



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**"BIOEQUIVALENCIA DE DIFERENTES  
FORMAS FARMACEUTICAS DE  
NORETINDRONA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN FARMACIA  
(BIOFARMACIA)  
P R E S E N T A  
Q.F.B. LETICIA GPE. YAÑEZ ESTRADA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE        Dra. Ofelia Espejo  
SECRETARIO        Dr. Rafael Castillo  
1er VOCAL         M. en C. Juan Manuel Rodríguez  
SUPLENTE         M. en C. Helgui Yung Cook  
SUPLENTE         Dr. Enrique Pinzón

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

SUSTENTANTE

  
-----  
Q.F.B. Leticia Gpe. Yáñez Estrada

ASESOR DE TESIS

  
-----  
M. en C. Helgui Yung Cook

ASESOR EXTERNO

  
-----  
Dr Vicente Díaz Sánchez

Aquél quien ama tan solo a las personas cercanas a él,  
conoce únicamente un color y que tristeza me causa  
porque jamás apreciará la belleza del arcoiris.

con amor a Fernando

La mujer en nuestro País juega un papel importante; el ser Madre. Más nuestra sociedad presente ya no requiere celebrar un 10 de Mayo ó un 12 de Diciembre. Los Mexicanos necesitamos borrar la represión que aún existe, a las ideas de la mujer.

La mujer debe de terminar su papel de dependencia y olvidar su temor a la soledad, necesita salir de la trampa, que es el pensar que el hombre tiene el derecho de borrar su ideal.

La mujer deberá aprender a gritar y será entonces cuando se le pueda escuchar. No se debe caer en falsos desfiles pro-liberación femenina, tendrá que compartir y luchar - al lado de los hombres.

Se necesitan hombres y mujeres que marchen juntos, que piensen juntos y entonces crear una ideología nueva con la fuerza del hombre, la tranquilidad y mesura de la mujer y el ímpetu de ambos.

Que nazca una sociedad donde la igualdad y justicia no sea derecho exclusivo de unos cuantos.

Leticia

¿Dónde está ?

el grito contra la injusticia  
la mano que trabaja por la igualdad  
el amor de los unos y los otros  
la poesía con la sangre de los caídos  
la razón  
la ciencia para el progreso de la humanidad y no para  
la ambición  
la ciencia que ayude a la independencia científico-tecnológica de nuestro País  
la ciencia para los pobres y marginados  
el estudiante que ha olvidado el egoísmo  
el idealismo de la juventud  
la prudencia de los adultos  
tu deseo de vivir

Seguirán las preguntas, seguirán los errores,  
y cuando no existan amaneceres que alumbren la vida,  
el hombre llorará porque él marchitó las flores.

Leticia

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Vicente Díaz Sánchez por su invaluable apoyo y -  
guía en el desarrollo Clínico de esta Tesis, por su amistad.

A la M. en C. Helgui Yung Cook por sus enseñanzas, asesoría  
y discusión de los resultados obtenidos.

Al Dr. Josué Garza Flores por compartir sus conocimientos  
conmigo.

A los Doctores Ofelia Espejo, Rafael Castillo y Enrique Pin-  
zón así como al M. en C. Juan Manuel Rodríguez, por la revi-  
sión del presente trabajo.

A la Enfermera Juanita Arias por su ayuda en la toma de las  
muestras sanguíneas.

Al Departamento de Q. Analítica de la D.E. de Pg. de la Fac.  
de Química de la U.N.A.M., por la obtención de los espectros  
de absorción al ultravioleta e infrarojo.

A Berta Chávez por la asesoría en la obtención del radio-  
cromatograma.

A Chelo por su excelente ayuda en el lavado del material.

A los voluntarios, cuya participación hizo posible la reali-  
zación de este trabajo.

A Tere Robledo y Alejandra Diep por la transcripción del ma-  
nuscrito de esta Tesis.

A Celina Moreno por su colaboración en la elaboración de  
las figuras del presente trabajo.

A la SEP por la beca otorgada para llevar a cabo los crédi-  
tos de la Maestría.

A CONACYT mi agradecimiento por la Beca-Tesis otorgada y el financiamiento recibido para la realización de este trabajo, bajo el proyecto PCSABNA 21601.

A Marta, Rosi, Ricardo, Pablo y Jesús por su sincera amistad y los momentos compartidos.

A todos los miembros del Departamento de Biología de la Reproducción y de la Clínica de Planificación Familiar del I. N.N.S.Z. y a mis amigos de la División de Estudios de Posgrado de la Fac. de Química de la U.N.A.M., por brindarme su amistad.

A mis Papás y hermanos por su cariño y apoyo.

