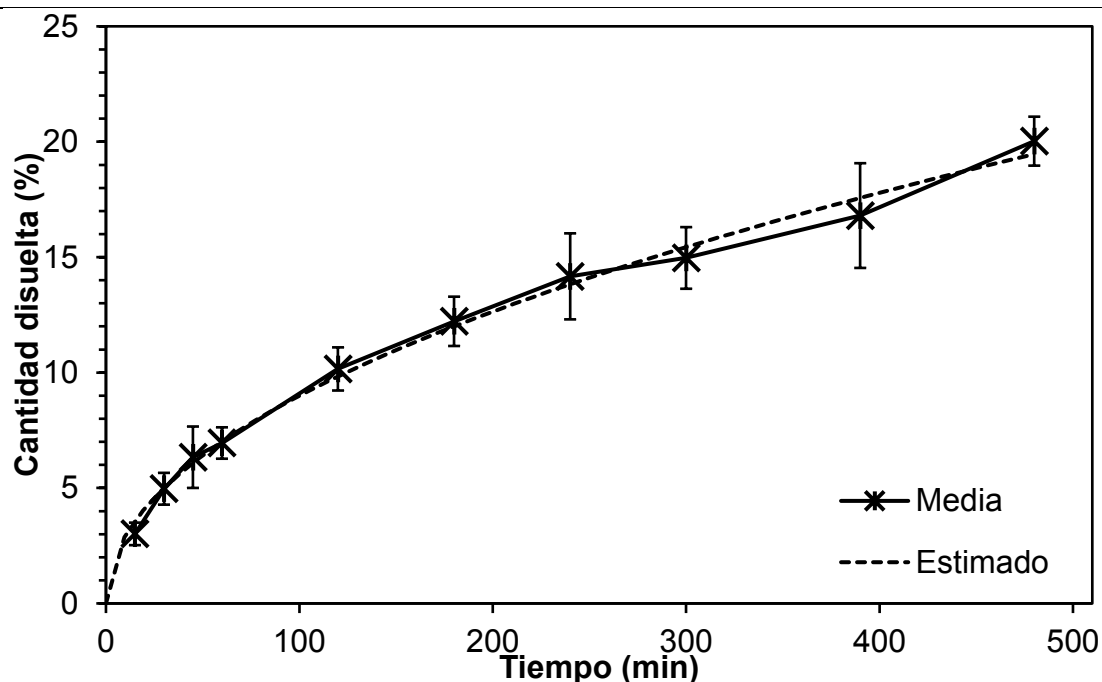


Figura 20. Contraste del modelo estimado con el perfil de disolución de glibenclamida de los implantes subcutáneos.

Para las observaciones se muestran la media $\pm$ desviación estándar $n=6$.

Tabla 36. Parámetros del perfil de disolución.

Parámetros	Valor	DE	%DE
Modelo-dependientes			
K	0.961	0.258	26.83
N	0.492	0.052	10.65
t25 (h)	13.74	2.71	19.69
t50 (h)	57.91	15.79	27.25
t75 (h)	135.11	43.18	31.95
t90 (h)	197.98	67.41	34.04
Modelo-independientes			
TMR (min)	232.77	0.91	0.39
TMD (min)	169.75	28.24	16.64

K es la constante de liberación de Korsmeyer-Peppas (incorpora las características estructurales y geométricas de la forma farmacéutica), n es el exponente difusional del mecanismo de liberación, TMR es el tiempo medio de residencia y TMD es el tiempo medio de disolución.

El perfil de disolución demuestra ser, de acuerdo a las características de la matriz polimérica

(de tipo vítrea) y con el valor del exponente de la función n , de tipo no fickiano (transporte anómalo)^{66,103,104} y coincidente con la geometría de los implantes, que es del tipo cilíndrico. Lo anterior permite establecer que la velocidad de difusión del medio de disolución hacia la red matricial de poros y la velocidad de relajación del polímero son de magnitud similar. Este último componente está correlacionado con la red matricial de poros y las interacciones electrostáticas que mantienen al fármaco adsorbido a la superficie de esta red porosa, más que con la relajación de la estructura^{104,105}. La incorporación de partículas de glibenclamida suspendidas en la red de poros (y no necesariamente adsorbidas en la superficie) puede ser un factor que promueva este comportamiento. El perfil de disolución demuestra que el transporte y disolución se lleva a través del ingreso del medio de disolución a la red de poros de la estructura y no mediante la liberación de las partículas hacia el medio de disolución¹⁰⁴. Los tiempos para obtener percentiles de disolución relevantes demuestran que la liberación se da de manera sostenida a través del tiempo, como es esperado para los dispositivos consistentes en estructuras monolíticas y de tipo mesoporosas^{69,70,106}.

Los parámetros estadísticos: tiempo medio de residencia y tiempo medio de disolución demuestran que la liberación se da de manera prolongada, toda vez que el tiempo medio de residencia del fármaco en la forma farmacéutica, el implante subcutáneo, es mayor que el tiempo medio de disolución¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. La inferencia anterior también se relaciona con el mecanismo de difusión *fickiano* establecida para la cinética de la disolución¹⁰⁹.

7.3 Estudio farmacocinético y farmacodinámico del implante subcutáneo de glibenclamida

A continuación, se presentan los perfiles comparativos de los dos diferentes tratamientos, en las dos poblaciones de individuos y empleando las variables farmacocinética y farmacodinámica, así como su interrelación.

Durante el estudio se eliminaron dos individuos: el número 4 dentro del grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng), el cual se retiró el implante antes de la primera hora del estudio y el identificado con el número 5 dentro del grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di), cuyos datos de glucemia y concentraciones plasmáticas del fármaco infieren que la inyección intraperitoneal no fue efectiva. La eliminación de los datos de estos

individuos está contemplada en el tratamiento y presentación de los resultados.

Las gráficas presentadas en cada apartado corresponden con los datos de la media grupal con su respectiva desviación estándar.

7.3.1 Análisis farmacocinético

7.3.1.1 Perfil plasmático de glibenclamida

Los perfiles plasmáticos de glibenclamida de los dos grupos normoglicémicos, el administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) y el administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng), se muestran en la Figura 21. Cada perfil corresponde a la media $\pm$ su desviación estándar.

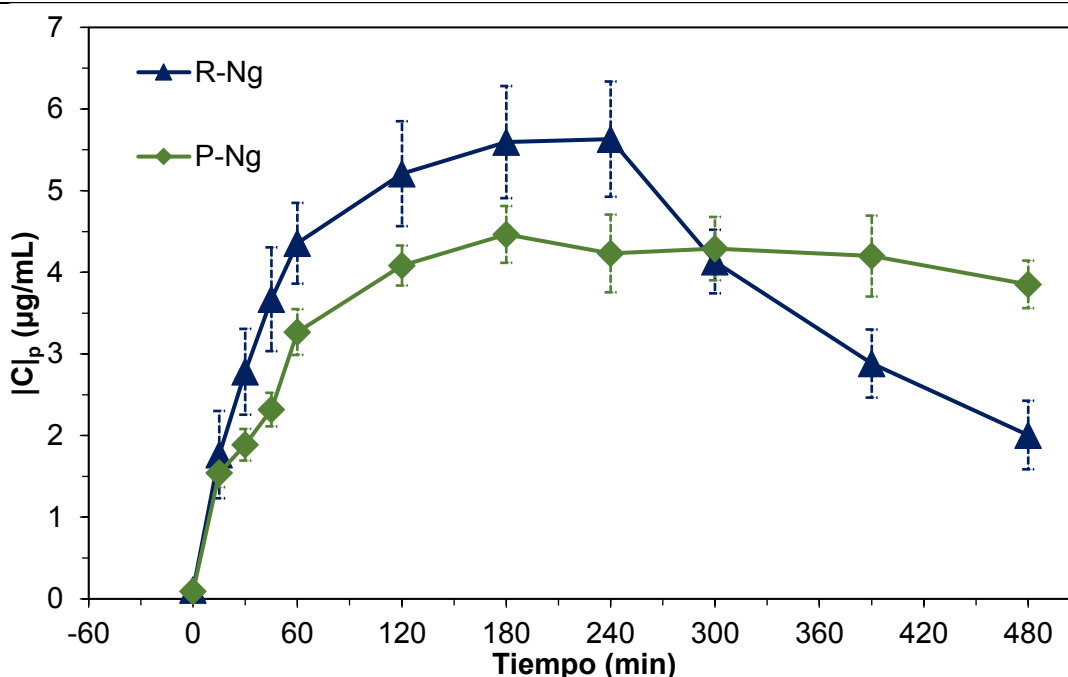


Figura 21. Perfiles plasmáticos de glibenclamida de los grupos normoglicémicos.

Se muestra la media $\pm$ su desviación estándar de las observaciones en cada tiempo de muestreo. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado con triángulos de relleno azul y $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado con rombos de relleno verde.

La liberación y absorción de glibenclamida al compartimento central que exhibe la administración del implante subcutáneo coincide con lo encontrado en el perfil de disolución (véase la Figura 19). Después de dicha liberación-absorción inicial, se presenta otro segmento ascendente que cambia su pendiente en el minuto 60 y se conserva hasta llegar

la $C_{p_{max}}$, alrededor de $t=180$ min, tiempo después del cuál se presenta la eliminación del fármaco. Esta eliminación se da de manera sostenida y coincide con el perfil logrado a partir de formas de liberación modificadas, con una duración prolongada y una pendiente cercana a cero^{102,106}.

De manera ordinaria, el perfil de la suspensión intraperitoneal exhibe una absorción, $t_{Cp_{max}}$ y eliminación correspondiente con la administración del fármaco desde una forma farmacéutica de liberación inmediata vía intraperitoneal⁶¹.

La similitud entre los perfiles plasmáticos de glibenclamida, durante los primeros 15 minutos, corresponde con lo determinado en el perfil de disolución de los implantes subcutáneos (véase la Figura 19). Es decir, la liberación inmediata del fármaco contenido en la superficie del implante (fármaco no necesariamente adsorbido que promueve una liberación mayor de lo que la liberación por difusión logra) es lo suficientemente considerable como para acercarse, al menos en ese segmento de tiempo, a la concentración plasmática de glibenclamida de una administración intraperitoneal^{70,102,104–106}. Por otro lado, existe una diferencia entre los valores de $t_{Cp_{max}}$ y la $C_{p_{max}}$ del tratamiento de prueba y el de referencia, ya que el grupo P-Ng presentó un máximo de 4.46 $\mu\text{g/mL}$ a los 180 minutos, mientras que R-Ng alcanza 5.63 $\mu\text{g/mL}$ a los 240 min.

En la Figura 22 se muestran los perfiles plasmáticos de glibenclamida de los dos grupos diabéticos, el administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) y el administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di). Cada perfil corresponde a la media $\pm$ su desviación estándar.

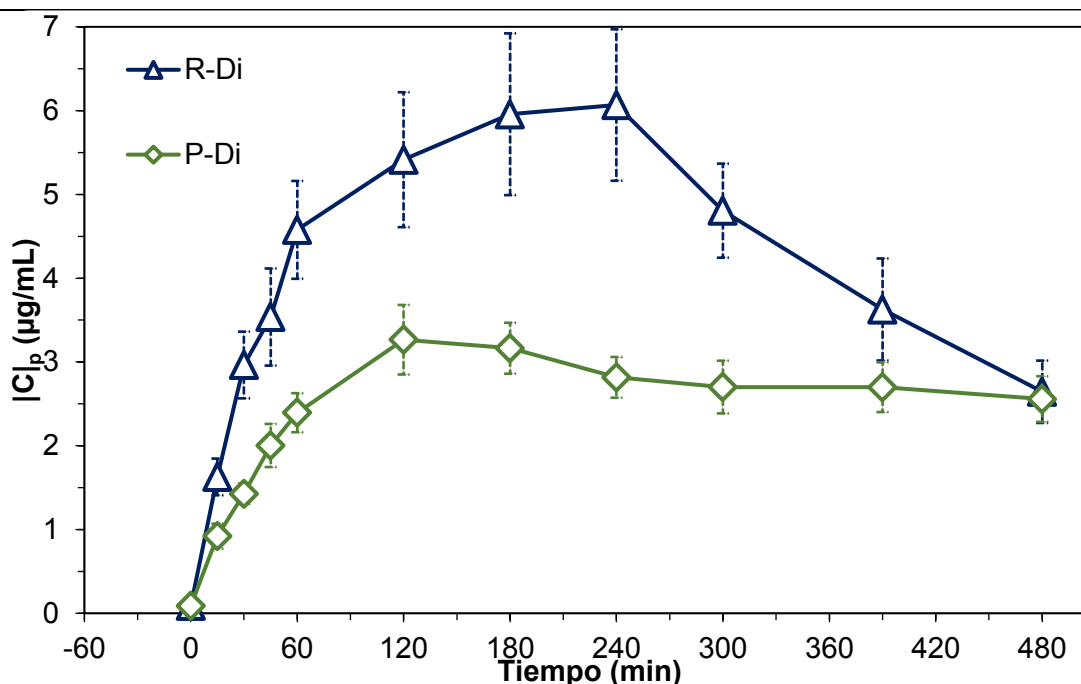


Figura 22. Perfiles plasmáticos de glibenclamida de los grupos diabéticos.

Se muestra la media $\pm$ su desviación estándar de las observaciones en cada punto de muestreo. Con $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (grupo de referencia R-Di) mostrado con triángulos de borde azul y $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (grupo de prueba P-Di) mostrado con rombos de borde verde.

A pesar de las similitudes entre los perfiles plasmáticos de glibenclamida de los grupos normoglicémicos con sus análogos diabéticos, las concentraciones que logran ambos tratamientos son de magnitud y relación diferentes. Por un lado, el perfil del tratamiento de prueba (el implante subcutáneo) logra un perfil de concentraciones menor en los individuos diabéticos que en los individuos normoglicémicos, mientras que, con el tratamiento de referencia (la suspensión intraperitoneal), se obtuvieron concentraciones mayores en los individuos diabéticos, en comparación con su administración en el grupo normoglicémico. Una explicación de estas diferencias entre los individuos diabéticos y los normoglicémicos se encuentra en los hallazgos de diversas de investigaciones acerca de la alteración de parámetros farmacocinéticos de hipoglucemiantes de la familia de las sulfonilureas cuando son administrados en pacientes enfermos o en modelos animales de diabetes *mellitus* tipo II. Tal es el caso de una absorción más lenta de la tolazamida en pacientes diabéticos, pero una absorción completa de la glipizida en el mismo tipo de pacientes¹¹⁰. Además, y como se discute en el análisis farmacodinámico, la reducción de glucemia sanguínea en términos

absolutos es debida al aumento de sensibilidad a la insulina en individuos diabéticos tratados con sulfonilureas¹¹¹.

Una de las ventajas terapéuticas que se infiere por las concentraciones plasmáticas de glibenclamida desde el tratamiento de prueba, es que se evitaría el efecto de regulación a la baja de las células β pancreáticas provocado por la exposición prolongada a altas concentraciones plasmáticas de sulfonilureas^{42,55}.

7.3.1.2 Modelo farmacocinético

Los modelos que presentan el menor valor en los parámetros de bondad de ajuste fueron seleccionados para establecer el mejor modelo en cada grupo. Los valores de estos resultados se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37. Criterios de verosimilitud de ajuste para la selección de los modelos FC.				
Parámetro	Modelo abierto de un compartimento (MAUC)		Modelo abierto de dos compartimentos (MADC)	
	Absorción de orden cero y eliminación de primer orden	Absorción y eliminación de primer orden	Absorción de orden cero y eliminación de primer orden	Absorción y eliminación de primer orden
R-Ng				
-2LL	-312.72	-370.5	-312.5	-370.3
AIC	-276.72	-334.5	-268.5	-326.3
P-Ng				
-2LL	-1766.4	-1809.8	-1773.0	-1808.6
AIC	-1730.4	-1769.8	-1729.0	-1764.6
R-Di				
-2LL	-1018.44	-1084.60	-1018.49	-1098.01
AIC	-982.44	-1048.60	-974.49	-1050.01
P-Di				
-2LL	-426.4	-555.5	-525.7	-593.1
AIC	-386.4	-515.5	-477.7	-545.1

Además de los modelos presentados en la Tabla 37, se evaluó la secuencia con modelos de tres compartimentos. Sin embargo, estos resultan en parámetros (particularmente en las constantes inter-compartimentales) con valores con tendencia a valores infinitos y/o infinitesimales por lo que fueron descartados para cualquier análisis ulterior. Lo anterior es

consecuencia del número de tiempos de muestreo que no permitieron caracterizar de manera completa al perfil plasmático de concentraciones.

De acuerdo con la definición de los criterios mostrados en la Tabla 37, el mejor modelo por elegir es aquel cuyos valores de criterios de verosimilitud sean los menores. Los criterios de verosimilitud son una medida de la concordancia entre las observaciones y las estimaciones debidas al modelo, entre menor sea su valor, mayor será el ajuste. Esto por supuesto es relativo a las observaciones experimentales, por lo que los valores obtenidos para cada modelo solo son comparables dentro de cada grupo¹¹². En el caso de los individuos normoglicémicos, el MAUC con velocidad de absorción y eliminación de primer orden es el que mejor explica a ambos grupos (referencia y prueba), considerando que los valores de verosimilitud logarítmica (-2LL) y del criterio de Akaike (AIC), son los menores entre los cuatro modelos evaluados. Sin embargo, es el MADC con velocidad de absorción y eliminación de primer orden es el que resultó con valores de verosimilitud logarítmica (-2LL) y del criterio de Akaike (AIC) menores para las estimaciones de los grupos diabéticos; por lo que este modelo es el que tiene mejor ajuste entre observaciones y estimaciones. A pesar de esto, el cálculo y análisis del enlace farmacocinético-farmacodinámico con dicho modelo, no permite colapsar la histéresis obtenida (como se discute más adelante), mientras que el modelo que demostró ser el más adecuado para los grupos normoglicémicos (el MAUC) sí logra colapsar la histéresis en ambos grupos diabéticos. Dado que el segundo resultó ser el más adecuado y cumple con el cometido de enlazar el componente farmacocinético con el farmacodinámico, este modelo también fue elegido para obtener los parámetros en los grupos diabéticos. La explicación de que el modelo MADC no logre colapsar la histéresis del efecto farmacodinámico se encuentra en el número de tiempos de muestreo (10 en un periodo de 8 horas) ya que, como se mostró en las Figuras 21 y 22, en este periodo no es posible observar la última fase del perfil plasmático.

La función general que describe el modelo de las concentraciones plasmáticas de glibenclamida se presenta en la Ecuación 14.

$$C_p = \frac{DF}{V} \frac{k_a}{(k_a - k)} (e^{-kt} - e^{-k_a t})$$

Ecuación 14. Modelo para la estimación de concentraciones plasmáticas de glibenclamida con absorción y eliminación de primer orden.

La determinación del modelo monocompartimental, con absorción y eliminación de primer orden ha sido descrita en otras investigaciones en modelo murino^{32,45,113}, mientras que, en otros reportes se ha demostrado que la administración oral de glibenclamida es bien explicada a partir de un modelo abierto de dos compartimentos^{114,115} situación acorde con los valores de verosimilitud de los modelos, presentados para los grupos de referencia en la Tabla 37. Por otro lado, en estudios en humanos esta farmacocinética bicompartimental también ha sido reportada en varias investigaciones^{36,39,40,116}.

En la Figura 23 se muestra el contraste entre los valores observados y los valores estimados a partir de los modelos establecidos. Las Ecuaciones 15 a 18 muestran los mejores ajustes a este modelo y los parámetros correspondientes se presentan en la Tabla 38.

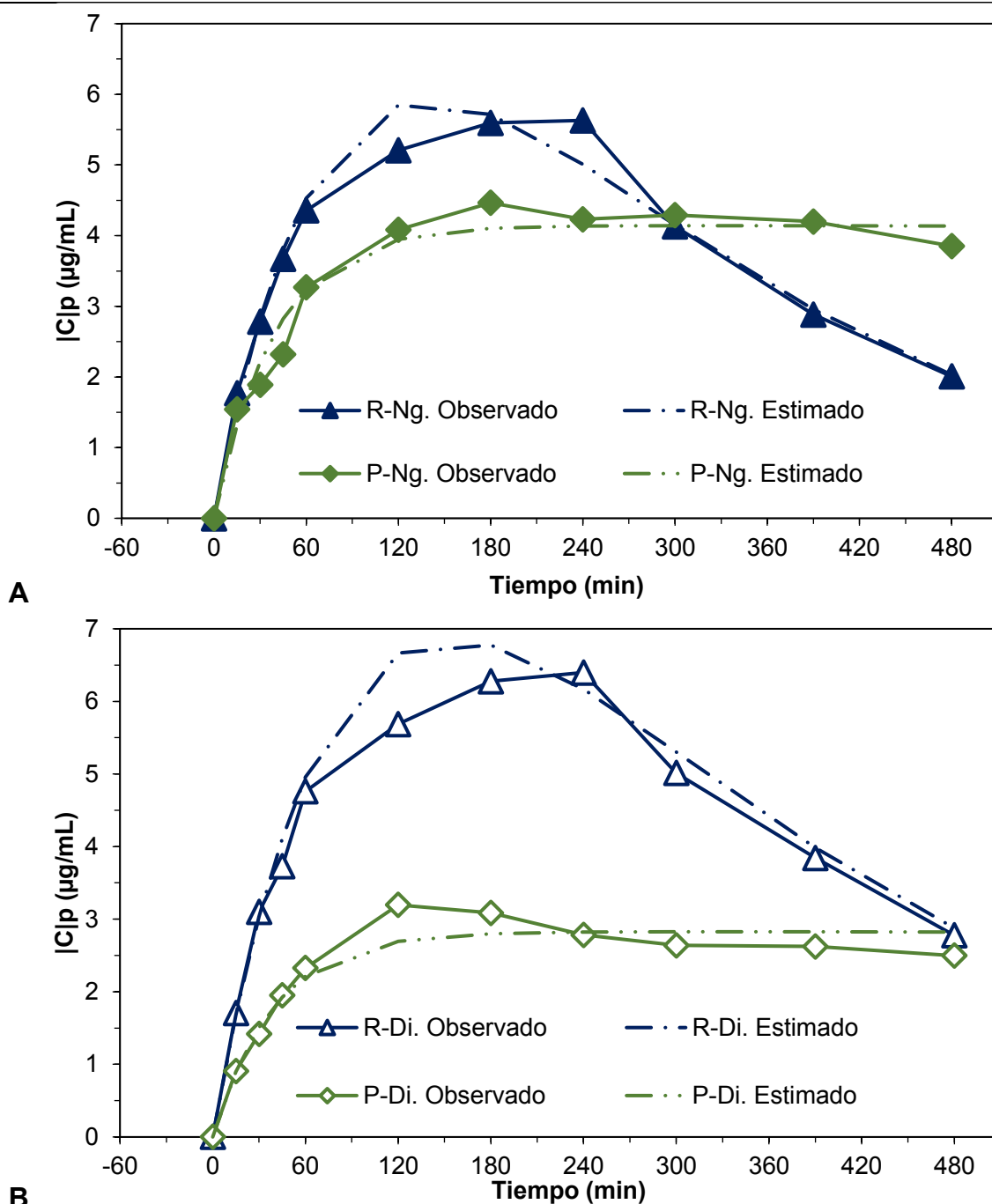


Figura 23. Contraste entre las observaciones y las estimaciones de los perfiles plasmáticos de glibenclamida.

Se muestran las observaciones del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) con triángulos de relleno azul, grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) con rombos de relleno verde; grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) con triángulos de borde azul y grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) con rombos de borde verde. Las estimaciones se muestran como líneas discontinuas, con punto-línea azul para los tratamientos de referencia y dos puntos-línea verde para los de prueba.

$$C_p(t) = 21.16 \frac{\mu g}{mL} (e^{-4.737 \times 10^{-3} \min^{-1} t (\min)} - e^{-1.031 \times 10^{-2} \min^{-1} t (\min)})$$

Ecuación 15. Modelo farmacocinético para el grupo R-Ng.

$$C_p(t) = 4.15 \frac{\mu g}{mL} (e^{-9.676 \times 10^{-6} \min^{-1} t (\min)} - e^{-2.531 \times 10^{-2} \min^{-1} t (\min)})$$

Ecuación 16. Modelo farmacocinético para el grupo P-Ng.

$$C_p(t) = 24.04 \frac{\mu g}{mL} (e^{-4.241 \times 10^{-3} \min^{-1} t (\min)} - e^{-9.934 \times 10^{-3} \min^{-1} t (\min)})$$

Ecuación 17. Modelo farmacocinético para el grupo R-Di.

$$C_p(t) = 2.83 \frac{\mu g}{mL} (e^{-8.235 \times 10^{-6} \min^{-1} t (\min)} - e^{-2.530 \times 10^{-2} \min^{-1} t (\min)})$$

Ecuación 18. Modelo farmacocinético para el grupo P-Di.

Tabla 38. Parámetros farmacocinéticos estimados.

Parámetro	Grupo			
	P-Ng	P-Di	R-Ng	R-Di
Farmacocinética compartimental				
k (min⁻¹)	9.676 x10 ⁻⁶	8.235 x10 ⁻⁶	4.737 x10 ⁻³	4.241 x10 ⁻³
k_a (min⁻¹)	2.531 x10 ⁻²	2.530 x10 ⁻²	1.031 x10 ⁻²	9.934 x10 ⁻³
t_{1/2} (min)	71,638.33	84,172.98	146.334	163.445
Vd/F (mL)	580.919	750.969	210.842	181.929
Cl/F (mL/min)	5.621 x10 ⁻³	6.184 x10 ⁻³	0.9987	0.772
Farmacocinética No Compartimental				
C_{max} (µg/mL)	4.578±0.388	3.289±0.371	5.652±0.700	6.451±0.495
t_{Cmax} (min)	204±32.86	130±24.49	210±32.86	216±32.86
ABC_{p0-t} (min µg/mL)	,1848.48±139.14	1,270.35±133.27	1,932.32±222.43	2,255.03±169.2 4
ABC_{p0-∞} (min µg/mL)	9,286.74±3062.4 4	6,590.56±1673.4 8	2,450.88±388.94	3,108.29±248.6 8
TMR (min)	2,014.82±905.02	2,101.96±558.39	329.20±37.63	385.42±22.57
λ_z (min⁻¹)	5.91 x10 ⁻⁴ ± 2.23 x10 ⁻⁴	5.13 x10 ⁻⁴ ± 1.34 x10 ⁻⁴	4.09 x10 ⁻³ ± 7.35 x10 ⁻⁴	3.29 x10 ⁻³ ± 3.07 x10 ⁻⁴

- **Resultados con el tratamiento de referencia: suspensión intraperitoneal. Grupos R-Ng y R-Di**

Los valores de la Tabla 38 de vida media de absorción, guardan una similitud con algunos reportados en humanos, lo mismo que el tiempo de concentración plasmática máxima^{36,113}. En cuanto al modelo murino, el tiempo de concentración plasmática máxima determinado se encuentra en el intervalo (amplio) en el que se ha presentado para rata^{32,45,115}.

El volumen de distribución aparente determinado, 0.7 para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (grupo de referencia R-Ng) y 0.6 L/kg para los diabéticos administrados con el mismo tratamiento (grupo de referencia R-Di) se encuentra entre los valores reportados en la Tabla 2, en el modelo murino; es decir, un volumen de distribución equivalente a, al menos, el 50 % del peso corporal^{32,45,46,115}. Este gran volumen de distribución es reflejo del fenómeno de acumulación (tanto en su forma libre como biotransformada) en el hígado y otros tejidos¹¹⁵. Otros estudios, en humanos,

reportan también valores similares para el volumen de distribución aparente⁴³, aunque en la práctica clínica valores menores, de entre 0.15 y 0.21 L/kg, son los habitualmente establecidos^{35,36,40,113}. La diferencia no significativa del volumen de distribución aparente entre los individuos normoglicémicos y los diabéticos sugiere que la diabetes inducida no promovió alteraciones metabólicas en el hepatocito ni se ven alterados los mecanismos de depuración y excreción renal del fármaco¹¹⁵.

La eliminación es altamente variable³⁶, pero los valores determinados, tanto para los individuos normoglicémicos como para los diabéticos, son consistentes con los de estudios en rata⁴⁵, así como para el intervalo de diversas investigaciones en humanos^{36,39,40,44,115,116}. Los valores superiores a las 10 h para la vida media de eliminación están relacionados con administraciones múltiples y con una extensión mayor a las 24 en la determinación de concentraciones plasmáticas^{115,117}. Además, ambos valores de aclaramiento aparente resultaron en extremo menor a lo reportado, tanto para modelo murino^{32,45,46} como para humanos^{36,44}. Este aclaramiento es en realidad aparente, y no sistémico, dado que su cálculo no involucra un volumen de distribución obtenido por una administración intravascular. Si se emplea la Ecuación 19 a los datos de otros estudios similares^{45,46}, pueden obtenerse aclaramientos aparentes similares a los aquí presentados.

$$\frac{CL}{F} = V_k$$

Ecuación 19. Aclaramiento del fármaco

Bajo el supuesto de que el aclaramiento fuese de al menos 50 mL/min, el volumen de distribución, para este estudio, debería ser de alrededor de 10.5 L y de 9 L para los individuos normoglicémicos y diabéticos, respectivamente.

Una de las principales diferencias reportadas en la farmacocinética de las sulfonilureas, cuando se evalúa grupos no diabéticos frente a quienes sí lo son, es la reducción del aclaramiento, como consecuencia de la disminución tanto en la tasa de eliminación (o prolongación del tiempo de vida media) y la reducción del volumen de distribución aparente^{45,46}. Esta situación se presentó en los resultados de la Tabla 38. Si bien este punto de comparación carece de una posible aplicación clínica, se destaca puesto que es un fenómeno relacionado con los índices de acumulación de las sulfonilureas en las células β del páncreas¹¹⁵.

En cuanto a los resultados del Análisis No Compartimental (ANC), los valores de Área Bajo la Curva del perfil plasmático ($ABCp$), tanto de las observaciones ($ABCp_{0-t}$) como de la estimación a infinito ($ABCp_{0-\infty}$), ajustados por la dosis, son consistentes y se encuentran comprendidos en el intervalo de los reportados en otros estudios en modelo murino^{32,45,46,118}. Cabe destacar que los valores referidos en la literatura, aun corregidos por la dosis, son ampliamente variables. Comparando al grupo R-Di frente a R-Ng, se demuestra que los valores de $ABCp$, con valores de significancia de $p=0.010$ para el $ABCp_{0-\infty}$ y $p=0.026$ para el $ABCp_{0-t}$, y del TMR ($p=0.020$) de los individuos diabéticos son superiores a los de los individuos normoglicémicos. Sin embargo, los valores de Cp_{max} de los grupos R-Ng y R-Di son estadísticamente iguales ($p=0.061$) y el $t_{Cp_{max}}$ es, en esencia, el mismo. Tomando todo lo expuesto en consideración, la evidencia sugiere una eliminación más lenta en el individuo diabético que en el normoglicémico, como consecuencia directa de la elevación en el volumen de distribución y de la reducción del aclaramiento⁶³ y como también fue establecido a partir del análisis compartimental^{45,46,118}.

- **Resultados con el tratamiento de prueba: implante subcutáneo. Grupos P-Ng y P-Di**

Los valores de la Tabla 38 para la constante de absorción son, en un sentido práctico, idénticas entre ambos grupos y superan a los obtenidos en los grupos análogos administrados con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia). En el caso de los individuos diabéticos administrados con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di), la absorción es 2.69 veces superior a la del tratamiento de referencia, mientras que en los individuos normoglicémicos administrados con el mismo tratamiento (grupo de prueba P-Ng), este valor es 2.45 veces superior. Esta rápida absorción es consecuencia de dos factores de distinta naturaleza entre sí. Por un lado, la absorción se ve promovida de manera dominante por la rápida liberación inicial de glibenclamida presente en la superficie del implante y su mantenimiento posterior debido al proceso de difusión-disolución que demuestra el material mesoporoso en tanto su perfil de disolución^{70,73,104} (Figura 19 y Tabla 35) y, por otro lado, las características del sitio de absorción que promueven (típicamente) tasas de absorción más lentas y sostenidas que la absorción enteral^{63,65}. En concordancia con estas premisas, Chen y colaboradores establecieron que la absorción completa de la exenatida requiere de una liberación sostenida en lugar de una inmediata⁷³.

El alto volumen de distribución aparente determinado para la administración subcutánea del fármaco es coherente con la rápida absorción inicial y con la más lenta eliminación del fármaco, como efecto esperado tras una liberación modificada y de tipo prolongada.⁶³ Este gran volumen continúa siendo consistente con el intervalo reportado¹¹⁵. Sin embargo, este ya no es explicado solo por la unión a proteínas plasmáticas o por la acumulación en el hígado, sino por su permanencia en la forma farmacéutica. Es decir, al determinar cambios en el volumen de distribución aparente ($\frac{V_d}{F}$) los cambios no son en el parámetro en sí, si no en la biodisponibilidad del fármaco administrado desde el implante subcutáneo.

El aclaramiento aparente fue mucho menor que con el tratamiento de referencia, tanto en individuos normoglicémicos como diabéticos. Sin embargo, a diferencia de lo que presentó el tratamiento de referencia, el aclaramiento aparente en el tratamiento de prueba no demostró una disminución cuando fue administrado en los individuos diabéticos. De hecho, se presentó el efecto contrario: aumentó un 10 %. Este cambio puede ser explicado por una constante de eliminación menor en el grupo P-Di (15 % menor) y un volumen de distribución aparente mayor (30 % mayor); pero es el cambio en la biodisponibilidad (un incremento) de la glibenclamida, administrada desde el implante subcutáneo lo que explica de manera directa la reducción en el aclaramiento aparente.

La constante de la fase lenta (eliminación aparente), como se esperaba con esta vía de administración y forma farmacéutica fue mucho más pequeña que la que presentaron los grupos tratados con la referencia. El hecho de que la biodisponibilidad de la glibenclamida haya incrementado por la liberación modificada (y su correspondiente impacto en la absorción), promueve los cambios en el volumen de distribución y aclaramiento aparentes; por lo que el modelo ajustó la constante de la fase más lenta a los valores presentados en la Tabla 38. Comparando los dos tratamientos, la eliminación aparente resultó en 489 y 514 veces más lenta, para los individuos normoglicémicos y diabéticos, respectivamente. A pesar de que el valor poblacional de la constante de eliminación del grupo P-Ng es 1.17 mayor que la obtenida por el grupo P-Di, esta diferencia es no significativa.

Entre los individuos normoglicémicos y diabéticos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de Cp_{max} y $t_{Cp_{max}}$ del tratamiento de prueba ($p < 0.050$). Mientras que la diferencia entre los valores del $ABCp$ solo es significativa para el $ABCp_{0-t}$ ($p < 0.050$), ya que para el $ABCp_{0-\infty}$ la diferencia es no significativa ($p = 0.096$),

siendo mayor el valor del grupo P-Ng. Además, el *TMR* también es estadísticamente no diferente entre los grupos de prueba ($p=0.839$). Esta conjunción de resultados sugiere que el curso patológico del grupo P-Di no afecta la biodisponibilidad entre individuos normoglicémicos y diabéticos y, por lo tanto, los parámetros farmacocinéticos $\frac{Vd}{F}$ y $\frac{CL}{F}$ no se ven alterados como sucedió con el tratamiento de referencia. En este sentido, la comparación estadística de los parámetros $\frac{Vd}{F}$ y $\frac{CL}{F}$ (del ANC) demuestra que el aclaramiento aparente no es diferente ($p=0.279$) y solo el volumen de distribución aparente del grupo P-Di es mayor que el del grupo P-Ng ($p=0.008$).

El análisis no compartimental también sugiere la capacidad del implante para liberar de manera sostenida al fármaco contenido en él. En la comparación del grupo P-Ng frente al grupo R-Ng, el valor de $\frac{Vd}{F}$ es 2 veces superior ($p<0.050$) y el valor de $\frac{CL}{F}$ es 3.57 veces inferior ($p<0.050$); en consecuencia, los valores de *TMR* y $ABCP_{0-\infty}$ son 6.12 y 3.79 veces mayores, respectivamente, y el valor de λ_z es 6.9 veces inferior. A pesar de que el valor de Cp_{max} del grupo de referencia es mayor ($p=0.014$), pero la diferencia entre los valores de $ABCP_{0-t}$ es no significativa, la eliminación aparente más lenta de P-Ng promueve un aumento significativo en los valores de *TMR* y $ABCP_{0-\infty}$. Por otro lado, en la comparación del grupo P-Di frente al grupo R-Di, todas las diferencias entre los valores de los parámetros no compartimentales presentes en la Tabla 38 son significativas ($p<0.050$) y se conserva la misma relación. El valor de $\frac{Vd}{F}$ es 3 veces mayor, el de $\frac{CL}{F}$ 2.11 veces menor, presentando así valores de *TMR* y $ABCP_{0-\infty}$ 5.47 y 2.12 veces superiores, respectivamente, mientras que el valor de λ_z resultó 6.45 veces inferior y los valores de Cp_{max} y $ABCP_{0-t}$ fueron menores en orden respectivo de 1.96 y 1.77 veces.

Estas diferencias sugieren que la administración del implante subcutáneo mantiene durante más tiempo y de manera sostenida las concentraciones plasmáticas del fármaco. Esta suposición deberá comprobarse con la estimación del perfil farmacocinético a partir de perfiles plasmáticos determinados con mayor extensión. Además, en los individuos diabéticos demostró mantener un perfil farmacocinético similar, en contraposición con las alteraciones que la suspensión intraperitoneal exhibe. Si bien la farmacocinética de la administración de implantes de liberación modificada en la vía subcutánea prevé este comportamiento,^{60,63,73,80,81,119} esta ventaja farmacocinética ha sido establecida en pocas

ocasiones previamente para las sulfonilureas o para la glibenclamida en particular^{47,120,121}.

7.3.2 Análisis farmacodinámico

7.3.2.1 Perfiles glucémicos

- **Resultados de los individuos normoglicémicos. Grupos R-Ng y P-Ng**

Los perfiles glucémicos de los grupos normoglicémicos, el control C(-), el administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) y el administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) se muestran en la Figura 24. Cada perfil muestra en cada tiempo de muestreo la media $\pm$ su desviación estándar.

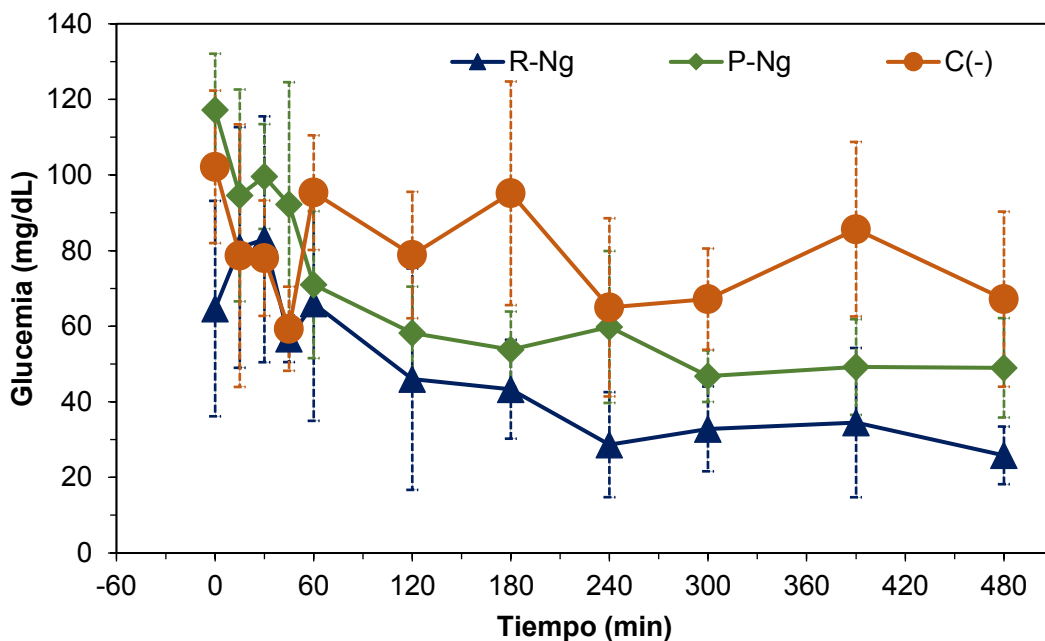


Figura 24. Perfiles glucémicos de los diferentes grupos normoglicémicos.

Se muestra la media $\pm$ su desviación estándar de las observaciones en cada punto de muestreo. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado con triángulos de relleno azul; $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado con rombos de relleno verde y $n=6$ para el grupo control negativo (círculos de relleno naranja).

Como se muestra en la Figura 24, los valores de glucemia sanguínea del grupo control C(-) -círculos- son altamente variables durante todo el intervalo del estudio, incluso desde una perspectiva intra-individuo (cuando se compara respecto con su glucemia al $t=0$). Sin embargo, la media grupal se mantiene en el intervalo en que se considera a los individuos

de esta especie como normoglicémicos ($71.16 - 111.69 \text{ mg/dL}$)¹²². Mientras que el valor superior de la desviación no alcanza, en ningún caso, el límite inferior (200 mg/dL) para considerar a individuos de esta especie como diabéticos inducidos, según lo establece también el método empleado en este estudio¹²³.

El perfil glucémico de los individuos administrados con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) presenta una reducción considerable, desde el minuto 60, y hasta el final de la toma de muestras a valores correspondientes a un episodio hipoglucémico severo ($<40 \text{ mg/dL}$)¹²⁴.