## CONTENIDO

Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Esquemas	xiv
Lista de Figuras	xv
Lista de Tablas	xvii
Lista de Apéndices	xix
Resumen en Español	xx
Resumen en Inglés	xxi
I. Introducción y objetivos	1
II. Antecedentes	4
2.1 Anticonceptivos orales .....	5
2.1.1 Antecedentes históricos .....	5
2.1.2 Farmacología de los anticonceptivos orales .....	6
2.1.3 Mecanismo de acción de los anticonceptivos orales .....	8
2.1.4 Tipos de anticonceptivos orales .....	10
2.1.5 Efectos secundarios de los anticonceptivos orales .....	11
2.2 Generalidades sobre Noretindrona (Net) .....	14
2.2.1 Antecedentes .....	14
2.2.2 Características generales y propiedades fisicoquímicas de Net .....	16
2.2.3 Mecanismo de acción .....	18
2.2.4 Efectos secundarios .....	19
2.2.5 Farmacocinética .....	21
2.2.5a) Absorción .....	21
2.2.5b) Distribución .....	22
2.2.5c) Metabolismo .....	22
2.2.5d) Excreción .....	25
2.2.5e) Biodisponibilidad .....	26

2.2.5f) Interacción de la Noretindrona con fármacos .....	28
2.2.6 Estudios farmacocinéticos en voluntarios clínicamente sanos	30
2.3 Formulaciones de Liberación Sostenida	34
2.3.1 Introducción .....	34
2.3.2 Ventajas y desventajas de las formulacio- nes de liberación sostenida .....	35
2.3.3 Tipos de sistemas de liberación sostenida.	36
2.3.3a) Implantes subdérmicos .....	36
2.3.3b) Formas de dosificación oral .....	38
2.3.3c) Formulaciones intramusculares de liberación sostenida .....	39
2.3.4 Aplicaciones Clínicas de las formulaciones de liberación sostenida	40
2.3.4a) Enfermedades oculares	40
2.3.4b) Aplicación dental	40
2.3.4c) Inmunización	40
2.3.4d) Cáncer .....	41
2.3.4e) Antagonistas narcóticos	41
2.3.4f) Diabetes	41
2.3.4g) Artritis .....	41
2.3.4h) Anticonceptivos	41

### III. Parte Experimental

3.1 Determinación de la pureza de Net utilizada	46
3.1.1 Equipo	46
3.1.2 Reactivos .....	46
3.1.3 Métodos empleados para determinar la pure- za de Net .....	46
3.1.3a) Punto de fusión .....	46
3.1.3b) Cromatografía en capa fina .....	46
3.1.3c) Espectro de absorción ultravioleta	46
3.1.3d) Espectro de absorción al infraro- jo	46

3.2	Desarrollo de la formulación que se propone de liberación sostenida y de la formulación control	47
3.2.1	Equipo	47
3.2.2	Reactivos	47
3.2.3	Desarrollo de la formulación de liberación sostenida (NET:COLEST:LACT)	47
3.2.4	Desarrollo de la formulación control (NET:LACT)	48
3.2.5	Llenado de las cápsulas	48
3.3	Control químico de calidad de las diferentes formulaciones elaboradas	50
3.3.1	Método analítico para la cuantificación de Net en las formulaciones	50
3.3.1a)	Curva patrón	50
3.3.1b)	Procedimiento	50
3.3.2	Determinación del contenido de Net en la formulación de referencia (Dianor <sup>R</sup> , Syntex tabletas a granel)	50
3.3.3	Variación de peso de las cápsulas vacías, llenas y de las tabletas	50
3.4	Método analítico para la cuantificación de No-retindrona en suero	51
3.4.1	Equipo	51
3.4.2	Reactivos	51
3.4.3	Soluciones de trabajo empleadas	52
3.4.4	Descripción del método analítico	53
3.4.4.1	Dilución de trabajo del anticuerpo	54
a)	Preparación de las diluciones del anticuerpo	54
b)	Preparación de las concentraciones del antígeno no radiactivo	54
c)	Ensayo	54
3.4.4.2	Límites de sensibilidad y linealidad de la curva dosis-respuesta	56
a)	Preparación de los estándares de Net	56
b)	Determinación de la linealidad y <u>sen</u>	

sibilidad .....	57
3.4.4.3 Cantidad de radiactividad del antígeno marcado .....	57
a) Determinación de la pureza de 6,7 <sup>3</sup> H-NET .....	57
b) Preparación de las concentraciones del antígeno radiactivo .....	58
c) Ensayo .....	58
3.4.4.4 Tiempo y temperatura de incuba - ción para la formación del comple <u>o</u> antígeno-anticuerpo .....	59
3.4.4.5 Tratamiento de las muestras antes de su cuantificación .....	59
a) Descripción del método directo	59
b) Descripción del método de extracción..	59
c) Determinación del porcentaje de recu- peración de extracción .....	59
3.4.5 Descripción del ensayo para cuantificar Net en suero por radioinmunoanálisis (RIA)	60
3.4.6 Control de calidad del RIA de Net .....	60
3.4.6a) Preparación de las muestras de control de calidad .....	61
3.4.6b) Evaluación de las muestras de con <u>tr</u> ol de calidad .....	61
3.5 Estudio de bioequivalencia de las diferentes formulaciones de Net en voluntarios clínicamen <u>te</u> sanos .....	62
3.5.1 Formulaciones .....	62
3.5.2 Población de estudio .....	62
3.5.3 Diseño experimental .....	62