El fenómeno anterior no se presenta para los individuos administrados con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng). Si bien existe un descenso considerable desde el minuto 60, hasta el minuto 180m el perfil glucémico se estabiliza desde los 300 min y hasta el final del estudio. La discusión anterior soporta el hecho de que la liberación y absorción de la glibenclamida es diferente a la del grupo R-Ng.

Este hecho se ve reforzado por la determinación de una diferencia estadísticamente significativa entre las Área Bajo la Curva del perfil glucémico (ABC_g) promedio de los grupos P-Ng y C(-), mostrados en la Tabla 39. El análisis estadístico se muestra en las Tablas 40 y 41, respectivamente.

Tabla 39 Área Bajo la Curva del perfil glucémico (ABCG) de los grupos normoglicémicos.

Intervalo (min)	ABCG $\pm$ DE (%DER) (mg min dL ⁻¹)		
	C(-)	R-Ng	P-Ng
0 a 15	1356.2 $\pm$ 211.3 (15.5 %)	1091.2 $\pm$ 263 (24.1 %)	1588.5 $\pm$ 254.7 (16 %)
15 a 30	1175 $\pm$ 340.2 (28.9 %)	1228.7 $\pm$ 398.4 (32.4 %)	1456.5 $\pm$ 254.9 (17.5 %)
30 a 45	1030 $\pm$ 154.5 (15 %)	1047.5 $\pm$ 230.6 (22 %)	1438.5 $\pm$ 323.6 (22.5 %)
45 a 60	1160 $\pm$ 113.1 (9.7 %)	920 $\pm$ 242.6 (26.3 %)	1224 $\pm$ 344.8 (28.1 %)
60 a 120	5225 $\pm$ 689.9 (13.2 %)	3360 $\pm$ 1735.4 (51.6 %)	3876 $\pm$ 937.5 (24.1 %)
120 a 180	5220 $\pm$ 846.6 (16.2 %)	2680 $\pm$ 1132.1 (42.2 %)	3360 $\pm$ 550.3 (16.3 %)
180 a 240	4805 $\pm$ 1544 (32.1 %)	2160 $\pm$ 768.8 (35.5 %)	3408 $\pm$ 858.9 (25.2 %)
240 a 300	3965 $\pm$ 1018.6 (25.6 %)	1845 $\pm$ 718.1 (38.9 %)	3198 $\pm$ 530.1 (16.5 %)
300 a 390	6877.5 $\pm$ 1265.5 (18 %)	3030 $\pm$ 1207.7 (39.8 %)	4320 $\pm$ 675.7 (15.6 %)
390 a 480	6877.5 $\pm$ 1929.1 (28 %)	2715 $\pm$ 1107.6 (40.7 %)	4419 $\pm$ 878 (19.8 %)
Total (0 a 480)	37691.2 $\pm$ 5997.5 (15.9 %)	20077.5 $\pm$ 6802.2 (33.8 %)	28288.5 $\pm$ 4889.7 (17.2 %)

Tabla 40. Comparación estadística del efecto total en los grupos normoglicémicos.

Diferencia evaluada	Valor		I.C. (95%)	Estadístico	Sig.	Decisión
	(mg min dL ⁻¹)					
P-Ng frente a C(-)	-9402	-2,428>Dif.>-16,377	-3.050	0.014	H ₀	se rechaza
P-Ng frente a R-Ng	8211	15,917>Dif.>505	2.410	0.039	H ₀	se rechaza
R-Ng frente a C(-)	-17613	-9,364>Dif.>-25,862	-4.7575	0.001	H ₀	se rechaza

Tabla 41. Comparación estadística del efecto segmentado (ABCg por intervalo de tiempo) determinado en los grupos normoglicémicos.

Tiempo	Significancia		
	P-Ng frente a C(-)	P-Ng frente a R-Ng	R-Ng frente a C(-)
Intervalo			
0 a 15	0.132*	0.011	0.083*
15 a 30	0.162*	0.300*	0.807*
30 a 45	0.022	0.044	0.880*
45 a 60	0.676*	0.120*	0.053*
60 a 120	0.022	0.548*	0.034
120 a 180	0.002	0.253*	0.001
180 a 240	0.106*	0.032	0.004
240 a 300	0.165*	0.007	0.002
300 a 390	0.003	0.063*	<0.001
390 a 480	0.028	0.021	0.001

Dado que la diferencia total es significativa ($p < 0.05$) entre los grupos R-Ng y C(-), resulta evidente que el efecto logrado con el tratamiento corresponde a la administración de la glibenclamida en forma de suspensión. Sin embargo, el análisis estadístico para las *ABCg* de cada intervalo de tiempo, muestran que la diferencia entre el perfil glucémico del grupo R-Ng y C(-) no es significativa sino a partir de, al menos, los 120 minutos del estudio. Lo anterior muestra dos características importantes: primera, el efecto terapéutico aparece en el grupo de referencia a 120 minutos y, segunda, el efecto se mantiene hasta el final del estudio. Esta diferencia significativa permanece hasta el final del intervalo, ya que, como se observa en la Figura 24, la glucemia en este grupo se reduce hasta alcanzar niveles inferiores a los 30 mg/dL.

Paralelamente, la diferencia global entre el *ABCg* del perfil glucémico del grupo de prueba P-Ng, frente al grupo C(-), es significativa, por lo que se infiere que el tratamiento logra efectivamente el cambio en la respuesta fisiológica. Por otro lado, debido a la amplia variación de la glucemia sanguínea observada para el grupo control, los intervalos de tiempo en que el *ABCg* del grupo P-Ng es estadísticamente diferente del grupo control se encuentran alternados con periodos en los que esta diferencia no es estadísticamente significativa. Los resultados sugieren que en ambos tratamientos el efecto inicia en algún tiempo del intervalo de los 60 a 120 min, pero en el tratamiento de prueba el efecto se

encuentra intercalado con un periodo en cuya ABC_g no difiere significativamente de la del grupo control. Este periodo se encuentra entre los 180 a los 300 min y, como puede observarse en la Figura 24, debido a la variabilidad del grupo control, existe un acercamiento pronunciado entre los valores promedio del grupo control y el de P-Ng.

La comparación entre los grupos P-Ng y R-Ng, también resultó significativa, mostrando alternancias entre segmentos cuya diferencia es significativa y otros en los que no. Es a partir de los 180 min que la diferencia se mantiene estadísticamente significativa hasta la conclusión del estudio. Al margen de significancia ($p=0.063$), la diferencia en el intervalo de 300 a 390 min no resultó significativa.

Estas diferencias son fácilmente reconocibles en la comparación gráfica de los tres perfiles glucémicos. Por supuesto, no debe perderse de vista que, a pesar de mostrar diferencias estadísticamente significativas, globales o por intervalos, la meta de los tratamientos de prueba y referencia es disminuir la glucemia de los individuos. Considerando el comportamiento del perfil glucémico del grupo control durante la primera hora, se puede explicar que las diferencias no significativas de este periodo, de cada tratamiento frente al grupo control, son causadas por el retraso en el inicio del efecto hipoglucemiante de estos y por la variabilidad del grupo C(-); mientras que, posterior a esta primera hora, las diferencias significativas son debidas a la reducción de la glucemia como efecto de los tratamientos y las diferencias no significativas son causa de la variabilidad del grupo control. Además, la similitud de la primera hora del perfil glucémico, entre el grupo de prueba y el control, está directamente relacionada con el hecho de que ambos grupos recibieron la misma intervención quirúrgica.

De esta manera, es posible establecer la ventaja terapéutica del tratamiento de prueba con base en dos hallazgos. Primero, el perfil demostró variabilidad similar al grupo control (Tabla 39), pero mostró una media menos errática; es decir, se promueve un control glucémico. Segundo, a pesar de que ambos tratamientos, prueba y referencia, alcanzaron la hipoglucemia (<65 mg/dL), es en el grupo de referencia donde incluso se alcanzan niveles de una hipoglucemia severa (<40 mg/dL)¹²⁴, la cual es una reacción adversa del tratamiento con la sulfonilurea glibenclamida y que no fue provocada a través del tratamiento de prueba por la estabilidad aparente en el control glucémico.

- **Resultados de los individuos diabéticos. Grupos R-Di y P-Di**

En la Figura 25 se muestran los perfiles glucémicos de los grupos diabéticos, el control C(+), el administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) y el administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di). Cada perfil muestra en cada tiempo de muestreo la media $\pm$ su desviación estándar.

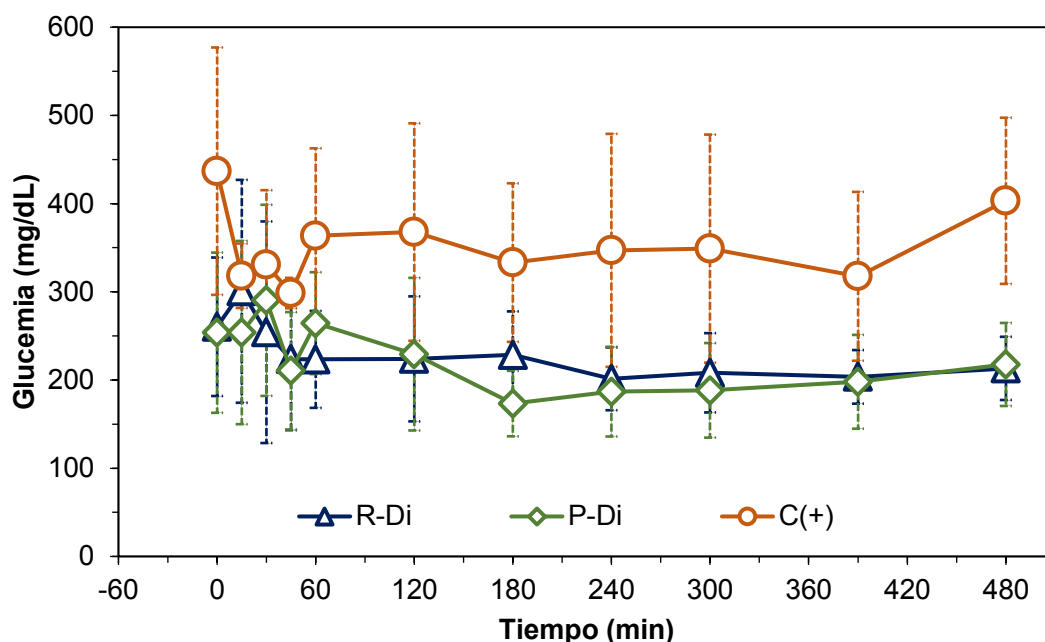


Figura 25. Perfiles glucémicos de los diferentes grupos diabéticos.

Se muestra la media $\pm$ su desviación estándar de las observaciones en cada punto de muestreo. Con $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) mostrado con triángulos de borde azul; $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) mostrado con rombos de borde verde y $n=6$ para el grupo control positivo (círculos de borde naranja).

La glucemia de todos los individuos del grupo control positivo C(+) fue superior a los 200 mg/dL, por lo que pudieron ser considerados como individuos diabéticos¹²³.

Existe también, para el perfil glucémico del tratamiento con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di), un comportamiento similar al de su análogo no diabético del inicio del perfil y hasta los 60 minutos, pero con dos diferencias importantes: a), los niveles de glucemia de este grupo son de alrededor del triple que los de su análogo normoglicémico y, b), el descenso posterior (a los 60 min) de la glucemia del grupo diabético no es de una magnitud tan grande como la del grupo no diabético. En contraposición, el

perfil glucémico del tratamiento con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) exhibe un perfil sumamente distinto al de su análogo P-Ng y también diferente al de su control, C(+). La comparación entre individuos normoglicémicos y diabéticos, para cada tratamiento, se muestra en las Figuras 26 y 27.

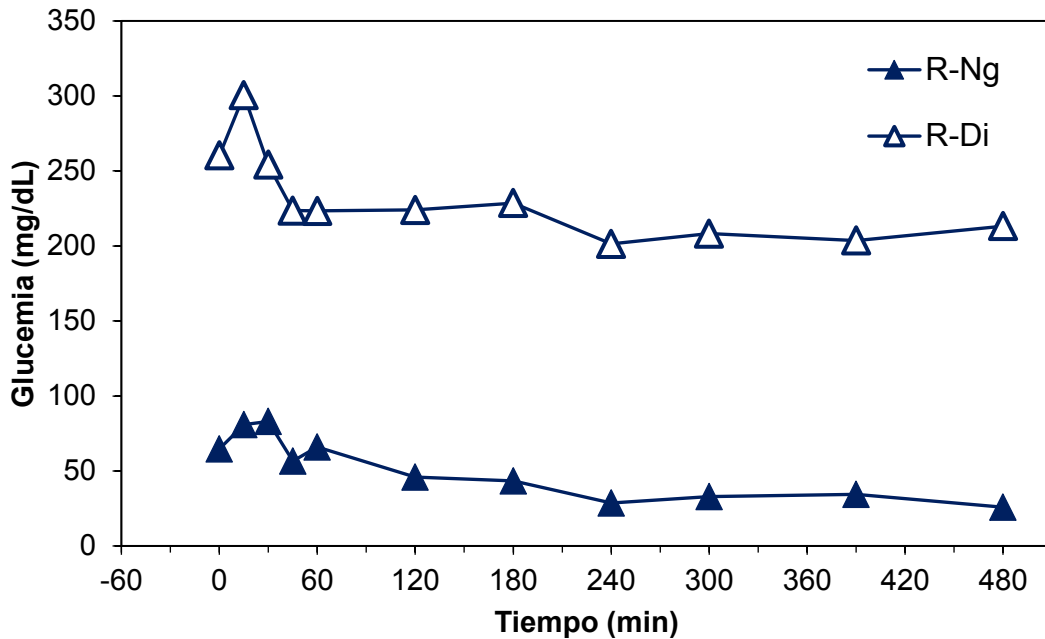


Figura 26. Comparación de los perfiles glucémicos de los grupos tratados con la suspensión intraperitoneal.

Se muestra la media de las observaciones en cada punto de muestreo. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado con triángulos de relleno azul) y $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) mostrado con triángulos de borde azul.

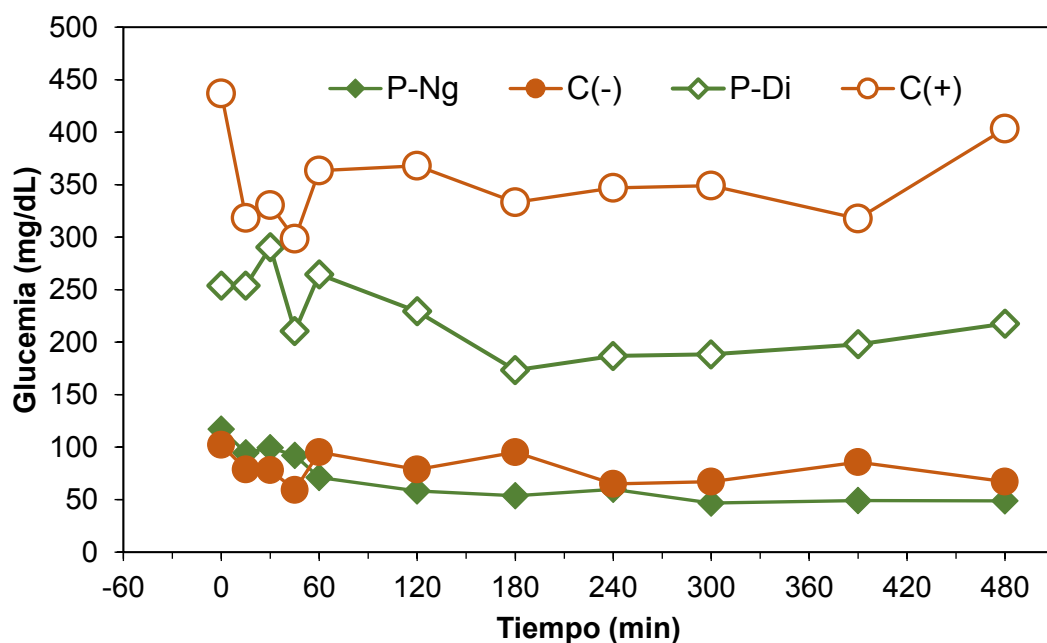


Figura 27. Comparación de los perfiles glucémicos de los grupos tratados con el implante subcutáneo.

Se muestra la media de las observaciones en cada punto de muestreo. Con $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado con rombos de relleno verde; $n=6$ para el grupo control negativo (círculos de relleno naranja); $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) mostrado con rombos de borde verde y $n=6$ para el grupo control positivo (círculos de borde naranja).

En la Tabla 42 se presentan los valores del ABC_g de los individuos diabéticos. La evaluación estadística de las diferencias, global y por intervalos entre puntos de muestreo, se muestra en las Tablas 43 y 44, respectivamente.

Tabla 42 Área Bajo la Curva del perfil glucémico (ABCg) de los grupos diabéticos.

Intervalo (min)	ABCg $\pm$ DE (%DER) (mg min dL ⁻¹)		
	C(+)	R-Di	P-Di
0 a 15	5662.5 $\pm$ 1163.2 (20.5 %)	4207.5 $\pm$ 1515.3 (36 %)	3806.2 $\pm$ 1291.5 (33.9 %)
15 a 30	4866 $\pm$ 895 (18.3 %)	4161 $\pm$ 1867.3 (44.8 %)	4081.2 $\pm$ 1446.5 (35.4 %)
30 a 45	4719 $\pm$ 724.6 (15.3 %)	3583.5 $\pm$ 913.5 (25.4 %)	3756.2 $\pm$ 1190.4 (31.6 %)
45 a 60	4965 $\pm$ 755.9 (15.2 %)	3352.5 $\pm$ 734 (21.8 %)	3562.5 $\pm$ 386.4 (10.8 %)
60 a 120	21936 $\pm$ 5757 (26.2 %)	13422 $\pm$ 2894.8 (21.5 %)	14815 $\pm$ 4112.6 (27.7 %)
120 a 180	21030 $\pm$ 4342.4 (20.6 %)	13578 $\pm$ 1846.3 (13.5 %)	12080 $\pm$ 2692.7 (22.2 %)
180 a 240	20406 $\pm$ 3629.9 (17.7 %)	12900 $\pm$ 1506.2 (11.6 %)	10805 $\pm$ 2592 (23.9 %)
240 a 300	20880 $\pm$ 7155.9 (34.2 %)	12288 $\pm$ 2285.3 (18.5 %)	11255 $\pm$ 2998 (26.6 %)
300 a 390	29997 $\pm$ 9429.9 (31.4 %)	18531 $\pm$ 3233.3 (17.4 %)	17385 $\pm$ 4534.5 (26 %)
390 a 480	32436 $\pm$ 6982.7 (21.5 %)	18756 $\pm$ 2695.1 (14.3 %)	18705 $\pm$ 4147.2 (22.1 %)
Total (0 a 480)	166897.5 $\pm$ 32038 (19.1 %)	104779.5 $\pm$ 15870.1 (15.1 %)	100251.2 $\pm$ 18353.8(18.3 %)

Tabla 43. Comparación estadística del efecto total en los grupos diabéticos.

Diferencia evaluada	Valor (mg min dL ⁻¹)	I.C. (95%)	Estadístico	Sig.	Decisión
P-Di frente a C(+)	-66,646	-31,902>Dif.>-101,390	-4.339	0.002	H ₀ se rechaza
P-Di frente a R-Di	-4,528	19,161>Dif.>-28,217	-0.432	0.676	H ₀ no se rechaza
R-Di frente a C(+)	-62,118	-25,246>Dif.>-98,989	-3.885	0.005	H ₀ se rechaza

Tabla 44. Comparación estadística del efecto segmentado (ABC por intervalo de tiempo) determinado en los grupos diabéticos.

Tiempo	Significancia		
	P-Di frente a C(+)	P-Di frente a R-Di	R-Di frente a C(+)
0 a 15	0.035	0.646*	0.127*
15 a 30	0.320*	0.938*	0.468*
30 a 45	0.150*	0.797*	0.061*
45 a 60	0.003	0.556*	0.009
60 a 120	0.040	0.541*	0.018
120 a 180	0.002	0.321*	0.008
120 a 240	0.001	0.147*	0.003
240 a 300	0.015	0.544*	0.034
300 a 390	0.017	0.648*	0.033
390 a 480	0.003	0.982*	0.004

Considerando que la diferencia entre las medias del *ABCg* total, de ambos tratamientos frente al grupo control, es diferente de cero ($p < 0.05$) se establece que, en estos grupos (R-Di y P-Di), existe una reducción en el *ABCg* asociada con estos tratamientos. Sin embargo, a diferencia de lo que se presentó con los grupos normoglicémicos, los dos tratamientos aplicados en individuos diabéticos no demostraron ser estadísticamente diferentes entre sí, como de hecho se aprecia en la Figura 25.

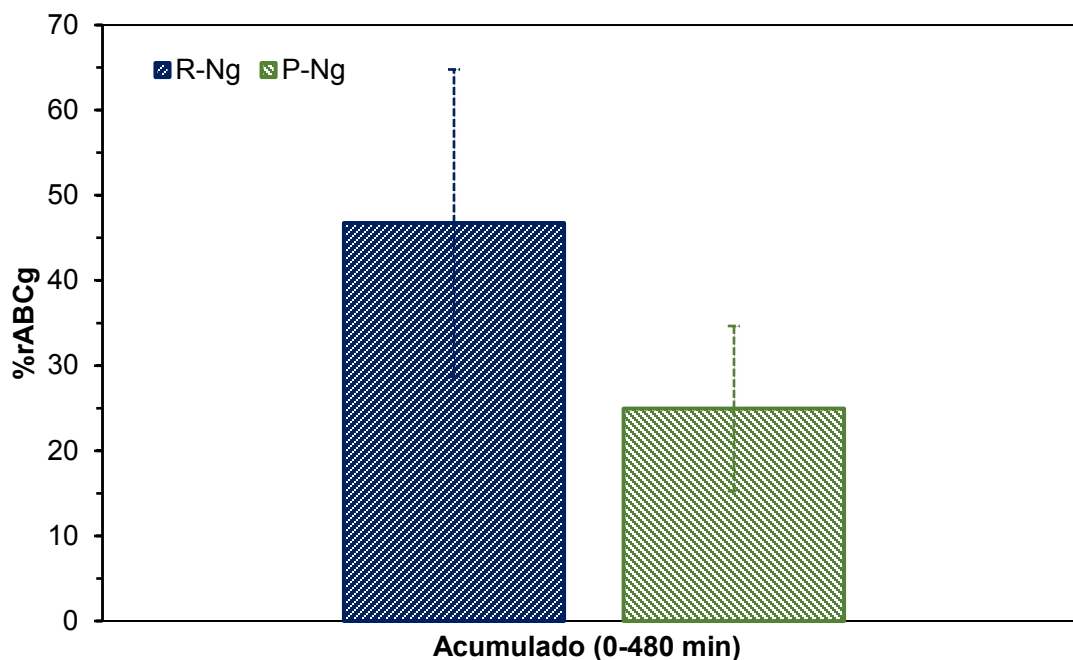
Esta similitud entre los tratamientos de referencia y de prueba también se mantiene en la comparación de los valores del *ABCg* por segmentos entre tiempos de muestreo. Esta situación es diferente a lo que ocurrió con los grupos normoglicémicos. En ellos, la reducción significativa del *ABCg* ocurrió en el intervalo de los 60 a 120 min (Tabla 41) y en los grupos diabéticos, en el intervalo de los 45 a 60 min. Otra diferencia importante, en particular para los dos grupos de prueba (P-Di y P-Ng), es que la intervención en los individuos normoglicémicos demostró intermitencias entre periodos donde existió reducción del *ABCg* con periodos en los que aumentaba; mientras que, en los individuos diabéticos una vez iniciada la reducción del *ABCg*, esta se mantuvo hasta la conclusión del estudio y no presentó algún aumento. Lo anterior permite establecer que en los individuos diabéticos el efecto farmacológico es más intenso, como se ha reportado en otros estudios similares, donde la reducción de la glucemia de los individuos normoglicémicos no es tan drástica^{45,46}.

Además se ha demostrado que la diabetes inducida por estreptozotocina altera la biotransformación y eliminación de la insulina, lo que promueve un incremento de la respuesta de esta, en comparación con su respuesta en individuos no diabéticos¹²³. Sin embargo, esta reducción no es lo suficiente como para recuperar niveles de glucemia sanguínea normales¹²².

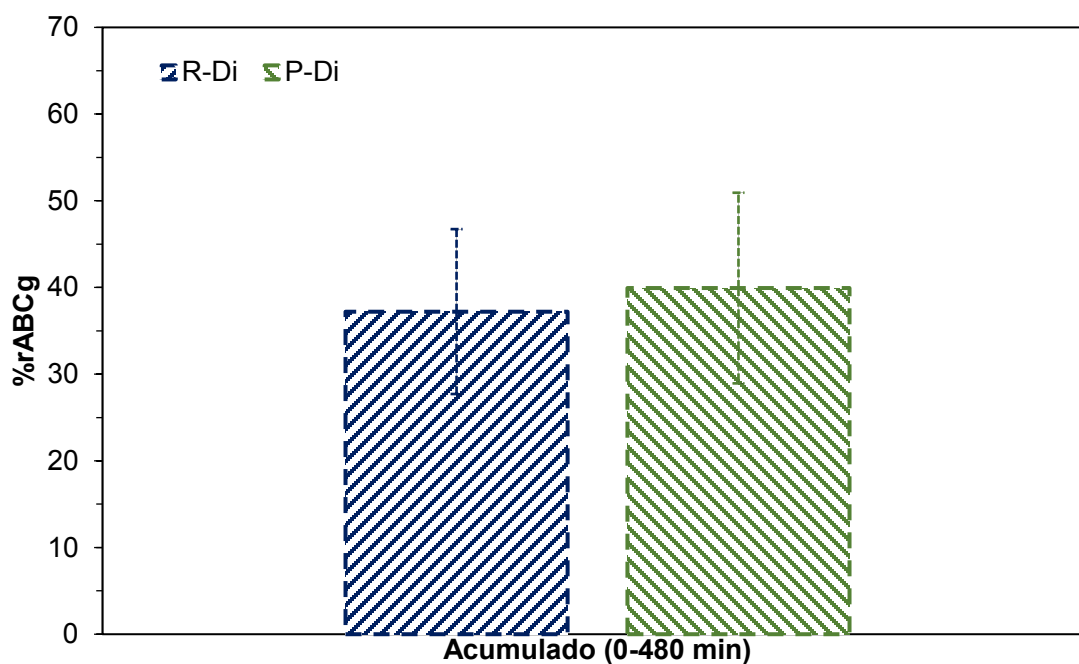
Las diferencias significativas, tanto totales como para los segmentos entre puntos de muestreo, de los grupos R-Di y P-Di frente a C(+) son logradas a pesar de que la variación de los datos del grupo control positivo (individuos diabéticos) es igual de alta que la que demostró el grupo C(-) (individuos normoglicémicos).

7.3.2.2 Efecto farmacodinámico

El porcentaje de reducción del *ABCG* ($\%rABCG$) de los perfiles glucémicos, de los grupos tratados frente a su correspondiente grupo control se muestran en la Figura 28. Se muestra la media de la reducción total $\pm$ su desviación estándar.



A

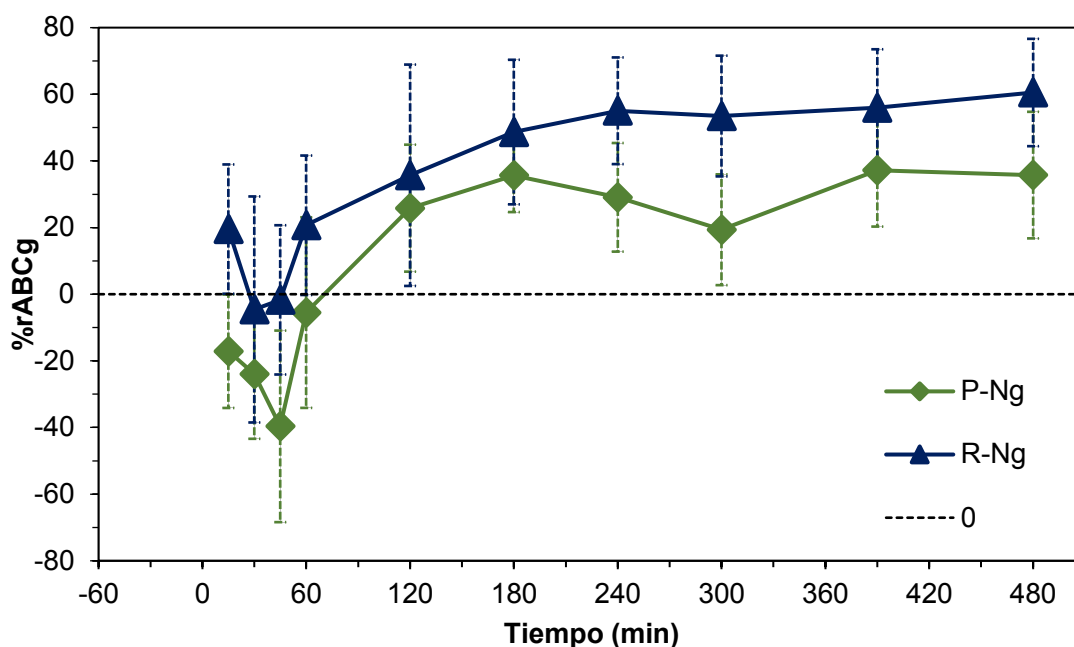


B

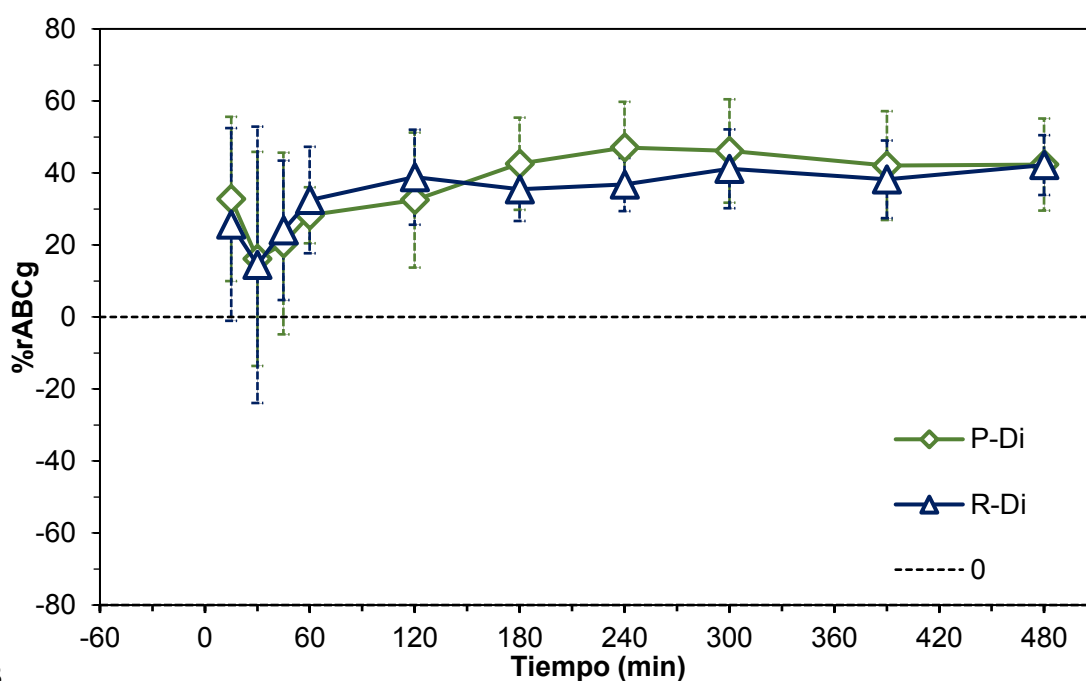
Figura 28. Efecto total (%rABCg).

Se muestra la media y desviación estándar. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado arriba a la izquierda; $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado arriba a la derecha; $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) mostrado abajo a la izquierda y $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) mostrado abajo a la derecha. Los grupos normoglicémicos (Ng) fueron comparados frente al control negativo, mientras que los diabéticos (Di) frente a al control positivo.

Las diferencias no significativas entre las *ABCg* de los grupos tratados y los controles correspondientes (Tablas 41 y 44) se traducen en la Figura 29 a valores cercanos al 0 % de reducción.



A



B

Figura 29. Índice de reducción del ABCg de los diferentes grupos tratados.

Cada punto corresponde con el límite superior del intervalo de tiempo y se muestra la media $\pm$ desviación estándar. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado con triángulos de relleno azul; $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado con rombos de relleno verde; $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) mostrado con triángulos de borde azul y $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) mostrado con rombos de borde verde. Los grupos R-Ng y P-Ng fueron comparados frente a C(-), mientras que los R-Di y P-Di frente a C(+).

Dado que el efecto farmacodinámico ($\%rABC_g$) en función del curso temporal, así como de los diferentes tratamientos e individuos, no incorpora nuevas variables, el análisis de las Figuras 28 y 29 es el que ya se ha presentado a partir de los perfiles glucémicos (sección 7.3.2.1).

7.3.3 Modelo FC-FD

7.3.3.1 Relación directa entre el efecto farmacodinámico y el componente farmacocinético

La relación del efecto como función del tratamiento, según la Ecuación 20, se presenta en las Figuras 30 y 31.

$$\%rABC_{gl} = f(|C|_p)$$

Ecuación 20. Relación del efecto farmacodinámico como función del componente farmacocinético.

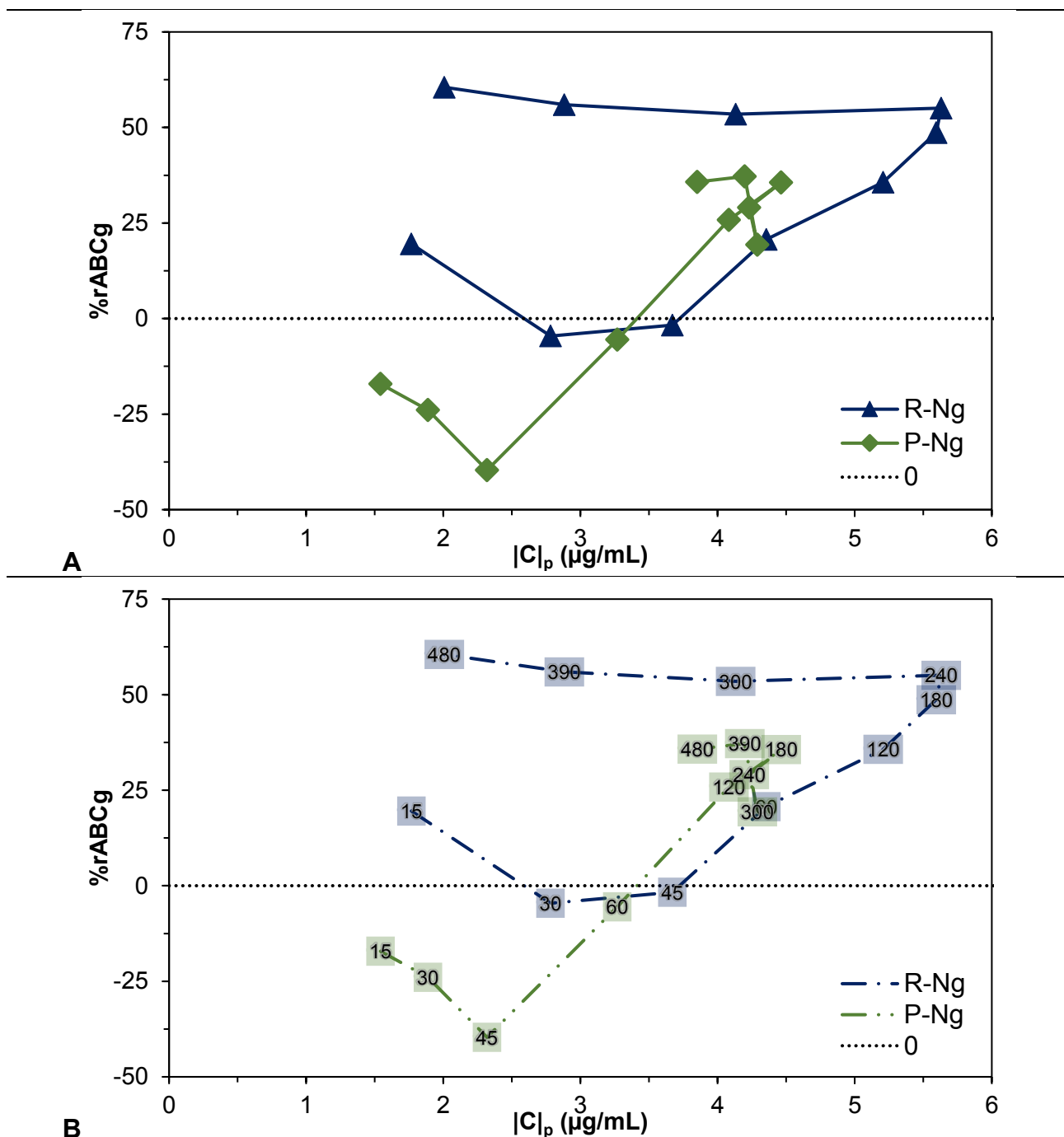


Figura 30. Efecto (%rABCg) como función de las concentraciones plasmáticas de glibenclamida de los grupos normoglicémicos.

En la Figura A, cada punto corresponde con la media de ambas variables. Con $n=6$ para el grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) mostrado con triángulos de relleno azul y $n=5$ para el grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) mostrado con rombos de relleno verde. En la Figura B, se indica en cada punto el límite superior del intervalo de tiempo correspondiente.

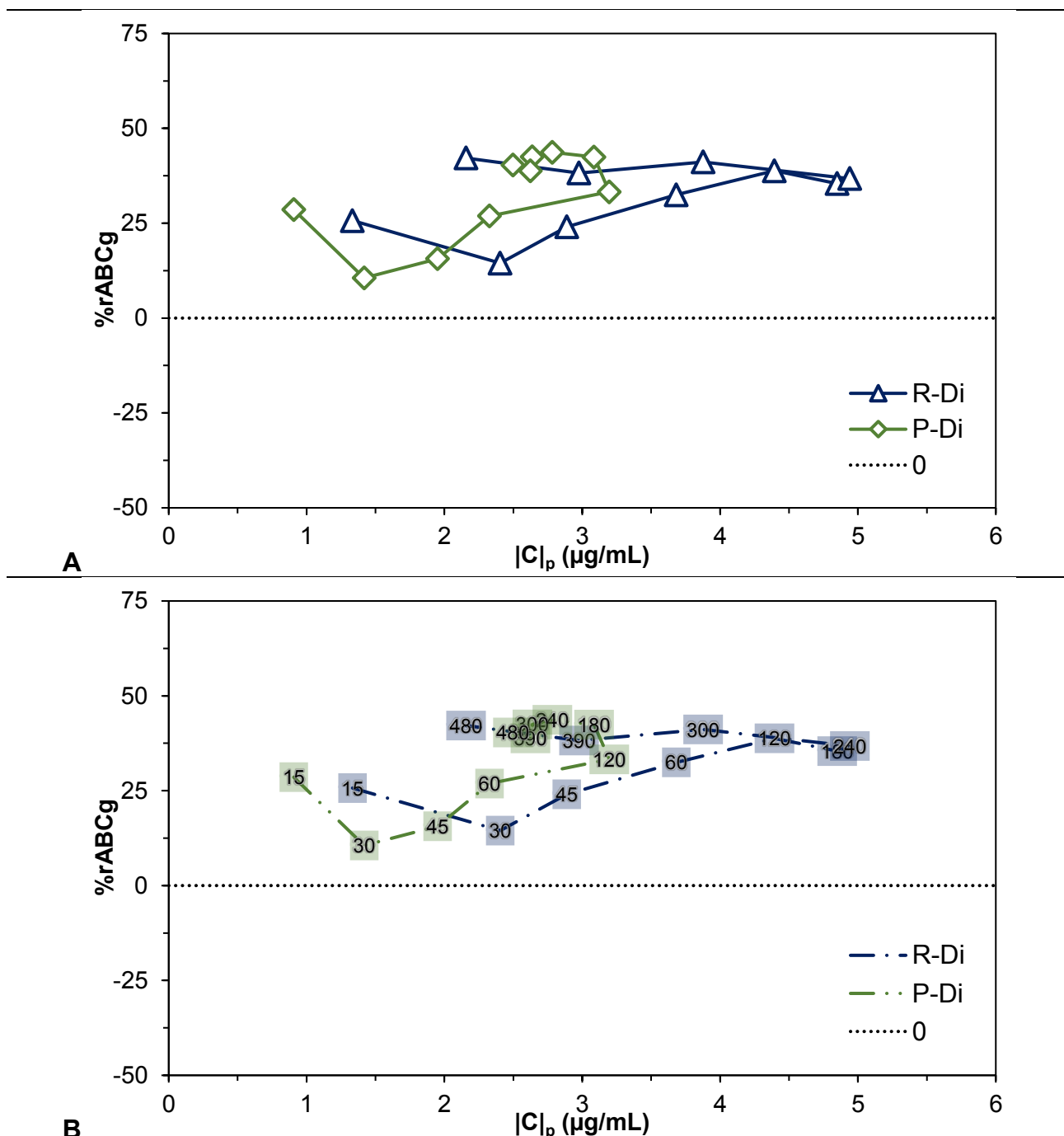


Figura 31. Efecto (%rABCg) como función de las concentraciones plasmáticas de glibenclamida de los grupos diabéticos.