#### IV. RESULTADOS

4.1 Determinación de la pureza de Net utilizada ...	65
4.1.1 Punto de fusión .....	65

4.1.2	Cromatografía en capa fina .....	65
4.1.3	Espectro de absorción ultravioleta .....	65
4.1.4	Espectro de absorción al infrarojo .....	65
4.2	Determinación de la pureza de Net después del proceso de fundición .....	68
4.3	Control químico de las diferentes formulaciones de Net .....	71
4.3.1	Método analítico para cuantificar Net en las formulaciones .....	71
4.3.1a)	Curva patrón de Net en etanol ...	71
4.3.1b)	Contenido promedio de Net en la formulación experimental, Net:Colest: Lact .....	71
4.3.1c)	Contenido promedio de Net en la formulación control, Net:Lact ..	71
4.3.1d)	Contenido promedio de Net en el producto comercial, Dianor <sup>R</sup> .....	71
4.3.2	Variación de peso de las diferentes for- mulaciones de Net .....	75
4.4	Optimización del método analítico .....	77
4.4.1	Dilución de trabajo del anticuerpo .....	77
4.4.2	Determinación de la pureza de 6,7 <sup>3</sup> H-NET	77
4.4.3	Validación de la curva dosis-respuesta de Noretindrona en suero utilizando el método de radioinmunoanálisis .....	77
4.4.4	Validación de la curva dosis-respuesta linearizada de Noretindrona .....	81
4.4.5	Control de calidad del radioinmunoaná- lisis de Net .....	81
4.5	Estudio de bioequivalencia de las diferentes formulaciones farmacéuticas de Noretindrona en voluntarios clínicamente sanos .....	87

4.5.1 Población de estudio	87
4.5.2 Diseño experimental .....	87
4.5.3 Perfiles de Net en suero con respecto al tiempo	87
V DISCUSION DE RESULTADOS	
5.1 Determinación de la pureza de Net antes y después del proceso de fundición .....	97
5.2 Control químico de las diferentes formulaciones de Net .....	98
5.3 Optimización del método analítico .....	100
5.3.1 Dilución de trabajo del anticuerpo .....	100
5.3.2 Validación de la curva dosis-respuesta de Net en suero .....	100
5.3.3 Validación de la curva dosis-respuesta linealizada de Net en suero .....	102
5.3.4 Control de calidad del radioinmunoanálisis de Net .....	103
5.4 Estudio de bioequivalencia de las diferentes formulaciones de Net en voluntarios clínicamente sanos .....	104
VI CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA .....	112
VII APENDICES .....	116
VIII BIBLIOGRAFIA .....	159

## LISTA DE ABREVIATURAS

NET	Noretindrona
COLEST	Colesterol
LACT	Lactosa
RIA	Radioinmunoanálisis
CT	Cuentas Totales
Bo	Unión Máxima
UNE	Unión no Específica
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
D.O.	Densidad óptica
6, 7 <sup>3</sup> H-NET	Noretindrona tritiada
Ag	Antígeno
Ac	Anticuerpo
u.v.	Ultravioleta
I.R.	Infrarojo
D50%	Dosis al 50 por ciento
U.S.P.	Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica.
cpm	Cuentas por minuto
ka	Constante de velocidad de absorción
ko	Constante de velocidad de liberación
$\alpha$	Constante de velocidad de distribución
$\beta$	Constante de velocidad de eliminación
$t_{1/2} ka$	Tiempo de vida media de absorción
$t_{1/2} \alpha$	Tiempo de vida media de distribución

$t_{1/2\beta}$	Tiempo de vida media de eliminación
$ABC_{\infty}$	Area bajo la curva de concentración en suero contra tiempo, desde el tiempo cero hasta infinito.
$C_{p\max}$	Concentración máxima en suero
$t_{\max}$	Tiempo en que se alcanza la $C_{p\max}$
$t[NET] > 1 \text{ ng/ml}$	Tiempo de permanencia de NET en suero en concentraciones superiores a 1 ng/ml.

## LISTA DE ESQUEMAS

1. Estructura química de los anticonceptivos esteroii  
dales mas comunmente empleados 7
2. Cambios hormonales en el ciclo menstrual de la muu  
jer 9
3. Metabolitos de Noretindrona identificados en ori-  
na y plasma por espectrofotometría de masas y croo  
matografía de gases ..... 24

## LISTA DE FIGURAS

1. Espectro de absorción de Noretindrona al ultravioleta ..... 66
2. Espectro de absorción al infrarojo de Noretindrona .. 67
3. Espectro de absorción al ultravioleta de Noretindrona fundida ..... 69
4. Espectro de absorción al infrarojo de Noretindrona fundida ..... 70
5. Curva patrón de Noretindrona en etanol utilizando un método espectrofotométrico ..... 72
6. Curva de dilución del anticuerpo de Noretindrona ... 78
7. Radiocromatograma de 6,7,<sup>3</sup>H-NET ..... 79
8. Curva dosis-respuesta linearizada de Noretindrona en suero empleando el método de radioinmunoanálisis.. 82
9. Control gráfico de tres parámetros de control de calidad del radioinmunoanálisis de Noretindrona..... 83
10. Fluctuaciones obtenidas de la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r) y el porcentaje de recuperación a lo largo de 16 ensayos de RIA para la validación de la curva dosis-respuesta linearizada de Noretindrona ..... 85
11. Control gráfico de las muestras de control de calidad del radioinmunoanálisis de Noretindrona ..... 86
12. Gráfica promedio de la concentración sérica de Noretindrona contra tiempo después de la administración de las tres formas farmacéuticas, a los voluntarios de sexo femenino ..... 92

13. Gráfica de la concentración sérica promedio de Noretindrona contra tiempo, después de la administración de una dosis oral única (0.35 mg) de las tres formas farmacéuticas de Noretindrona a 5 voluntarios de sexo masculino ..... 95