En la Figura A, cada punto corresponde con la media de ambas variables. Con $n=5$ para el grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) mostrado con triángulos de borde azul y $n=6$ para el grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) mostrado con rombos de borde verde. En la Figura B, se indica en cada punto el límite superior del intervalo de tiempo correspondiente.

Una vez que se representa el efecto ($\%rABCg$) en función del tratamiento ($|C|_p$ en $\mu\text{g/mL}$) el resultado, para todos los grupos, es una histéresis antihoraria. Este retorno por la izquierda es característico del tratamiento con sulfonilureas en la glucemia sanguínea^{42,55,117}.

En el caso de los grupos normoglicémicos, una porción del gráfico del grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (grupo de prueba P-Ng) y del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (grupo de referencia R-Ng) puede considerarse similar. Esta región corresponde con la curva ascendente de P-Ng, comprendida entre los valores de concentración ocurridas de los 60 a los 180 min y, para R-Ng, las concentraciones presentadas de los 45 a algún punto previo a los 120 minutos. Se destaca esta similitud porque es el final de este segmento donde la diferenciación de la dinámica del efecto entre grupos es evidente. Por un lado, tanto el efecto como los valores de concentración del grupo P-Ng que los promueven, se conservan casi inalterados, por lo que todos los puntos del gráfico, correspondientes con el curso temporal a partir de los 180 min y hasta los 480 min, se concentran en una porción reducida del plano. Contrario a este comportamiento, el efecto del grupo R-Ng continúa ascendiendo hasta el valor de concentración correspondiente al tiempo de los 240 min, a partir de este punto y hasta el valor de concentración correspondiente con los 480 min, el efecto se conserva entre los 53 y 60 puntos de $\%rABCg$, pero este efecto estable es explicado por un intervalo amplio de concentraciones en retroceso (de los 5.6 a los 2.0 puntos de $|C|_p$ en $\mu\text{g/mL}$). En cuanto al parámetro farmacocinético estimado por el modelo, los puntos en los que cada gráfica retorna coinciden con la Cp_{max} del grupo R-Ng y con el valor en que el grupo P-Ng alcanza la meseta de concentraciones. Además, aquí es evidente la mayor intensidad de efecto que demuestra R-Ng (mayor al 50 $\%rABCg$) en comparación con P-Ng que se mantiene menor al 37 $\%rABCg$.

En los gráficos de la Figura 31, el inicio del efecto en los grupos diabéticos está representado por el cambio de valor negativo a positivo de las pendientes. Sin embargo, en esta pendiente ascendente no es apreciable una similitud entre el grupo administrado con la suspensión intraperitoneal (grupo de referencia R-Di) y el grupo administrado con el implante subcutáneo (grupo de prueba P-Di), como si se observó con sus análogos normoglicémicos. Una vez iniciado los efectos, estos son mantenidos entre 15 a 43 $\%rABCg$ y entre 24 a 42 $\%rABCg$, para los grupos P-Di y R-Di, respectivamente. Es decir, las histéresis son mucho

más estrechas y casi encimada consigo mismas, además que, como ya fue evaluado, el efecto logrado en los grupos diabéticos no es estadísticamente diferente entre sí. Al igual que con los grupos normoglicémicos, el punto de retorno de la histéresis se da, para el grupo R-Di, en cuanto alcanza el valor de $|C|_{p,max}$ del perfil y, para el grupo P-Di, en cuanto se logra el primer valor de la meseta de concentraciones. Paralelo a lo que presenta R-Ng, R-Di exhibe efectos estables que son explicados por un intervalo amplio de valores de concentración plasmática de glibenclamida, pero en este caso no solamente a partir del retorno de la histéresis, sino a partir de que inicia el efecto. Un caso similar ocurre con la comparación entre P-Ng y P-Di, solo que, en este último, a partir del retorno, la estabilidad del efecto es función de valores de concentración en retroceso, a diferencia de lo que exhibió el grupo P-Ng, donde las concentraciones se mantuvieron más estables sin avance o retroceso de valores de concentraciones, apreciable visualmente.

7.3.3.2 Componente farmacodinámico del modelo

Se ha reportado que la relación entre la concentración de sulfonilureas y el efecto hipoglucémico no es simple ni directa¹¹⁷. A pesar de que el presente estudio no contempló la determinación de los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos de los productos de la biotransformación con actividad hipoglucemiante¹¹⁷ o, por otro lado, el modelado en función de la respuesta directa de estimulación de la secreción de insulina y a su vez en el sistema glucosa-insulina⁵⁵, el efecto final (reducción del área bajo la curva del perfil glucémico) fue adecuado para estimar los parámetros del modelo FC/FD.

En este mismo sentido, Rydberg⁴² dedujo que existen concentraciones plasmáticas mínimas efectivas de sulfonilureas y, en comparación con otros fármacos de la misma familia, la acción de la glibenclamida destaca en cuanto a su retraso para promover la secreción de esta. Estas diferencias son bien conocidas clínicamente ya que, en conjunto con los problemas de absorción oral, se promueve la ingesta de alimentos previa la toma de glibenclamida para evitar una hipoglucemia severa o prolongada. Por otro lado, existe el indicio de que la capacidad de absorción de las sulfonilureas se ve afectada por los incrementos de la glucemia sanguínea. Todo lo anterior indica que el retraso en la aparición del efecto hipoglucemiante de la glibenclamida, observado en este estudio tanto con el tratamiento de referencia como con el de prueba, son debidos a la conjunción de factores fisiológicos, debidos primordialmente al componente farmacocinético, pero que

considerando el cambio en la respuesta en función de la concentración plasmática en el grupo de prueba (una histéresis sostenida en su última porción) y tomando en cuenta que ambos tratamientos en los individuos diabéticos alcanzan los mismos efectos, también debe estar participando el componente farmacodinámico. Es decir, se infiere que los mecanismos que retrasan el efecto (y que lo alteran) son procesos endógenos complejos y están relacionados con el enlace entre el modelo farmacodinámico y el farmacocinético, además que los procesos homeostáticos inherentes en el equilibrio del sistema glucosa-insulina deben tener un efecto preponderante, tanto en los individuos normoglicémicos como en los diabéticos. Para respaldar esto se presentan los modelos farmacodinámicos correspondientes.

El modelo y parámetros farmacocinéticos establecidos para cada grupo en la Tabla 38, fueron obtenidos a partir de la estimación integral y simultánea de: a), el propio modelo farmacocinético; b), el modelo farmacodinámico y c), en enlace entre estos dos. En la Tabla 45 se presentan los parámetros correspondientes con el componente farmacodinámico del modelo. Las relaciones que definen a cada modelo (basadas en la Ecuación 2) están presentadas en las Ecuaciones 21 a 24 y, en la Figura 32 se presentan los contrastes entre las estimaciones a partir de los modelos y los valores de efecto farmacodinámico observados.

Tabla 45. Parámetros farmacodinámicos estimados.

Parámetro	Grupo			
	P-Ng	P-Di	R-Ng	R-Di
$E_{\max}$	30.650	36.421	49.434	36.998
CE_{50}	1.507	0.604	0.058	0.072
γ	181.015	464.542	1.128	95.747

$$\%rABCg = \frac{49.434 \%rABCg \cdot C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{1.128}}{0.058 \frac{\mu g}{mL} + C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{1.128}}$$

Ecuación 21. Modelo farmacodinámico para el grupo R-Ng.

$$\%rABCg = \frac{30.650 \%rABCg \cdot C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{181.015}}{1.507 \frac{\mu g}{mL} + C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{181.015}}$$

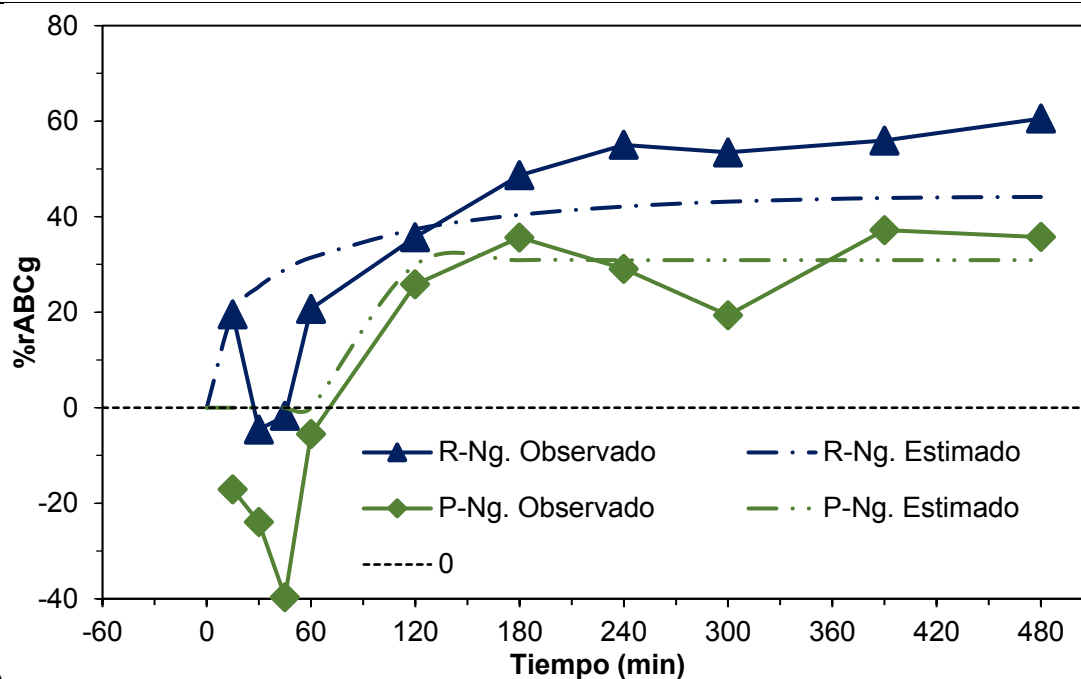
Ecuación 22. Modelo farmacodinámico para el grupo P-Ng.

$$\%rABCg = \frac{36.998 \%rABCg \cdot C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{95.747}}{0.072 \frac{\mu g}{mL} + C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{95.747}}$$

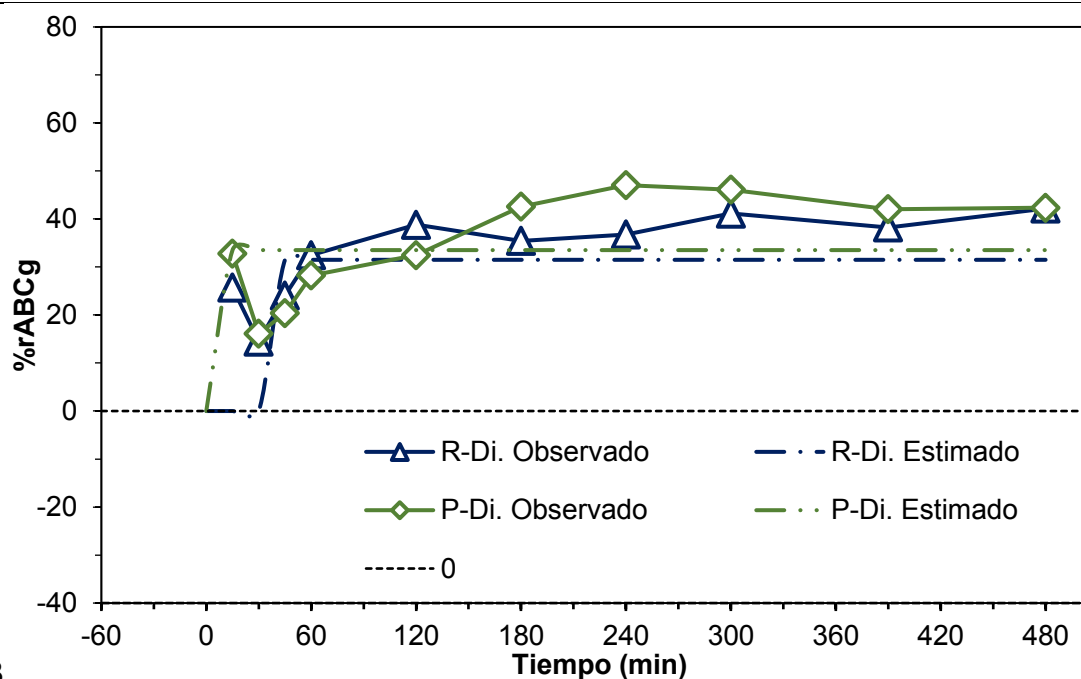
Ecuación 23. Modelo farmacodinámico para el grupo R-Di.

$$\%rABCg = \frac{36.421 \%rABCg \cdot C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{464.542}}{0.604 \frac{\mu g}{mL} + C_e \left(\frac{\mu g}{mL}\right)^{464.542}}$$

Ecuación 24. Modelo farmacodinámico para el grupo P-Di.



A



B

Figura 32. Contraste entre las observaciones y las estimaciones del índice de reducción del ABCg.

Se muestran las observaciones del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) con triángulos de relleno azul, grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) con rombos de relleno verde; grupo diabético administrado con suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) con triángulos de borde azul y grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) con rombos de borde verde. Las estimaciones se muestran como líneas discontinuas, con punto-línea azul para los tratamientos de referencia y dos puntos-línea verde para los de prueba.

Todas las estimaciones poblacionales están por debajo de la media de cada grupo, situación que está directamente relacionada con la alta variabilidad dentro de cada grupo, principalmente en el intervalo de tiempo previo a que iniciara el efecto farmacodinámico en cada caso. En cuanto a lo que sucede con los grupos normoglicémicos, el ajuste del modelo estima un efecto nulo durante la primera hora de la administración del implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng), en contraste con la administración de la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng), cuyo efecto inicia en los primeros minutos del estudio, de acuerdo con la estimación. Esto supone que efectivamente, una administración intraperitoneal consigue una liberación inmediata y, por lo tanto, un efecto igual de inmediato; mientras que la administración del implante subcutáneo logra un retraso en la aparición del efecto, mismo que permanece de manera sostenida. Sin embargo, para los grupos diabéticos, cuyo efecto (y por lo tanto su estimación) no son diferentes entre sí, la administración del implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) exhibe un efecto inmediato, mientras que la administración de la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) presenta un retraso de 30 minutos en la aparición del efecto. Además, este grupo exhibe un efecto sostenido a través del tiempo, de la misma manera que lo demuestra el grupo P-Di.

La magnitud del efecto (E_{max}) que se logra con cada tratamiento muestra las diferencias y similitudes ya discutidas a través del análisis de las gráficas de las observaciones y estimaciones de este efecto. Por un lado, la mayor magnitud del efecto hipoglucemiante del grupo R-Ng frente al de grupo de prueba P-Ng en estos individuos normoglicémicos, es estadísticamente significativa ($p=0.037$); mientras que no existe diferencia entre la magnitud de los grupos diabéticos P-Di y R-Di ($p=0.914$). Además, la comparación estadística muestra que las diferencia entre valores de magnitud entre los dos grupos administrados con cada tratamiento son no significativas; con significancias de $p=0.113$ para los tratamientos de referencia R-Ng y R-Di y de $p=0.125$ para los tratamientos de prueba P-Ng y P-Di. Lo anterior permite establecer que, si bien existen alteraciones debidas a la patología, tanto en los parámetros farmacocinéticos como en los farmacodinámicos, el presente estudio no permite discriminarlos debidamente, dado que no se está considerando la progresión de la enfermedad, y este componente en el modelo permitiría observar el efecto debida la tolerancia del sistema ante el fármaco^{55,63}.

La potencia, medida como la concentración efectiva que promueve el 50 % del efecto máximo (CE_{50}), del tratamiento de referencia es superior a la del tratamiento de prueba, en ambos tipos de individuos ($p < 0.001$). Por otro lado, la diferencia entre los dos grupos de referencia R-Ng y R-Di es no significativa ($p = 0.962$), mientras que la diferencia entre los grupos de prueba P-Ng y P-Di sí es estadísticamente significativa ($p < 0.001$), siendo más potente el tratamiento de prueba en los individuos diabéticos. Lo anterior permite establecer que la farmacodinámica en individuos, normoglicémicos o diabéticos, se conserva tras la administración de la suspensión intraperitoneal, pero la administración del implante subcutáneo demuestra un impacto positivo (aumento de la potencia) cuando es administrado en los individuos diabéticos, donde se tornaría clínicamente relevante. Este hecho está relacionado con que la administración de estreptozotocina aumenta la respuesta hipoglucemiante de la insulina¹²³, lo que supondría que el aumento en la potencia hipoglucemiante también se presentara en el grupo diabético administrado con el tratamiento de referencia (situación que de hecho es apreciable en los gráficos de glucemia), pero dado que el efecto farmacodinámico son los valores de glucemia sanguínea transformados a porcentajes de reducción de ésta, la magnitud de la reducción de glucemia sanguínea, frente a los correspondientes grupos control, se normaliza y ajusta. Es decir, el valor unitario de la variable $\%rABCg$ es mayor en orden de magnitud en los grupos diabéticos que en los normoglicémicos. Esto no satisface completamente la diferencia entre lo que ocurre con el tratamiento de prueba (donde la potencia se aumenta en los individuos diabéticos) con lo que ocurre con el tratamiento de referencia, para lo cual se aborda a continuación la participación del componente farmacocinético y el modelo que lo enlaza al componente farmacodinámico.

7.3.3.3 Enlace entre los componentes farmacocinético y farmacodinámico

El tercer componente estimado a través del modelaje en Monolix es el enlace entre los componentes farmacocinético y farmacodinámico. La incorporación de un compartimento de concentraciones en el sitio de efecto farmacodinámico (la biofase) resultó ser el modelo establecido para enlazar ambos componentes. Las concentraciones de glibenclamida en el compartimento de efecto, $|C|_e$, fueron estimadas según la Ecuación 25. Los modelos individuales se presentan en las Ecuaciones 26 a 29, para los grupos de prueba (administración del implante subcutáneo) y de referencia (administración de la suspensión

intraperitoneal), según fueron establecidos sus parámetros farmacocinéticos. En la Tabla 46 se muestran los valores de la constante de velocidad de redistribución del fármaco desde el compartimento de efecto y en la Figura 33 se muestra el curso temporal de estas concentraciones.

$$C_e = \frac{Dk_a k_{e0}}{V} \left(\frac{e^{-k_a t}}{(k - k_a)(k_{e0} - k_a)} + \frac{e^{-kt}}{(k_a - k)(k_{e0} - k)} + \frac{e^{-k_{e0}t}}{(k_a - k_{e0})(k - k_{e0})} \right)$$

Ecuación 25. Modelo para la estimación de concentraciones de glibenclamida, en el compartimento de efecto, con absorción y eliminación de primer orden, desde un compartimento.

$$C_e = 1.24 \times 10^{-4} \frac{\mu g \min^{-2}}{mL} \left(\frac{e^{-1.031 \times 10^{-2} \min^{-1} t(\min)}}{5.165 \times 10^{-5} \min^{-2}} + \frac{e^{-4.737 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{-2.054 \times 10^{-5} \min^{-2}} + \frac{e^{-1.052 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{3.412 \times 10^{-5} \min^{-2}} \right)$$

Ecuación 26. Modelo de enlace FC/FD (biofase) para el grupo R-Ng.

$$C_e = 6.52 \times 10^{-4} \frac{\mu g \min^{-2}}{mL} \left(\frac{e^{-2.531 \times 10^{-2} \min^{-1} t(\min)}}{4.836 \times 10^{-4} \min^{-2}} + \frac{e^{-9.676 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{1.566 \times 10^{-4} \min^{-2}} + \frac{e^{-6.198 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{-1.183 \times 10^{-4} \min^{-2}} \right)$$

Ecuación 27. Modelo de enlace FC/FD (biofase) para el grupo P-Ng.

$$C_e = 9.69 \times 10^{-5} \frac{\mu g \min^{-2}}{mL} \left(\frac{e^{-9.934 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{4.437 \times 10^{-5} \min^{-2}} + \frac{e^{-4.241 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{-1.782 \times 10^{-5} \min^{-2}} + \frac{e^{-7.820 \times 10^{-4} \min^{-1} t(\min)}}{2.978 \times 10^{-5} \min^{-2}} \right)$$