## LISTA DE TABLAS

1. Parámetros y condiciones de trabajo probadas para la optimización del radioinmunoanálisis de Noretindrona ..... 55
2. Valores promedio de los resultados obtenidos de la determinación de Noretindrona en etanol absoluto ..... 73
3. Contenido de Net en las diferentes formulaciones durante y al término del desarrollo de las mismas .. 74
4. Variación de peso de las diferentes formulaciones de Noretindrona ..... 76
5. Parámetros de la curva dosis-respuesta de Net en suero utilizando el método de RIA, después de realizar ocho combinaciones con las diferentes condiciones de trabajo de acuerdo con la tabla 1 ..... 80
6. Evaluación de las muestras de control de calidad de Noretindrona ..... 84
7. Variables biológicas de los voluntarios que participaron en el estudio de bioequivalencia de Noretindrona ..... 88
8. Distribución de los voluntarios y las diferentes formulaciones farmacéuticas en bloques al azar - para el estudio de bioequivalencia ..... 89
9. Datos promedio de la concentración sérica contra tiempo después de la administración de una dosis oral de 0.35 mg de Noretindrona de tres formas - farmacéuticas a 5 voluntarias de sexo femenino ..... 91
10. Datos promedio de la concentración sérica contra tiempo después de la administración de una dosis oral de 0.35 mg de Noretindrona de tres formas - farmacéuticas a cinco voluntarios de sexo masculino..94

11.	Parámetros farmacocinéticos promedio e intervalos de confianza al 95 % obtenidos en voluntarios sanos, después de la administración de una dosis oral única de 0.35 mg de Noretindrona de un producto comercial, una formulación control y una experimental .....	105
12.	Prueba de rangos múltiples de Newman-Keuls para comparar los parámetros farmacocinéticos entre formulaciones de un mismo sexo .....	109
13.	Prueba de t de Student para comparar los parámetros farmacocinéticos entre sexos de una misma formulación .....	110

LISTA DE APENDICES

1. Descripción de los parámetros empleados en el radioinmunoanálisis de Noretindrona ..... 117
2. Fórmulas empleadas para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos y análisis estadístico ..... 127
3. Tablas de datos y gráficas individuales de la concentración sérica de Noretindrona a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de una dosis oral única (0.35 mg) de las tres formas farmacéuticas: Producto comercial (Dianor<sup>R</sup>), Formulación control (NET:LACT) y Formulación experimental (NET:COLEST:LACT) a 10 voluntarios clínicamente sanos (5 del sexo femenino y 5 del sexo masculino) ..... 134
4. Parámetros farmacocinéticos individuales calculados después de la administración de Dianor<sup>R</sup>, NET:LACT y NET:COLEST:LACT, en una dosis oral única de 0.35 mg de Noretindrona a 5 voluntarios de sexo femenino y 5 del sexo masculino ..... 155

## RESUMEN

Con el objeto de minimizar los efectos de una absorción brusca de las hormonas ingeridas con fines anticonceptivos, se desarrolló una formulación a base de Noretindrona y Colesterol (NET: COLEST) y se comparó in vivo, contra un producto comercial (Dianor<sup>(R)</sup>, Syntex) y contra una formulación control conteniendo Noretindrona y Lactosa (NET: LACT).

El estudio se realizó en diez voluntarios clínicamente sanos (cinco de sexo femenino y cinco de sexo masculino) de acuerdo a un diseño de bloques al azar, utilizando un método de radioinmunoanálisis específico para la cuantificación de Noretindrona en suero.

Los resultados obtenidos demostraron que la Noretindrona se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos.

En ocho de los diez voluntarios la formulación experimental (NET: COLEST) presentó una cinética de liberación sostenida y la concentración plasmática máxima alcanzada, en ambos sexos, fué menor comparada con la del producto comercial.

En el sexo femenino el valor promedio del  $ABC_{\infty}^{\circ}$  fué mayor después de la administración de la formulación experimental que la obtenida con la comercial; por lo que en este sexo ambas formulaciones fueron BIOINEQUIVALENTES.

Después de la administración de la formulación con colesterol, se cuantificaron concentraciones terapéuticas ( $> 1$  ng/ml) de NET en suero, por períodos más prolongados de tiempo, que cuando se administró el producto comercial.

Los valores de  $C_{p\text{máx}}$  y  $ABC_{\infty}^{\circ}$  después de la administración de la formulación control (NET: LACT) fueron significativamente mayores en la población femenina que en la masculina; la constante de velocidad de distribución ( $\alpha$ ) fué estadísticamente mayor y la vida media de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) estadísticamente menor, en el sexo masculino en relación al femenino, cuando se administró el producto comercial (Dianor<sup>(R)</sup>).

## ABSTRACT

A formulation of Norethindrone and cholesterol (NET: CHOL) was developed with the aim of minimizing the effects of a sudden absorption of hormones administered as contraceptives. This preparation was tested "in vivo" against a commercial product (Dianor<sup>(R)</sup>, Syntex) and against a control formulation that contained Norethindrone and lactose (NET: LACT).

The study was conducted in ten clinically healthy volunteers (five males and five females) using a random blocks design, and a specific radioimmunoassay method for the determination of Norethindrone in serum.

The results obtained showed that Norethindrone behavior adjusted to a two-compartment open model. In eight of the ten volunteers the experimental formulation (NET: CHOL) followed a kinetics of sustained liberation and the maximum plasmatic concentration ( $C_{pmax}$ ) reached in both sexes was smaller than that reached with the commercial product.

In the females the total area under the plasma concentration vs time curve ( $ABC_{\infty}$ ) value was larger after the administration of the experimental formulation than that obtained with the commercial product. This result suggests that in females both formulations were not bioequivalents.

NET plasmatic therapeutic concentrations (1 ng/ml) were found in volunteers receiving the cholesterol containing formulation and were sustained during times longer than those observed for the commercial preparation.

$C_{pmax}$  and  $ABC_{\infty}$  values were statistically higher in females than those observed in males after the administration of the control formulation (NET: LACT); the distribution velocity constant ( $\alpha$ ) showed statistically higher values and the half-life distribution ( $t_{1/2\alpha}$ ), statistically lower ones, in males compared to females, when the commercial product (Dianor<sup>(R)</sup>) was tested.

## I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

## I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

Con el descubrimiento de la función de las hormonas hipofisarias y de su acción sobre los órganos "blanco", así como con el conocimiento bioquímico y fisiológico del proceso reproductivo en el humano, se han desarrollado una serie de métodos para el control de la fertilidad, basados en el uso de compuestos hormonales tanto naturales como sintéticos, siendo el objetivo primordial de éstos el inhibir la ovulación.

Actualmente la medicina ofrece a las mujeres en edad reproductiva una amplia gama de métodos de anticoncepción. Entre ellos se encuentran los anticonceptivos orales, de los cuales se estima que hay en nuestro país, aproximadamente 1.5 millones de usuarias.

Los anticonceptivos orales altamente efectivos (mayor al 99%) son los preparados en base a una combinación de un estrógeno con una progestina. Una variante son las formulaciones conocidas como minipíldoras que consiste en la administración de progestinas sintéticas en ausencia del estrógeno para impedir la fertilidad, sin llegar a inhibir la ovulación.

La Noretindrona (NET) es una progestina sintética, la cual es ampliamente utilizada en los anticonceptivos orales ya sea sola o combinada con estrógenos.

La característica de la mayoría de las progestinas sintéticas administradas por vía oral es una rápida absorción, obteniéndose concentraciones máximas en plasma en un período de 0.5 a 2 hrs. con una vida media menor a una hora. La representación gráfica de este fenómeno indica que para mantener una concentración terapéutica en el plasma es necesario un esquema de administración frecuente. Los cambios rápidos en la concentración plasmática que se suceden en períodos cortos de tiempo, son los que condicionan las sobredosis con riesgos de efectos indeseables y las dosis insuficientes sin efecto terapéutico.

Una alternativa que se ofrece para los fármacos que presentan características como las mencionadas, son las formulaciones de liberación sostenida, ya que éstas además de que permiten disminuir la dosis y la frecuencia de la administración, producen niveles constantes del fármaco en sangre.

En base a lo mencionado en líneas superiores, se desarrolló el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- a) Determinar si una mezcla eutéctica de Noretindrona: colesterol administrada por vía oral se comporta como una formulación de liberación sostenida.
- b) Determinar si una formulación oral de liberación sostenida es más adecuada para mantener concentraciones efectivas por períodos más prolongados de tiempo.

Para lograr los objetivos antes mencionados se realizó un estudio de bioequivalencia en voluntarios clínicamente sanos a los cuales se les administró la formulación experimental (NET: - COLEST), un producto comercial (Dianor<sup>(R)</sup>) y una formulación control conteniendo Noretindrona y Lactosa (NET: LACT).

## II. ANTECEDENTES.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 ANTICONCEPTIVOS ORALES

#### 2.1.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

El primero en postular que el cuerpo lúteo tiene una función endócrina y que además suprime la ovulación fué Joeb en 1909 (1). A partir de entonces, se prepararon extractos de tejido ovárico los cuales fueron empleados principalmente en transtornos menstruales. En 1921 Haberlandt (2) emplea hormonas, obtenidas a partir de extractos de cuerpo lúteo para esterilizar a conejos, como un método de anticoncepción.

Fué así como en los años 20's, se logró un gran avance en cuanto a la fisiología luteal y la extracción, purificación y bioensayo de la "hormona luteal". Los trabajos de Corner y Allen (3) establecen una "proliferación progestacional" debido a la hormona luteal. En 1934 (4), se logró purificar la hormona luteal, denominándola PROGESTERONA, abriendo de esta manera una gran línea de investigación sobre la inhibición de la ovulación (Makepeace, Weinstein y Freedman (1937); Dempsay (1937); Astwood y Fevold (1939) (5,6,7).

Por otro lado Loewe y Long (8) descubrieron una hormona sexual femenina en la orina de mujeres menstruantes, observando que la concentración de esta hormona en la orina variaba según la fase del ciclo menstrual.

Más tarde, Ascheim y Zondek (9) encontraron en la orina de mujeres embarazadas una hormona con alta actividad estrogénica.

Estos hallazgos condujeron al aislamiento y caracterización química del ESTROGENO (10, 11). La importancia de esta hormona con respecto al control de la fertilidad, fué establecida en los trabajos de Leonard y Col. (12) y Morre y Price (13), quienes mostraron que el estrógeno actuaba mediante un mecanismo de retroalimentación inhibitoria sobre la secreción hipofisiaria de gonadotropina. A partir de los trabajos de Pincus y Chang (14), se abrieron nuevas perspectivas en el uso de esteroides hormonales sexuales como anticonceptivos orales.