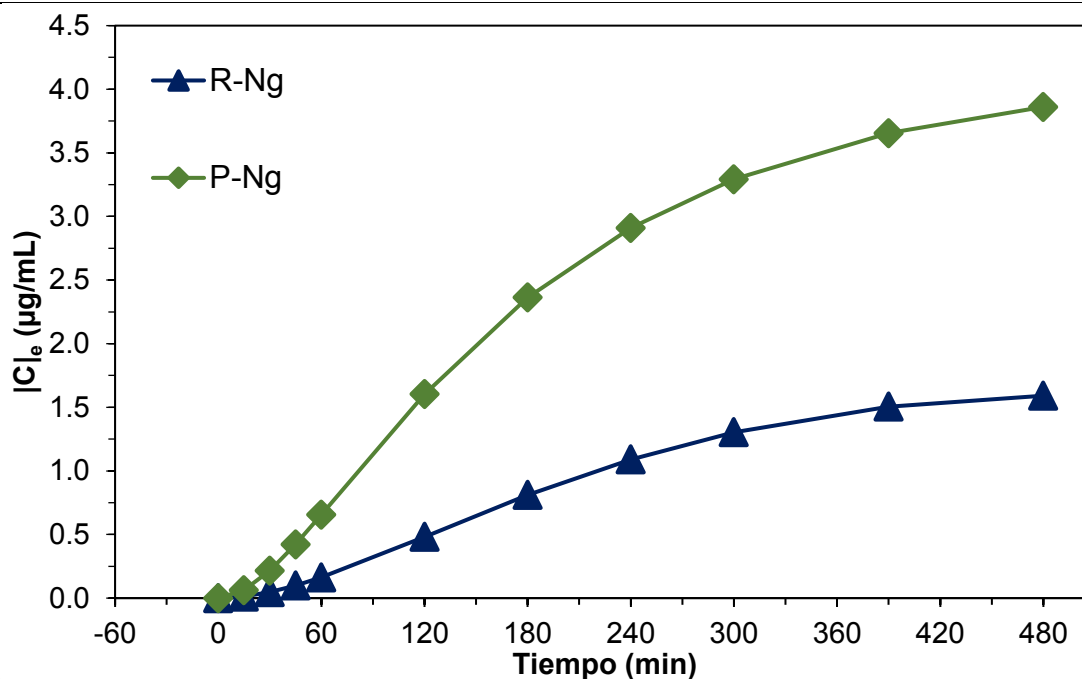
Ecuación 28. Modelo de enlace FC/FD (biofase) para el grupo R-Di.

$$C_e = 3.95 \frac{\mu g \min^{-2}}{mL} \left(\frac{e^{-2.530 \times 10^{-2} \min^{-1} t(\min)}}{-1.394 \min^{-2}} + \frac{e^{-8.235 \times 10^{-3} \min^{-1} t(\min)}}{1.394 \min^{-2}} + \frac{e^{-55.11 \min^{-1} t(\min)}}{3.036 \times 10^3 \min^{-2}} \right)$$

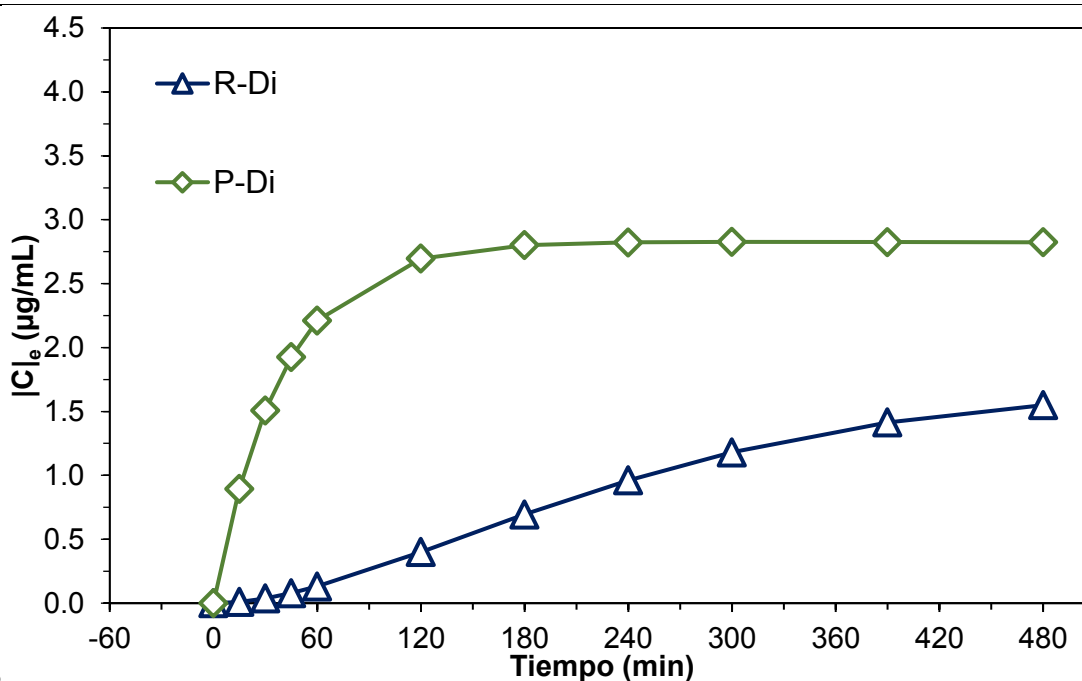
Ecuación 29. Modelo de enlace FC/FD (biofase) para el grupo P-Di.

Tabla 46. Constantes de velocidad de redistribución. Enlace farmacocinético-farmacodinámico.

Parámetro	Grupo			
	P-Ng	P-Di	R-Ng	R-Di
k_{e0} (min ⁻¹)	6.198 x10 ⁻³	55.11	1.052 x10 ⁻³	7.820 x10 ⁻⁴
$t_{1/2}$ (min)	111.828	0.0126	658.662	886.414



A



B

Figura 33. Perfiles de concentraciones del fármaco estimadas en el compartimento hipotético de efecto farmacodinámico (biofase).

Se muestran las estimaciones poblacionales del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) con triángulos de relleno azul; grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) con rombos de relleno verde; grupo diabético administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) con triángulos de borde azul y grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) con rombos de borde verde.

En ambos casos, el perfil de concentraciones en el compartimento de efecto de la administración de la suspensión intraperitoneal (tratamientos de referencia R-Ng y R-Di) es menor que el de la administración del implante subcutáneo (tratamientos de prueba P-Ng y P-Di). Además, los perfiles de los dos grupos de referencia son similares entre sí.

Obteniendo los valores de tiempo de vida media de esta constante de redistribución, es posible establecer que el efecto se ve mucho más retrasado con la administración de la suspensión intraperitoneal, en comparación con la administración del implante subcutáneo⁸⁴, considerando que este tiempo representa el tiempo para equilibrar las concentraciones de glibenclamida en el compartimento de efecto con el compartimento central (transcurridos entre 3 y 5 periodos)⁶³.

Sin embargo, no existe similitud entre los grupos P-Ng y P-Di, ya que en el grupo P-Ng el perfil es de tipo sigmoideo (como lo son también los dos grupos de referencia), mientras que el grupo P-Di exhibe un perfil de tipo logarítmico y asintótico a partir de los 120 min. La contraposición del rápido ascenso y posterior estabilización de las concentraciones del perfil del grupo P-Di, con el incremento menos veloz pero continuo del grupo P-Ng, permite explicar la diferencia en la potencia entre los grupos de prueba, como consecuencia de una cinética de redistribución diferente. Esto es, el grupo diabético se equilibra de manera más veloz que el normoglicémico. Así, es posible sugerir que el compartimento de efecto de los individuos diabéticos, administrados con el tratamiento de prueba, es reflejo de un fenómeno fisiológico diferente (promovido por la patología) al que se presenta en individuos normoglicémicos, ya sea que hayan sido administrados con el tratamiento de prueba o con el de referencia.

A pesar del análisis anterior, los perfiles de concentraciones de glibenclamida en el compartimento hipotético de efecto son una aproximación que enlaza al componente cinético con el dinámico, y que satisface al modelo en general, pero no necesariamente explica un fenómeno biológico en particular. Por lo que estos datos en sí pueden presentar diferentes expresiones y demostrar distintas relaciones entre grupos^{55,83,85}.

La histéresis del efecto farmacodinámico ($\%rABC_g$), presentada como función de las concentraciones plasmáticas del fármaco ($|C|_p$) en las Figuras 30 y 31, colapsa una vez que se representa en función de las concentraciones calculadas en este compartimento hipotético de efecto ($|C|_e$). Esta relación se presenta en la Figura 34.

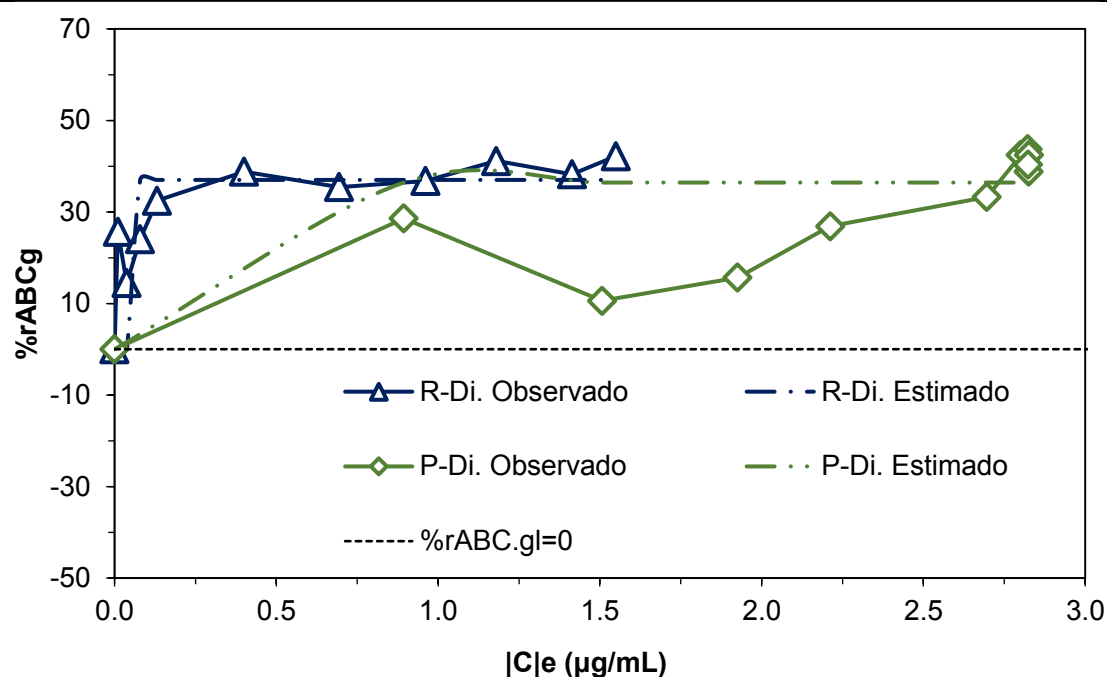
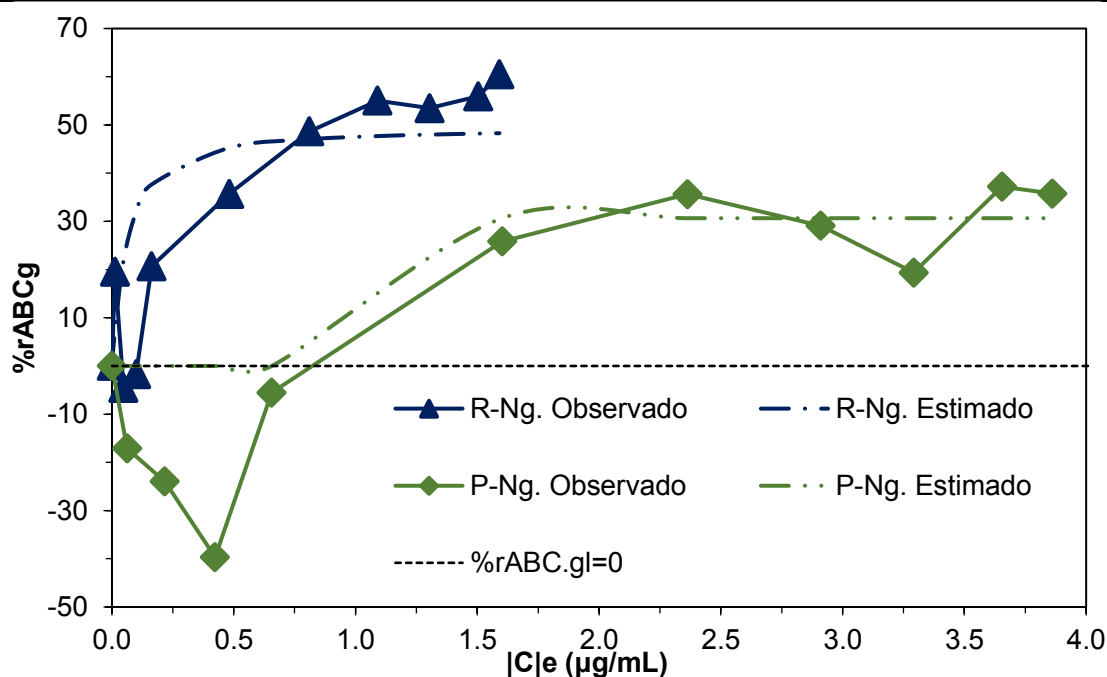


Figura 34. Relación entre en efecto y las concentraciones en la biofase.

Se muestran las observaciones del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) con triángulos de relleno azul, grupo normoglicémico administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) con rombos de relleno verde; grupo diabético administrado con suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) con triángulos de borde azul y grupo diabético administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di) con rombos de borde verde. Las estimaciones se muestran como líneas discontinuas, con punto-línea azul para los tratamientos de referencia y dos puntos-línea verde para los de prueba.

Como se analizó en la relación del efecto en función del tiempo, debido a que los valores observados negativos ($\%rABC_{gl} < 0$) que presenta el grupo administrado con el implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Ng) antes de los 60 minutos, el modelo ajusta el efecto en este segmento como $\%rABC_{gl} = 0$; por lo que en el intervalo en que efectivamente se observa un efecto ($\%rABC_{gl} > 0$) los datos observados demuestran un ajuste adecuado con la estimación. Si existiese un efecto, ya sea positivo o negativo previo a los 60 minutos, la evidencia y estimaciones no permitirían una discriminación fehaciente entre los mecanismos endógenos homeostáticos de la glucemia ante la intervención quirúrgica, o ante el tratamiento en sí^{55,115}. La diferencia entre los efectos del grupo normoglicémico administrado con la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Ng) y del grupo P-Ng puede ser el resultado de la resistencia homeostática, en este último grupo, tras la intervención quirúrgica inicial (y ante el tratamiento en sí)⁶³; ya que, además de que los perfiles plasmáticos de glibenclamida son diferentes entre sí, los perfiles de glibenclamida en el compartimento de efecto, en conjunción con los parámetros para el efecto sigmoideo, indican que la liberación sostenida y prolongada a través del tiempo es efectiva para promover efectos igual de sostenidos, pero para lograr esto las concentraciones en el compartimento de efecto deben superar a las del perfil que consigue una liberación inmediata en el tracto gastrointestinal.

Sin embargo, debe existir otro fundamento para el aumento de glucemia inicial por el que atraviesa el grupo P-Ng, puesto que el grupo control recibió la misma intervención quirúrgica y no experimentó este aumento de la glucemia. La probable explicación puede encontrarse en el efecto de la glucemia en la absorción de las sulfonilureas⁴². Esto soporta más la premisa de que la reducción de glucemia del grupo P-Ng, intermedia entre el grupo C(-) y R-Ng, es resultante de la farmacocinética particular de este fármaco administrado y liberado de manera sostenida en el espacio subcutáneo. En cuanto al grupo R-Ng, las observaciones guardan una estrecha relación con la estimación correspondiente.

El rápido aumento de concentraciones de glibenclamida en el grupo P-Ng es necesario para sobrepasar el impacto del aumento de la glucemia. Dado que el grupo R-Ng no recibe esta intervención, la regulación homeostática es diferente. Por lo anterior, a pesar de que el modelo FC-FD estima un perfil de concentraciones en el compartimento de efecto de R-Ng menores a las de P-Ng, estas son suficientes para promover efectos muy rápidos e intensos

en el organismo (que como se discutió previamente, la probabilidad de alcanzar un evento hipoglucémico severo es más probable en el tratamiento de referencia). Por esto, la Figura 34A muestra que, para un mismo valor de concentración en el compartimento de efecto, los efectos son diferentes entre los dos grupos normoglicémicos, considerando además que dicha concentración se alcanza en un tiempo diferente para cada grupo (véase la Figura 33).

Estas relaciones sugieren que la aparente mayor sensibilidad al efecto hipoglucemiante en el grupo R-Ng o, dicho de otra manera, la mayor potencia del fármaco en este es explicada por el componente farmacocinético. Esto es: una absorción lineal desde el aparato intestinal, con una distribución hacia un compartimento y una eliminación lineal promueve efectos más rápidos e intensos que si se administra por vía subcutánea (que evita el metabolismo hepático),⁶¹ lo que a su vez provoca una relación distribución-biotransformación-eliminación a partir de un solo compartimento. Este comportamiento en el grupo P-Ng, no solo evita la aparición de un efecto rápido e intenso, sino que promueve un efecto moderado y sostenido.

A pesar de la casi nula diferencia entre los efectos alcanzados (tanto observados como estimados) que se presentan en los individuos diabéticos (Figura 34B) el principal diferenciador, que también se observó para los individuos de los grupos R-Ng y P-Ng, es que la administración de la suspensión intraperitoneal (tratamiento de referencia R-Di) logra efectos más rápidos, pero en este caso no más intensos, de lo que logra la administración del implante subcutáneo (tratamiento de prueba P-Di). Los datos observados permiten que las estimaciones de ambos tratamientos se muestren sostenidos a través del tiempo, pero es el perfil de concentraciones en la biofase (Figura 33B) el que permite explicar que los efectos del grupo P-Di son correspondientes con una concentración estable a través del tiempo y no con un incremento de éstas, como sí lo es para el grupo R-Di.

Esto demuestra, en concordancia con lo observado con los individuos normoglicémicos, que la cinética por la que el fármaco consigue lograr su efecto farmacodinámico, a partir de su liberación modificada en el espacio subcutáneo es lo suficientemente potente como para lograr efectos iguales a los de una administración tradicional en el aparato intestinal. Además de esto, la administración del implante subcutáneo supone que este efecto es sostenido a través del tiempo, de acuerdo con las simulaciones que derivan de los parámetros estimados, situación que lo diferencia de la administración de la suspensión

intraperitoneal, cuya duración no es prolongada.

Retomando la comparación entre grupos que recibieron el mismo tratamiento, el curso temporal de las concentraciones de glibenclamida en el compartimento de efecto (véase la Figura 33) lo explican de manera satisfactoria, puesto que los perfiles de los grupos administrados con la suspensión intraperitoneal (grupos R-Ng y R-Di) son sumamente similares entre sí; mientras que los de los grupos que recibieron el implante subcutáneo (grupos P-Ng y P-Di) se diferencian en varios aspectos. Esto es apreciable considerando el retraso en la aparición del efecto en el grupo P-Ng, en comparación con el grupo P-Di. El modelo ajusta los parámetros farmacodinámicos (particularmente la potencia) y el del modelo de enlace FC/FD (constante de redistribución) para explicar el perfil en cada caso, consecuentemente, se satisface la no aparición de un efecto farmacodinámico negativo (en las observaciones) en el grupo P-Di, mismo que sí ocurre en la parte inicial del grupo P-Ng.

En cuanto al componente cinético del modelo, es posible establecer que, al evaluar simultáneamente los datos farmacodinámicos, el modelaje consigue ajustar los parámetros de este componente dinámico (E_{max} , CE_{50} y $gamma$), así como su comportamiento en función del tiempo, de tal manera que su aparición, magnitud y duración ya no están sujetas al curso temporal de las concentraciones plasmáticas de glibenclamida. La importancia de este análisis radica en que el modelo no precisa de incorporar un compartimento periférico, (tisular) del cual dependa el comportamiento dinámico del efecto⁸⁴.

8 Conclusiones

El implante fabricado demostró uniformidad de contenido, cuyo perfil de disolución, explicado a través del modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas, es consistente con la liberación y farmacocinética que presenta en el estudio *in vivo*. El perfil farmacocinético que presenta la administración del fármaco a partir del implante subcutáneo es consistente con una liberación modificada y cuya absorción desde el espacio subcutáneo prolonga las concentraciones de glibenclamida a través del tiempo. La conjunción de esta liberación sostenida y la absorción a partir del tejido subcutáneo promueve un impacto positivo en alcanzar los mismos efectos hipoglucemiantes que la administración tradicional en el tracto gastrointestinal. Con la importante diferencia de que el efecto estimado tras la administración tradicional durará mucho menos que el efecto estimado para la administración del implante de glibenclamida.

Con lo anterior, la necesidad de evaluar el efecto de la dosis (con base en los resultados de CE_{50} para los diferentes grupos) toma particular importancia, considerando que el implante demostró, en síntesis, una mayor eficiencia en el control glucémico. Además, la administración del implante subcutáneo de glibenclamida no es generadora de eventos hipoglucémicos severos en individuos normoglicémicos.