Inicialmente sólo se utilizó el estilbestrol, el cual se administraba diariamente por varios meses, sin embargo este tratamiento producía amenorrea, por lo que era frecuentemente confundida con el embarazo. Esto condujo a Pincus a diseñar un régimen de dosificación cíclico, esto es, la hormona se administraba del 5° al 25° día del ciclo menstrual, lo que permitió tanto el sangrado como la regularización de la menstruación (15). Con este tipo de tratamiento cíclico, posteriormente se encontró que con la administración de 10 mg de noretinodrel se ofrecía una acción anticonceptiva eficaz, aunque frecuentemente se presentaban sangrados intermenstruales, lo cual se resolvió al administrar este progestágeno en combinación con 150 mg de etinilestradiol.

Posteriormente se demostró que el estrógeno era el que inhibía la ovulación y esto permitió disminuir la dosis del progestágeno. Dado a que, se asoció el tratamiento con estrógenos con problemas cardiovasculares, se redujo la dosis de los mismos. Actualmente se considera que 30 mg de etinilestradiol son suficientes para mantener una elevada eficacia anticonceptiva, regulando adecuadamente el ciclo menstrual y con un menor riesgo de producir trastornos cardiovasculares (16).

En 1959 la FDA aprueba el uso de la formulación combinada de noretinodrel mestranol como anticonceptivo oral (17), y a partir de entonces se han diseñado un gran número de formulaciones combinadas de estrógeno-progestágeno, para ser empleadas con el mismo fin.

### 2.1.2 FARMACOLOGIA DE LOS ANTICONCEPTIVOS ORALES

Los anticonceptivos orales que se emplean en la clínica son combinaciones de un estrógeno con un progestágeno o bien el progestágeno solo.

Los estrógenos más utilizados son en su mayoría sintéticos: el mestranol y algunos derivados del etinil estradiol. El mestranol sólo posee actividad estrogénica cuando se metaboliza y se transforma en etinil estradiol. Los estrógenos sintéticos, al igual que los naturales, inhiben la ovulación y tienen acción farmacológica sobre el tracto genital femenino.

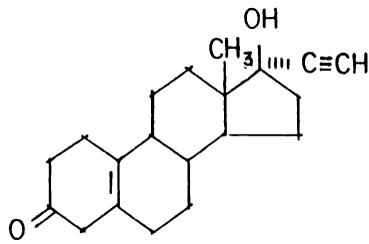
Los progestágenos que normalmente se utilizan son los derivados de la 19-nortetosterona y los de la 17-hidroxiprogesterona; los del primer grupo, además de su efecto progestacional, poseen una acción androgénica (18).

En algunos países se ha disminuído el uso del acetato de clor<sup>u</sup>madinona y del acetato de medroxiprogesterona, ya que se han asociado con tumores de mama en sabuesos. El noretinodrel se metaboliza a noretindrona para poder ejercer su efecto farmacológico, ya que sólo esta última puede unirse al receptor de la progesterona (18).

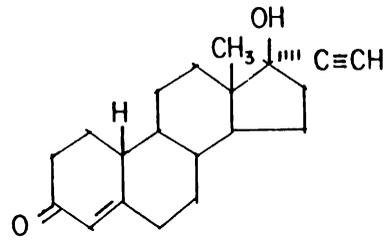
La noretindrona y el noretinodrel se metabolizan parcialmente a estrógenos (menos del 0.1%), es posible que estas pequeñas cantidades del estrógeno formado también posean actividad biológica (16).

En el esquema 1 se muestra la estructura química de algunas hormonas que se emplean como anticonceptivos orales.

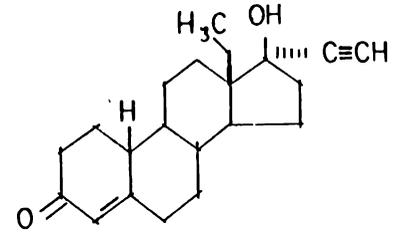
Los cambios en la flora microbiana intestinal o las enfermedades diarréicas, pueden afectar el grado de absorción intestinal de estrógenos y progestinas.