El implante subcutáneo demostró una mejoría en la potencia del tratamiento con glibenclamida en los individuos diabéticos, comparándolos frente a los individuos normoglicémicos. Situación que no ocurre con el tratamiento tradicional, donde la potencia se conserva, independientemente de la presencia de la patología.

En cuanto a la determinación del modelo en cada grupo, la conversión de los niveles de glucemia por unidad de tiempo a índices de reducción frente a el nivel preestablecido (grupos control) fue el abordaje más adecuado para la presentación del modelado FC/FD, cuyas estimaciones presentaron la mejor bondad de ajuste de las observaciones.

Finalmente, ya que el efecto total en la reducción de la glibenclamida está relacionado con su efecto en la producción de insulina, el efecto de los metabolitos activos debe estudiarse a la par del monitoreo de las concentraciones de insulina. Por otra parte, será necesario evaluar otros factores importantes no cubiertos en el presente estudio, tales como la extensión del tiempo de muestreo, la inclusión de un periodo de lavado, la inclusión de diferentes dosis en diferentes grupos, y el efecto del retiro del implante. Además, en cuanto a la variable farmacodinámica, el diseño experimental debe robustecerse; por lo que se propone un control glucémico riguroso mediante la incorporación de una dieta controlada y programada, para así poder establecer una fase previa y determinar el valor basal de glucemia sanguínea.

9 Referencias

1. Torres Arreola L del P, Gil Velázquez LE, Sil Acosta MJ, Domínguez Sánchez ER, Parrilla Ortiz JI, Santillana Hernández SP, *et al.* Guía De Práctica Clínica GPC Tratamiento de la Diabetes *Mellitus* Tipo 2 en el primer nivel de Atención [Internet]. 1st ed. Instituto Mexicano del Seguro Social, editor. Instituto Mexicano del Seguro Social; 2014 [cited 2020 Jul 25]. Available from: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/catalogoMaestroGPC.html>
2. Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, *et al.* Pharmacologic Treatment of Type 2 Diabetes: Injectable Medications. *Ann Pharmacother* [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2021 Apr 3];49(6):700–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25802244/>

3. Harrower ADB. Comparative tolerability of sulphonylureas in diabetes *mellitus*. Drug Saf [Internet]. 2000 [cited 2021 Apr 3];22(4):313–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10789825/>
4. Stein SA, Lamos EM, Davis SN. A review of the efficacy and safety of oral antidiabetic drugs. Expert Opin Drug Saf [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Apr 3];12(2):153–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23241069/>
5. Kwon S, Singh RK, Perez RA, Abou Neel EA, Kim H-W, Chrzanowski W. Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. J Tissue Eng [Internet]. 2013 Sep 2;4(1):204173141350335. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2041731413503357>
6. Wang Y, Zhao Q, Han N, Bai L, Li J, Liu J, *et al*. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med [Internet]. 2015 Feb [cited 2020 Sep 12];11(2):313–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.0141549-9634/http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2014.09.014>
7. Mullaicharam AR. Novel approaches in vesicular drug delivery systems. Res J Pharm Biol Chem Sci. 2013;4(3):211–7.
8. Qiu Y, Lee PI. Rational Design of Oral Modified-Release Drug Delivery Systems. In: Developing Solid Oral Dosage Forms [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2020 Sep 12]. p. 519–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128024478000194>
9. Lu J, Liong M, Zink JL, Tamanoi F. Mesoporous silica nanoparticles as a delivery system for hydrophobic anticancer drugs. Small [Internet]. 2007 Aug 3 [cited 2020 Sep 12];3(8):1341–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566138>
10. Yamaguchi S, Kobayashi H, Narita T, Kanehira K, Sonezaki S, Kubota Y, *et al*. Novel Photodynamic Therapy Using Water-dispersed TiO₂-Polyethylene Glycol Compound: Evaluation of Antitumor Effect on Glioma Cells and Spheroids *In Vitro*. Photochem Photobiol [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2020 Sep 12];86(4):964–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2010.00742.x>
11. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, Mahajan A, Agarwala V, Gaulton KJ, *et al*. The genetic architecture of type 2 diabetes. Nature [Internet]. 2016 Aug 11 [cited 2020 Jul 20];536(7614):41–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature18642>
12. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. Lancet [Internet]. 2017 Jun [cited 2020 Jun 2];389(10085):2239–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
13. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes *mellitus* and its complications. Nat Rev Endocrinol [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2020 Jun 2];14(2):88–98. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2017.151>
14. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. Lancet (London, England) [Internet]. 2016 Apr 9 [cited 2021 Apr 19];387(10027):1513–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
15. Basto-Abreu A, Barrientos-Gutiérrez T, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, López-Olmedo N, De la Cruz-Góngora V, *et al*. Prevalencia de diabetes y descontrol glucémico en México: Resultados de la Ensanut 2016. Salud Publica Mex [Internet]. 2020 Dec 20 [cited 2020 Jun 9];62(1):50–9. Available from:

<https://doi.org/10.21149/10752>

16. Meza R, Barrientos-Gutierrez T, Rojas-Martinez R, Reynoso-Noverón N, Palacio-Mejia LS, Lazcano-Ponce E, *et al.* Burden of type 2 diabetes in Mexico: Past, current and future prevalence and incidence rates. *Prev Med (Baltim)* [Internet]. 2015 Dec [cited 2020 Jun 9];81:445–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.10.015>
17. Arredondo A. Type 2 diabetes and health care costs in Latin America: Exploring the need for greater preventive medicine. *BMC Med* [Internet]. 2014 Aug 19 [cited 2020 Jun 9];12(1):136. Available from: <http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-014-0136-z>
18. Burke JP, Williams K, Haffner SM, Villalpando CG, Stern MP. Elevated incidence of type 2 diabetes in San Antonio, Texas, compared with that of Mexico City, Mexico. *Diabetes Care* [Internet]. 2001 Sep 1 [cited 2020 Jun 9];24(9):1573–8. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.24.9.1573>
19. Federation ID. IDF Diabetes Atlas, the Seventh Edition [Internet]. 7th ed. International Diabetes Federation, editor. International Diabetes Federation; 2015. 1–140 p. Available from: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>
20. Holt RIG. Progression of treatment strategies in type 2 diabetes. *US Endocrinol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2020 May 19];6(1):34–41. Available from: <http://www.touchendocrinology.com/articles/progression-treatment-strategies-type-2-diabetes>
21. Abdelmoneim AS, Eurich DT, Light PE, Senior PA, Seubert JM, Makowsky MJ, *et al.* Cardiovascular safety of sulphonylureas: Over 40years of continuous controversy without an answer. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2015 Jun 20 [cited 2020 Jun 12];17(6):523. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/dom.12456>
22. Monami M, Dicembrini I, Kundisova L, Zannoni S, Nreu B, Mannucci E. A meta-analysis of the hypoglycaemic risk in randomized controlled trials with sulphonylureas in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2014 Sep [cited 2020 Jun 12];16(9):833–40. Available from: www.clinicaltrials.gov.
23. Nathan DM, Buse JB, Kahn SE, Krause-Steinrauf H, Larkin ME, Staten M, *et al.* Rationale and Design of the Glycemia Reduction Approaches in Diabetes: A Comparative Effectiveness Study (GRADE). *Diabetes Care* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2020 Jun 12];36(8):2254–61. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc13-0356>
24. Kalra S, Bahendeka S, Sahay R, Ghosh S, Md F, Orabi A, *et al.* Consensus Recommendations on Sulfonylurea and Sulfonylurea Combinations in the Management of Type 2 Diabetes *Mellitus*-International Task Force. 2018 [cited 2020 Jun 12]; Available from: <http://www.ijem.in>
25. Grover M, Utreja P. Recent Advances in Drug Delivery Systems for Anti-Diabetic Drugs: A Review. *Curr Drug Deliv* [Internet]. 2014 Jan 18 [cited 2020 Jun 12];11(4):444–57. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1567-2018&volume=11&issue=4&page=444>
26. Zoungas S. ADVANCE in context: The benefits, risks and feasibility of providing intensive glycaemic

- control based on gliclazide modified release. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2020 Apr 6 [cited 2021 Feb 6];22(S2):5–11. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/dom.13968>
27. Lee YK, Song SO, Kim KJ, Cho Y, Choi Y, Yun Y, *et al.* Glycemic Effectiveness of Metformin-Based Dual-Combination Therapies with Sulphonylurea, Pioglitazone, or DPP4-Inhibitor in Drug-Naïve Korean Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Metab J* [Internet]. 2013 [cited 2020 Jun 12];37(6):465. Available from: <http://e-dmj.org>
 28. Vianna AGD, Lacerda CS, Pechmann LM, Polesel MG, Marino EC, Faria-Neto JR. A randomized controlled trial to compare the effects of sulphonylurea gliclazide MR (modified release) and the DPP-4 inhibitor vildagliptin on glycemic variability and control measured by continuous glucose monitoring (CGM) in Brazilian women with type 2 . *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2018 May [cited 2020 Jun 12];139:357–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.03.035>
 29. Srivastava A, Gowda D V., Kumar TMP, Rajasree PH, Shinde CG. Transdermal Drug Delivery of Glibenclamide Using Binary Polymeric Combination: *In Vitro* and Preclinical Studies. *J Biomater Tissue Eng* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2020 Jun 12];4(7):555–61. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=2157-9083&volume=4&issue=7&page=555>
 30. Zargar AH, Siraj M, Jawa AA, Hasan M, Mahtab H. Maintenance of glycaemic control with the evening administration of a long acting sulphonylurea in male type 2 diabetic patients undertaking the Ramadan fast. *Int J Clin Pract* [Internet]. 2010 Apr 30;64(8):1090–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-1241.2009.02262.x>
 31. Royal Society of Chemistry. Glibenclamide | C23H28ClN3O5S | ChemSpider [Internet]. 2015 [cited 2021 Apr 3]. Available from: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3368.html>
 32. Liu Z, Liu S, Zhou L, Gao X, Ju W, Tan H, *et al.* Effects of HuangKui capsules on glibenclamide pharmacokinetics in rats. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012 Jan 6 [cited 2020 Jul 25];139(1):1–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111001942>
 33. Skillman TG, Feldman JM. The pharmacology of sulfonylureas. *Am J Med* [Internet]. 1981 Feb 1 [cited 2020 Jul 10];70(2):361–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934381907737>
 34. Takla PG. Glibenclamide. *Anal Profiles Drug Subst Excipients*. 1981 Jan 1;10(C):337–55.
 35. Sola D, Rossi L, Schianca GPC, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, *et al.* State of the art paper Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2020 Jul 10];4(4):840–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26448036/>
 36. Rambiritch V. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Glibenclamide in Type 2 Diabetics. University of KwaZulu-Natal, Durban, South Africa; 2004.
 37. Wei H, Löbenberg R. Biorelevant dissolution media as a predictive tool for glyburide a class II drug. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2006 Sep [cited 2020 Jun 23];29(1):45–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098706001229>
 38. Wang Y, Yang W, Fu Q, Guo Z, Sun B, Liu W, *et al.* The role of particle size of glyburide crystals in

- improving its oral absorption. *Drug Deliv Transl Res* [Internet]. 2017 Jun [cited 2020 Jun 23];7(3):428–38. Available from: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/s13346-017-0378-3>
39. Coppack S, Lant A, McIntosh C, Rodgers A. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of glibenclamide in non- insulin dependent diabetes *mellitus*. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 1990 Jun [cited 2020 Jun 25];29(6):673–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.1990.tb03688.x>
 40. Feldman JM. Glyburide: A Second-generation Sulfonylurea Hypoglycemic Agent. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* [Internet]. 1985 Mar 4 [cited 2020 Jun 25];5(2):43–62. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1875-9114.1985.tb03404.x>
 41. Jaber LA, Antal EJ, Welshman IR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in young and elderly patients with non-insulin-dependent diabetes *mellitus*. *Ann Pharmacother*. 1996;30(5):472–5.
 42. Melander A, Donnelly R, Rydberg T. Is There a Concentration-Effect Relationship for Sulphonylureas? *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1998 [cited 2020 Feb 16];34(3):181–8. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-199834030-00001>
 43. Rashid A, Ahmad M, Minhas MU, Hassan IJ, Malik MZ. Pharmacokinetic studies of metformin and glibenclamide in normal human volunteers. *Pak J Pharm Sci*. 2014 Jan;27(1):153–9.
 44. Jönsson A, Chan JCN, Rydberg T, Vaaler S, Hallengren B, Cockram CS, *et al*. Effects and pharmacokinetics of oral glibenclamide and glipizide in Caucasian and Chinese patients with type-2 diabetes. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 2000 Dec 25 [cited 2020 Sep 7];56(9–10):711–4. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002280000214>
 45. Samala S, Veeresham C. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interaction of Boswellic Acids and Andrographolide with Glyburide in Diabetic Rats: Including Its PK/PD Modeling. *Phyther Res* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2020 Sep 7];30(3):496–502. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5556>
 46. Neerati P, Gade J. Influence of atorvastatin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in normal and diabetic rats. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2011 Feb [cited 2020 Sep 7];42(3):285–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928098710004173>
 47. Elbahwy IA, Ibrahim HM, Ismael HR, Kasem AA. Enhancing bioavailability and controlling the release of glibenclamide from optimized solid lipid nanoparticles. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2020 Sep 7];38:78–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.001>
 48. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes *mellitus*. *Diabet Med* [Internet]. 2005 Apr [cited 2020 Sep 8];22(4):359–70. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x>
 49. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* [Internet]. 1969 Nov 1 [cited 2020 Sep 8];48(11):2129–39. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/106180>
 50. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2008 Feb 18 [cited 2020 Sep 8];51(2):216–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-007-0886-7>
 51. Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 diabetes *mellitus* in

- laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med*. 2004;54(3):252–7.
52. Gribble FM, Reimann F. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2020 Jun 23];46(7):875–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-003-1143-3>
 53. Kreisberg RA. The second-generation sulfonylureas: Change or progress? Vol. 102, *Annals of Internal Medicine*. 1985. p. 125–6.
 54. Fofonka A, Bock PM, Casali KR, da Silveira AD, da Rosa FM, Berlanda G, *et al*. Impact of treatment with glibenclamide or vildagliptin on glucose variability after aerobic exercise in type 2 diabetes: A randomized controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2020 Jun 23];143:184–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168822718303644>
 55. Landersdorfer CB, Jusko WJ. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modelling in??*Diabetes Mellitus*. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2008 Sep 13 [cited 2020 Feb 16];47(7):417–48. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-200847070-00001>
 56. Louizos C, Yáñez JA, Forrest ML, Davies NM. Understanding the Hysteresis Loop Conundrum in Pharmacokinetic / Pharmacodynamic Relationships. *J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2014 Mar 10;17(1):34. Available from: <https://journals.library.ualberta.ca/jpps/index.php/JPPS/article/view/21028>
 57. Josa M, Urizar JP, Rapado J, Dios-Viéitez C, Castañeda-Hernández G, Flores-Murrieta F, *et al*. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of antipyretic and anti-inflammatory effects of naproxen in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(1):198–205.
 58. Derendorf H, Meibohm B. Modeling of PK/PD Relationships: Concepts and Perspectives. *Pharm Res*. 1999;16(2):1–10.
 59. Holford NHG, Sheiner LB. Understanding the Dose-Effect Relationship. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 1981;6(6):429–53. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00003088-198106060-00002>
 60. Krishna R, Yu L. Biopharmaceutics Applications in Drug Development [Internet]. Krishna R, Yu L, editors. Vol. 1, *Biopharmaceutics Applications in Drug Development*. Boston, MA: Springer US; 2008 [cited 2019 Sep 12]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-72379-2>
 61. Shargel L, Yu A. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 7th ed. Shargel L, Yu A, editors.
 62. Akers M. *Remington : Essentials of Pharmaceutics*, First Edition. Felton LA, editor. Vol. 26, *Essentials of Pharmaceutic*. Pharmaceutical Press; 2016.
 63. Rosenbaum S. *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations*. 1st ed. *Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics: an integrated textbook and computer simulations*. John Wiley & Sons, Inc.; 2011.
 64. Markovsky E, Baabur-Cohen H, Eldar-Boock A, Omer L, Tiram G, Ferber S, *et al*. Administration, distribution, metabolism and elimination of polymer therapeutics. *J Control Release* [Internet]. 2012 Jul [cited 2020 May 19];161(2):446–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911011473>
 65. Rowland M, Tozer TN, Rowland M, Derendorf H, Hochhaus G. *Clinical pharmacokinetics and*

pharmacodynamics : concepts and applications. [Internet]. 4th ed. Lippincott William & Wilkins; 2011. Available from:

<http://pbidi.unam.mx:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001280637&lang=es&site=eds-live>

66. Owens GJ, Singh RK, Foroutan F, Alqaysi M, Han C-M, Mahapatra C, *et al.* Sol–gel based materials for biomedical applications. *Prog Mater Sci* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Sep 12];77:1–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079642516000025>
67. Colilla M, Baeza A, Vallet-Regí M. Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery and Controlled Release Applications. In: *The Sol-Gel Handbook* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015 [cited 2020 Sep 12]. p. 1309–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527670819.ch42>
68. Argyo C, Weiss V, Bräuchle C, Bein T. Multifunctional Mesoporous Silica Nanoparticles as a Universal Platform for Drug Delivery. *Chem Mater* [Internet]. 2014 Jan 14 [cited 2020 Sep 12];26(1):435–51. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cm402592t>
69. Tang Q, Yao Xu, Dong Wu, Sun Y, Wang J, Jun Xu, *et al.* Studies on a new carrier of trimethylsilyl-modified mesoporous material for controlled drug delivery. *J Control Release* [Internet]. 2006 Aug [cited 2020 Sep 12];114(1):41–6. Available from: www.elsevier.com/locate/jconrel
70. Xu W, Gao Q, Xu Y, Wu D, Sun Y, Shen W, *et al.* Controllable release of ibuprofen from size-adjustable and surface hydrophobic mesoporous silica spheres. 2008;
71. Mamaeva V, Sahlgren C, Lindén M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013 May [cited 2020 Sep 12];65(5):689–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.018>
72. Ghosh S. Mesoporous Silica-Based Nano Drug-Delivery System Synthesis, Characterization, and Applications. In: Mohapatra SS, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra RK, Thomas S, editors. *Nanocarriers for Drug Delivery* [Internet]. 1st ed. Nueva Dehli, India: Elsevier; 2019. p. 285–317. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-8.00009-6>
73. Chen C, Zheng H, Xu J, Shi X, Li F, Wang X. Sustained-release study on Exenatide loaded into mesoporous silica nanoparticles: *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. *DARU J Pharm Sci* [Internet]. 2017 Dec 4 [cited 2020 May 19];25(1):20. Available from: <http://link.springer.com/10.1186/s40199-017-0186-9>
74. Lang Y, Finn DP, Pandit A, Walsh PJ. Pharmacological activity of ibuprofen released from mesoporous silica. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2012 Jan 22 [cited 2020 May 19];23(1):73–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-011-4488-z>
75. Guo Y, Gou K, Yang B, Wang Y, Pu X, Li S, *et al.* Enlarged Pore Size Chiral Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded Poorly Water-Soluble Drug Perform Superior Delivery Effect. *Molecules* [Internet]. 2019 Sep 30 [cited 2020 May 19];24(19):3552. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/19/3552>
76. Mellaerts R, Mols R, Jammaer JAG, Aerts CA, Annaert P, Van Humbeeck J, *et al.* Increasing the oral

- bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2008 May [cited 2020 Sep 12];69(1):223–30. Available from: www.elsevier.com/locate/ejpb
77. Pednekar PP, Godiyal SC, Jadhav KR, Kadam VJ. Mesoporous silica nanoparticles: a promising multifunctional drug delivery system. In: Fica A, Grumezescu AM, editors. *Nanostructures for Cancer Therapy* [Internet]. 1st ed. Bucarest, Rumania: Elsevier; 2017. p. 593–621. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3/00023-4>
 78. Jia L, Shen J, Li Z, Zhang D, Zhang Q, Liu G, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of paclitaxel-loaded mesoporous silica nanoparticles with three pore sizes. *Int J Pharm* [Internet]. 2013 Mar [cited 2020 May 19];445(1–2):12–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.058>
 79. Pattnaik S, Swain K. Mesoporous nanomaterials as carriers in drug delivery. In: Inamuddin, Asiri A, Ali M, editors. *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery* [Internet]. 1st ed. Chennai, India: Elsevier; 2018. p. 589–604. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00025-X>
 80. Popovici RF, Alexa IF, Novac O, Vranceanu N, Popovici E, Lupusoru CE, *et al.* Pharmacokinetics study on mesoporous silica-captopril controlled release systems. *Dig J Nanomater Biostructures*. 2011;6(4):1619–30.
 81. He Q, Zhang J, Shi J, Zhu Z, Zhang L, Bu W, *et al.* The effect of PEGylation of mesoporous silica nanoparticles on nonspecific binding of serum proteins and cellular responses. *Biomaterials* [Internet]. 2010 Feb [cited 2020 May 28];31(6):1085–92. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961209011673>
 82. Weiser JR, Saltzman WM. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *J Control Release* [Internet]. 2014 Sep [cited 2020 May 19];190:664–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.048>
 83. Wright DFB, Winter HR, Duffull SB. Understanding the time course of pharmacological effect: a PKPD approach. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2020 Feb 16];71(6):815–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.2011.03925.x>
 84. Macheras P, Iliadis A. Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics [Internet]. *Modeling in Biopharmaceutics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics*. New York: Springer-Verlag; 2006 [cited 2020 May 19]. (Interdisciplinary Applied Mathematics; vol. 30). Available from: <http://www.springer.com/series/1390>
 85. Csajka C, Verotta D. Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modelling: History and Perspectives. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* [Internet]. 2006 Jun 11;33(3):227–79. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10928-005-9002-0>
 86. Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S, Miller RD, Ham J. Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: Application to d -tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1979 Mar 1 [cited 2021 Mar 25];25(3):358–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cpt1979253358>
 87. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de

- laboratorio. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, editor. Ciudad de México, México: Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación; 1999.
88. Vázquez-Olvera JI. Evaluación del efecto de la solubilidad de polimorfos de glibenclamida en su capacidad de incorporación en implantes fabricados por la técnica sol-gel. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 89. Serrano-Peralta BA. Desarrollo de un Método Analítico por CLAR para cuantificar Glibenclamida en plasma de ratón. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 90. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL, REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN, USE. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). 2005.
 91. National Centre for the Replacement R& R of A in R. Rat: Temporary cannula (non-surgical) | NC3Rs [Internet]. [cited 2021 Apr 3]. Available from: <https://nc3rs.org.uk/rat-temporary-cannula-non-surgical-updated>
 92. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11th ed. Mexicanos CP de la F de los EU, editor. Ciudad de México, México: Secretaría de Salud; 2014.
 93. Trinder P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. Ann Clin Biochem Int J Lab Med [Internet]. 1969 Jan 29 [cited 2021 Apr 3];6(1):24–7. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/000456326900600108>
 94. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. 2002nd ed. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, editor. Ciudad de México, México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 2002.
 95. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. [Internet]. 2013 [cited 2021 Apr 4]. Available from: http://transparencia.guanajuato.gob.mx/bibliotecadigital/mot/FraccionI/SSG-ISAPEG/NOM_177_SSA1_2013.pdf
 96. Hernández-Abad VJ, Sánchez-González EG, Espinosa-Contreras C, Marroquín-Segura R, Mora-Guevara JLA, Flores-Cabrera Y. Controlled release of glibenclamide from monolithic silica subdermal implants produced by the sol-gel process and its use for hyperglycaemia treatment in a murine model.

- Mater Sci Eng C [Internet]. 2019 Jan [cited 2020 Oct 27];94:1009–19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.050>
97. Gudeppu M, Balasubramanian J, Bakthavachalam P, Chokkalingam L, Timiri Shanmugam PS. Biocompatibility and Toxicology. In: Shanmugam P, Bakthavachalam P, Chokkalingam L, editors. Trends in Development of Medical Devices [Internet]. 1st ed. California, United States: Elsevier; 2020. p. 99–133. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-820960-8.00007-1>
 98. Saini M. Implant biomaterials: A comprehensive review. World J Clin Cases [Internet]. 2015 [cited 2020 Dec 23];3(1):52. Available from: [/pmc/articles/PMC4295219/?report=abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4295219/?report=abstract)
 99. Kojima K, Sakaguchi K. Biological evaluation and regulation of medical devices in Japan. In: Boutrand J, editor. Biocompatibility and Performance of Medical Devices [Internet]. 2nd ed. Kidlington, Reino Unido: Elsevier; 2020. p. 441–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102643-4.00018-5>
 100. Raghavendra GM, Varaprasad K, Jayaramudu T. Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications. In: Thomas S, Grohens Y, Ninan N, editors. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering [Internet]. 1st ed. Oxford, Reino Unido: Elsevier; 2015 [cited 2020 Dec 23]. p. 21–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323328890000029>
 101. Gvishi R. Monolithic Sol-Gel Materials. In: Levy DZM, editor. The Sol-Gel Handbook [Internet]. 1st ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2015. p. 317–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527670819.ch10>
 102. Mitran R-A, Deaconu M, Matei C, Berger D. Mesoporous Silica as Carrier for Drug-Delivery Systems. In: Mohapatra S, Ranjan S, Dasgupta N, Mishra R, Thomas S, editors. Nanocarriers for Drug Delivery [Internet]. 1st ed. Oxford, Reino Unido: Elsevier; 2019. p. 351–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-8.00011-4>
 103. Bruschi ML, editor. Mathematical models of drug release. In: Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems [Internet]. 2nd ed. Oxford, Reino Unido: Elsevier; 2015 [cited 2020 Oct 24]. p. 63–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
 104. Viitala R, Jokinen M, Rosenholm JB. Mechanistic studies on release of large and small molecules from biodegradable SiO₂. Int J Pharm [Internet]. 2007 May [cited 2020 Oct 27];336(2):382–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306010672>
 105. Parfenyuk E V., Dolinina ES. Development of Novel Warfarin-Silica Composite for Controlled Drug Release. Pharm Res [Internet]. 2017 Apr 30 [cited 2020 Oct 27];34(4):825–35. Available from: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/s11095-017-2111-9>
 106. Manzano M. Ceramics for Drug Delivery. In: Vallet-Regí M, editor. Bio-Ceramics with Clinical Applications [Internet]. 1st ed. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 343–82. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118406748.ch12>
 107. Rodríguez Cruz MS, González Alonso I, Sánchez-Navarro A, Sayalero Marinero ML. *In vitro* study of the interaction between quinolones and polyvalent cations. Pharm Acta Helv [Internet]. 1999 Feb [cited 2020 Oct 28];73(5):237–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031686598000296>

108. Costa FO, Sousa JJS, Pais AACC, Formosinho SJ. Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *J Control Release* [Internet]. 2003 Apr [cited 2020 Oct 28];89(2):199–212. Available from: www.elsevier.com/locate/jconrel
109. Podczek F. Comparison of *in vitro* dissolution profiles by calculating mean dissolution time (MDT) or mean residence time (MRT). *Int J Pharm* [Internet]. 1993 Aug [cited 2020 Oct 28];97(1–3):93–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0378517393901294>
110. Dostalek M, Akhlaghi F, Puzanovova M. Effect of Diabetes *Mellitus* on Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drugs. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2012 Aug [cited 2020 May 19];51(8):481–99. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/11631900-000000000-00000>
111. Poretsky L. Principles of Diabetes *Mellitus* [Internet]. 3rd ed. Poretsky L, editor. Principles of Diabetes *Mellitus*: Third Edition. Cham: Springer International Publishing; 2017. 215–238 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-18741-9>
112. Lixoft. Monolix Methodology [Internet]. 2014 [cited 2021 Apr 5]. Available from: <http://lixoft.com/wp-content/uploads/2016/03/monolixMethodology.pdf>
113. Jönsson A, Rydberg T, Melander A, Sterner G. Pharmacokinetics of glibenclamide and its metabolites in diabetic patients with impaired renal function. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 1998 Mar 6 [cited 2020 Jul 20];53(6):429–35. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s002280050403>
114. Kellner HM, Christ O, Rupp W, Heptner W. Resorption, distribution and excretion after administration of 14C-labelled HB 419 in rabbits, rats and dogs. *Arzneimittelforschung*. 1969 Aug;19(8):Suppl:1388+.
115. Kuhlmann J, Puls W, editors. Oral Antidiabetics [Internet]. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. 468–469 p. (Handbook of Experimental Pharmacology; vol. 119). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-09127-2>
116. Pearson JG. Pharmacokinetics of glyburide. *Am J Med* [Internet]. 1985 Sep 20 [cited 2020 Jun 23];79(3):67–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934385800103>
117. Rydberg * T, Jonsson A, Karlsson MO, Melander A. Concentration-effect relations of glibenclamide and its active metabolites in man: modelling of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2020 Feb 17];43(4):373–81. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2125.1997.00571.x>
118. Abd Elaziz MA, Al-Dhawalie AA, Tekle A. The effect of stress on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glibenclamide in diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* [Internet]. 1998 Sep [cited 2021 Jan 31];23(3):371–6. Available from: <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/article/10.1007/BF03192296>
119. Loftsson T. Drug Pharmacokinetics After Alternative Routes of Administration. In: Essential Pharmacokinetics [Internet]. Elsevier; 2015. p. 105–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128014110000044>
120. Harrower A. Gliclazide modified release: From once-daily administration to 24-hour blood glucose control. *Metabolism* [Internet]. 2000 Oct [cited 2021 Feb 6];49(10):7–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049500800864>

121. Crepaldi G, Fioretto P. Gliclazide modified release: Its place in the therapeutic Armamentarium. *Metabolism* [Internet]. 2000 Oct [cited 2021 Feb 6];49(10):21–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002604950080089X>
122. Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J, He M. [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010;39(2):133–7.
123. Qinna N, Badwan A. Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2015 May 5 [cited 2020 Feb 3];9:2515. Available from: <http://www.dovepress.com/impact-of-streptozotocin-on-altering-normal-glucose-homeostasis-during-peer-reviewed-article-DDDT>
124. Maheandiran M, Mylvaganam S, Wu C, El-Hayek Y, Sugumar S, Hazrati L, *et al*. Severe hypoglycemia in a juvenile diabetic rat model: Presence and severity of seizures are associated with mortality. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 30 [cited 2020 Nov 27];8(12):83168. Available from: </pmc/articles/PMC3875447/?report=abstract>
125. Hernández-Abad VJ, Sánchez-González EG. Introducción a la validación de métodos analíticos para el laboratorio farmacéutico de control de calidad. 1st ed. FES Zaragoza, editor. Ciudad de México, México: UNAM; 2017. 198 p.

10 Anexos

10.1 Anexo 1. Validación de los métodos analíticos

Los parámetros de validación de los métodos analíticos fueron evaluados estadísticamente, ya sea mediante cálculo manual en el programa Microsoft Excel, versión 16, empleando las fórmulas adecuadas para el cálculo de los estadígrafos, así como para la toma de decisión e interpretación correspondiente en cada caso ¹²⁵ Los parámetros de Linealidad y Precisión intermedia fueron calculados con el apoyo del programa SPSS Statistics, versión 23. Por ello, se presenta en todos los casos el criterio basado en el valor del estadígrafo calculado, independientemente de haber contado o no con un valor-p.

10.1.1 Especificidad

La especificidad, medida de la capacidad del método para discriminar inequívocamente al analito de las interferencias debidas a la matriz analítica, se estableció o descartó con base en el valor de la diferencia entre la media de una muestra de determinaciones correspondientes al valor central y la media de una muestra de determinaciones correspondientes al valor central adicionadas con la interferencia. Para establecer la especificidad del método, la decisión estadística debió ser la de aceptar la hipótesis nula.

Siendo la hipótesis nula

$$H_0: \mu_A = \mu_O$$

y la hipótesis alterna

$$H_1: \mu_A \neq \mu_O$$

Donde μ_A es la media poblacional de las determinaciones de muestras analíticas adicionadas con la interferencia y μ_O es la media poblacional de las determinaciones de muestras analíticas correspondientes con el nivel central.

Para la comparación de medias de muestras independientes, se calculó el estadígrafo de prueba t de Student, de acuerdo con la Ecuación A1.1.

$$t = \frac{\bar{y}_A - \bar{y}_O}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_A} + \frac{1}{n_O}}}$$

Ecuación A1.1. Cálculo del estadígrafo para la comparación de medias de muestras independientes.

Donde $\bar{y}_A$ y $\bar{y}_O$ son los valores de la media de la muestra de las determinaciones correspondientes a muestras analíticas adicionadas con la interferencia y de la media de éstas, pero sin la adición de la interferencia (es decir, las originales), respectivamente; S_p es la desviación estándar ponderada de las muestras; n_A y n_O son el número de determinaciones correspondientes a muestras analíticas adicionadas con la interferencia y el de éstas, pero sin la adición de la interferencia (es decir, las originales), respectivamente.

La hipótesis nula no se rechazó si tras la prueba se cumplió el criterio de la Ecuación A1.2.

$$|t| < t_{\alpha, n_A + n_O - 2}$$

Ecuación A1.2. Criterio de no rechazo de la hipótesis nula para la comparación de medias de muestras independientes.

Donde t es el estadígrafo t de Student calculado, $t_{\alpha, n_A + n_O - 2}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α , que es el valor de significancia, así como n_A y n_O .

10.1.2 Linealidad

La linealidad, medida de la capacidad del método para brindar determinaciones proporcionales a la variable de la concentración del analito presente en las muestras analíticas, se estableció o descartó mediante la interpretación de los valores obtenidos para los parámetros del modelo estadístico de regresión lineal, evaluado mediante el método de los mínimos cuadrados. Para establecer la linealidad del método, las decisiones estadísticas debieron ser 1) no rechazar la hipótesis nula del parámetro β_0 (ordenada al origen o constante), 2) rechazar la hipótesis nula del parámetro β_1 (pendiente) y 3) rechazo de la hipótesis nula del parámetro r^2 (coeficiente de

determinación).

Para β_0 ,

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0$$

Para β_1 ,

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Para r^2

$$H_0: r^2 = 0$$

$$H_1: r^2 \neq 0$$

En el paquete estadístico se llevó a cabo análisis de regresión lineal simple. El análisis en cuestión presenta los valores calculados del estadígrafo t de Student para la evaluación de los parámetros β_0 y β_1 y el valor calculado del estadígrafo de F de Fischer. La hipótesis nula del parámetro β_0 no se rechazó si se cumplió el criterio de la Ecuación A1.3; la del parámetro β_1 se rechazó si se cumplió el criterio de la Ecuación A1.4 y la del parámetro r^2 se rechazó si se cumplió el criterio de la Ecuación A1.5.

$$|t| < t_{\alpha, n-2}$$

Ecuación A1.3. Criterio de no rechazo de la hipótesis nula para evaluación del parámetro β_0

$$|t| > t_{\alpha, n-2}$$

Ecuación A1.4. Criterio de rechazo de la hipótesis nula para evaluación del parámetro β_1

$$F > F_{\frac{\alpha}{2}, g.l.reg, g.l.err} ; \text{ o bien, } F < \frac{1}{F_{\frac{\alpha}{2}, g.l.reg, g.l.err}}$$

Ecuación A1.5. Criterio de rechazo de la hipótesis nula para evaluación del parámetro r^2

Donde t es el estadígrafo t de Student calculado, $t_{\alpha, n-2}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α , que es el

valor de significancia, así como n , que es el número de determinaciones; F es el estadígrafo calculado de Fischer; $F_{\frac{\alpha}{2}, g.l.reg, g.l.err}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α y los valores de $g.l.reg$, que son los grados de libertad debidos a la regresión y de $g.l.err$, que son los debidos al error (residuo).

10.1.3 Repetibilidad

La repetibilidad, medida del grado de dispersión de las determinaciones analíticas obtenidas mediante el análisis múltiple de una sola muestra analítica empleando el método analítico sin modificaciones en su diseño y condiciones, se estableció o descartó con base en el valor de la desviación estándar relativa (%DE) de las determinaciones de cada nivel de concentración. Para establecer la repetibilidad del método, la decisión estadística debió ser el no rechazo de la hipótesis nula

Siendo la hipótesis nula

$$H_0: \sigma^2 \leq 0.02\mu$$

y la hipótesis alterna

$$H_1: \sigma^2 > 0.02\mu$$

Donde σ^2 y μ son la varianza y la media, respectivamente, poblacionales de las determinaciones analíticas.

Para la toma de decisión estadística se calculó el estadígrafo de prueba chi cuadrada (χ^2), de acuerdo con la Ecuación A1.6.

$$\chi^2 = \frac{s^2(n-1)}{\sigma^2}$$

Ecuación A1.6. Cálculo del estadígrafo para la prueba límite de la varianza.

Donde s^2 es el valor de la varianza de la muestra de las determinaciones analíticas y n el número de estas.

La hipótesis nula no se rechazó si tras la prueba se cumplió el criterio de la Ecuación A1.7.

$$\chi^2 < \chi^2_{1-\alpha, n-1}$$

Ecuación A1.7. Criterio de no rechazo de la hipótesis nula para la evaluación del parámetro σ^2 .

Donde χ^2 es el estadígrafo calculado, $\chi^2_{1-\alpha, n-1}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α y de n .

10.1.4 Precisión intermedia

La precisión intermedia, medida del grado de dispersión de las determinaciones analíticas obtenidas mediante el análisis múltiple de una sola muestra analítica empleando el método analítico variando condiciones de operación lógicas, se estableció o descartó con base en el análisis de varianza de los porcentajes de recobro (por interpolación en la curva de calibración correspondiente) de las determinaciones analíticas obtenidas variando dos factores de operación lógicos, esto es, analista (dos) y día de análisis (dos). Para establecer la precisión intermedia del método, la decisión estadística debió ser el no rechazo de las hipótesis nulas correspondientes a la igualdad entre analistas, días y su intersección.

Para el factor analista (A),

$$H_0: A_1 = A_2$$

$$H_1: A_1 \neq A_2$$

Para el factor día (D),

$$H_0: D_1 = D_2$$

$$H_1: D \neq D_2$$

Para la intersección entre factores

$$H_0: A_1D_1 = A_2D_2 = A_1D_2 = A_2D_1$$

$$H_1: \text{"al menos algún término } A_iD_j \text{ es diferente"}$$

En el paquete estadístico se llevó a cabo un análisis de varianza de dos factores. El análisis en cuestión presenta los valores calculados del estadígrafo F de Fischer para la evaluación de la significancia de cada factor en las determinaciones analíticas. Las

hipótesis nulas no se rechazaron si cumplieron con el criterio de la Ecuación A1.8.

$$F_{\frac{\alpha}{2}, g.l. fac, g.l. err} > F > \frac{1}{F_{\frac{\alpha}{2}, g.l. fac, g.l. err}}$$

Ecuación A1.8. Criterio de no rechazo de la hipótesis nula para la evaluación de los factores en el análisis de varianza.

Donde F es el estadígrafo calculado de Fischer; $F_{\frac{\alpha}{2}, g.l. fac, g.l. err}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α y los valores de $g.l. fac$, que son los grados de libertad debidos factor evaluado y de $g.l. err$, que son los debidos al error (residuo).

10.1.5 Exactitud

La exactitud, medida como el grado de concordancia entre el valor que es aceptado como verdadero, fue establecida o descartada, para cada nivel de concentraciones, con base en la diferencia entre la media de los porcentajes de recobro (obtenidos por interpolación en la curva de calibración correspondiente) de las determinaciones analíticas y el valor nominal aceptado (100 %). Para establecer exactitud del método, la decisión estadística debió ser el no rechazo de la hipótesis nula.

Siendo la hipótesis nula

$$H_0: \mu = 100$$

y la hipótesis alterna

$$H_1: \mu \neq 100$$

Donde μ es la media poblacional de los porcentajes de recobro de las determinaciones analíticas.

Para la toma de decisión estadística se calculó el estadígrafo de prueba t de Student, de acuerdo con la Ecuación A1.9.

$$t = \frac{\bar{y} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Ecuación A1.9. Cálculo del estadígrafo para la prueba de igualdad de la media

Donde s y $\bar{y}$ son el valor de la desviación estándar y media, respectivamente, de la muestra de los porcentajes de recobro de las determinaciones analíticas y n el número de estos.

La hipótesis nula no se rechazó si tras la prueba se cumplió el criterio de la Ecuación A1.10.

$$|t| < t_{\alpha, n-1}$$

Ecuación A1.10. Criterio de no rechazo de la hipótesis nula para la evaluación del parámetro μ .

Donde t es el estadígrafo calculado, $t_{\alpha, n-1}$ es el valor del estadígrafo obtenido desde la distribución correspondiente, considerando el valor de α y de n .

10.1.6 Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC)

Con base en el cociente señal/ruido de determinaciones analíticas, correspondientes a: 1) nivel mínimo establecido en la curva de calibración; 2) el valor de concentración equivalente al 20 % del nivel mínimo de la curva de calibración y 3) el valor de concentración equivalente a no menos del 2 % y no más del 10 % del nivel mínimo de la curva de calibración, se establecieron los límites de detección y de cuantificación según el criterio de la Ecuación A1.11.

$$\text{En el LD, } \frac{ABCC_a}{ABCC_r} \geq 2.0$$

$$\text{En el LC, } \frac{ABCC_a}{ABCC_r} \geq 3.0$$

Ecuación A1.11. Criterio para establecer los límites de detección y de cuantificación.

Donde $ABCC_a$ es el valor de integración del pico cromatográfico correspondiente a la muestra que contiene al analito y $ABCC_r$ el valor de integración de la línea base sobre la que se encuentra resuelto el pico cromatográfico del analito.