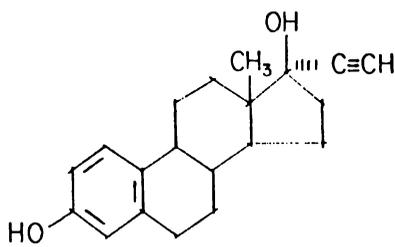
Noretinodrel



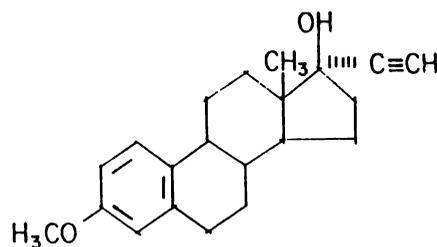
Noretindrona



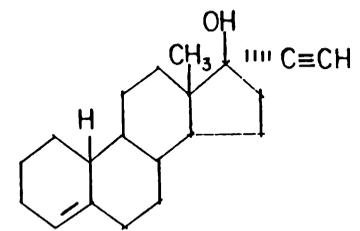
Norgestrel



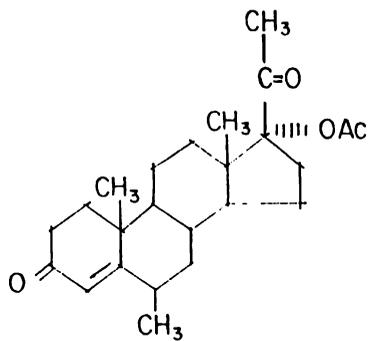
17α-Etinilestradiol



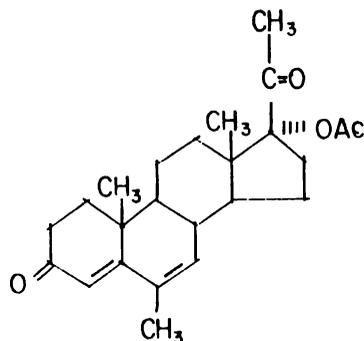
Mestranol



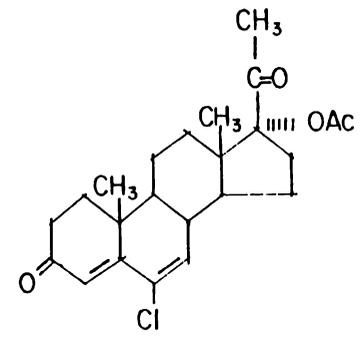
Linestrenol



Acetato de Medroxi-progesterona



Acetato de Megestrol



Acetato de Clor-madinona

Esquema 1. Estructura química de los anticonceptivos esteroidales mas comunmente empleados.

Por otro lado, el esteroide que es eliminado en la bilis puede ser metabolizado por la flora microbiana intestinal y ser reabsorbido, originando una recirculación enterohepática, la cual permite mantener en la circulación concentraciones eficaces de los estrógenos y progestinas (16).

Se cree que el uso de fármacos antimicrobianos, como la ampicilina, pueden afectar la reabsorción del estrógeno excretado en la bilis (18).

Se sabe que algunos fármacos, tales como la rifampicina, la fenitoina y el fenobarbital entre otros, reducen las concentraciones plasmáticas de las hormonas anticonceptivas, por inducción de enzimas hepáticas que metabolizan a estas hormonas (18).

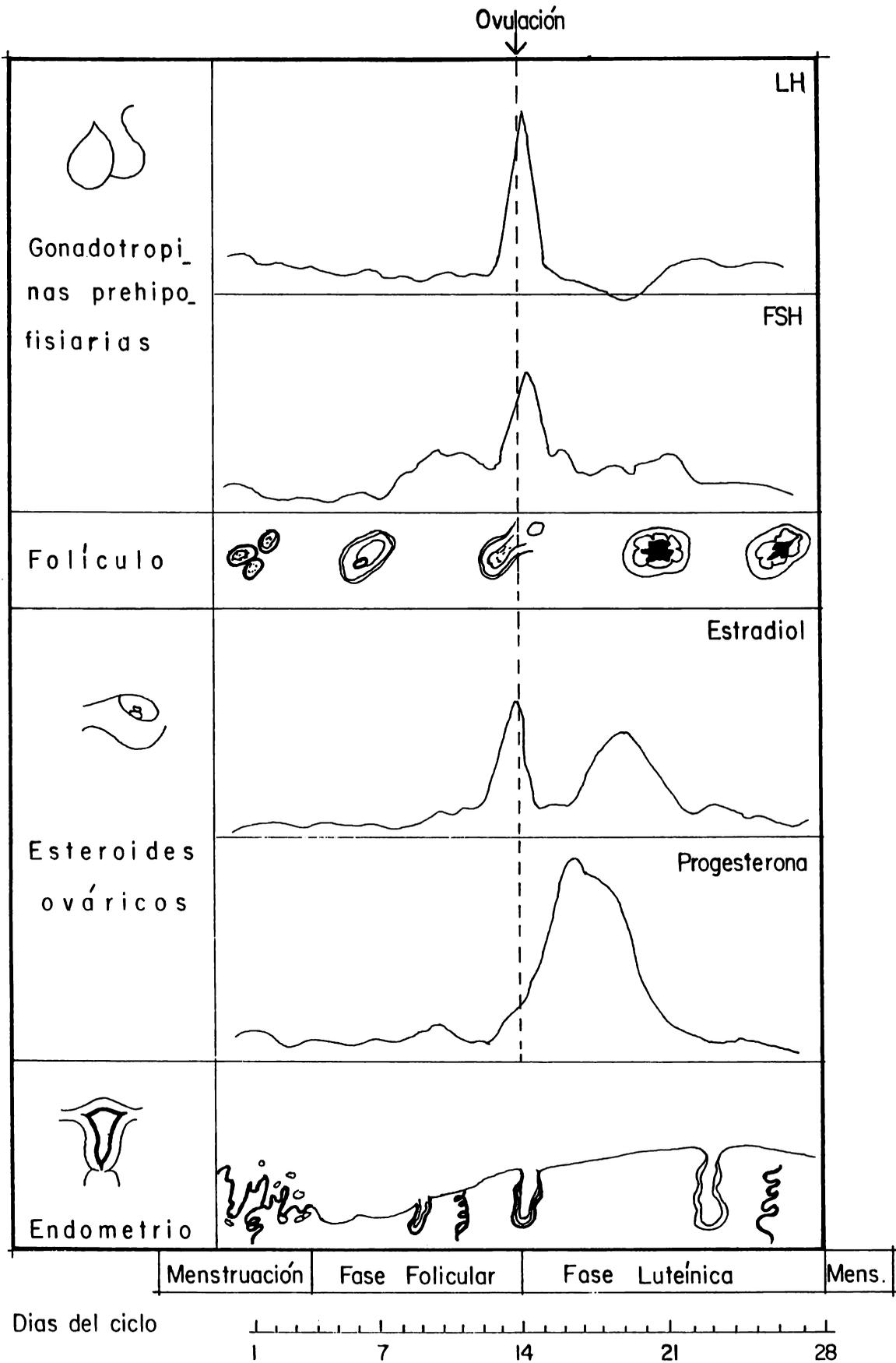
### 2.1.3 MECANISMO DE ACCION DE ANTICONCEPTIVOS ORALES

El mecanismo de acción de los anticonceptivos orales se puede entender fácilmente, si se comprende la fisiología del ciclo menstrual normal. En el esquema 2 se muestra el diagrama tradicional del control de la menstruación. Los eventos se concentran alrededor de la ovulación, la cual ocurre en el 14° día (el primer día está definido como el primer día de flujo menstrual).

El aumento sérico de las hormonas estimulante de los folículos (FSH) y luteinizante (LH) en la primera fase del ciclo menstrual (fase folicular), estimulan el crecimiento inicial y el desarrollo de un folículo De Graaf en uno de los ovarios, las células de la teca interna aumentan su secreción de  $17-\beta$  estradiol, de androstenediona y de  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona. La secreción de estrógeno, que va en aumento antes de la ovulación, es estimulada por la FSH, provocándose al mismo tiempo, una proliferación de las glándulas uterinas. El aumento de LH tiene importancia fundamental para causar la rotura del folículo y producir por tanto la ovulación.

Después de que se ha presentado la ovulación, se empieza a formar un cuerpo lúteo que secreta grandes cantidades de progesterona; también se secreta  $17-\alpha$  hidroxiprogesterona y  $17-\beta$  estradiol, de tal manera que los niveles de estos tres esteroides permanecen elevados durante la fase luteínica o secretoria del ciclo. La progesterona, o su metabolito, el pregnanediol, son los responsables de la elevación postovulatoria de la temperatura basal y el estrógeno y la progesterona combinados provocan la hipertrofia del endometrio y la actividad secretoria de las glándulas como preparación para la implantación del óvulo en caso de que se efectúe la fertilización.

Una vez que el cuerpo lúteo ha iniciado su regresión, el endometrio secretor hipertrofiado se ve privado, repentinamente de su apoyo hormonal, las arterias endométricas sufren un espasmo, y el epitelio es descamado en la luz del útero acompañado de cierta cantidad de sangre (menstruación). Otra consecuencia que tiene la regresión del cuerpo lúteo es que el hipotálamo escapa a los efectos



Esquema 2: Cambios hormonales en el ciclo menstrual de la mujer.

inhibidores de la progesterona y del estrógeno, de modo que la hipófisis empieza a secretar más FSH y LH como preparación para el siguiente ciclo (19).

Las formulaciones de anticonceptivos orales que contienen -- cantidades suficientes de estrógenos y progestinas, actúan suprimiendo a la FSH y LH, inhibiendo el desarrollo folicular, y por tanto no se presenta la ovulación (20).

Otro mecanismo de acción de los anticonceptivos orales está relacionado con la modificación de las características del moco ser\_vical inhibiendo la entrada del esperma a la cavidad uterina (16).

También se han reportado cambios en el endometrio o en las con\_centraciones de las trompas de Falopio, lo cual puede interferir con la implanta\_ción del óvulo fertilizado (18). O bien, es posible que los progestáge\_nos coloquen al endometrio fuera de fase con relación a la ovulación, impidiendo de esta manera la fertilización (20).

#### 2.1.4 TIPOS DE ANTICONCEPTIVOS ORALES

Existen principalmente tres tipos de anticonceptivos orales:

##### a) Combinaciones de estrógeno-progestágeno.

Estos son administrados diariamente por 20 días, iniciando en el quinto día y completando en el vigésimo cuarto día del ciclo menstrual; siendo el primer día, cuando se inicia el flujo menstrual.

Después de tres o cuatro días de la última dosis, se produce hemorrágia por supresión (sangrado menstrual). Cuando este anti-conceptivo se toma regularmente la efectividad es del 99% (16).

##### b) Preparaciones secuenciales de estrógeno y progestágeno.

Estas preparaciones consisten en la administración del estrógeno por 15 días (desde el quinto día hasta el décimo noveno día del ciclo), seguido de la administración de una combinación de estrógeno y progestágeno por cinco días. El fármaco se interrumpe por cinco días, para permitir el sangrado por supresión, y la secuen\_cia de administración se repite.

El estrógeno en la primera parte del ciclo inhibe probablemente la ovulación. El progestágeno se añade con el fin de estimular la maduración completa y la subsiguiente descamación del endome-trio durante el sangrado por supresión.

En Algunos países, este tipo de formulación ha sido retirado del mercado, ante la sospecha que existe entre el cáncer del endometrio y la administración del estrógeno, sin el progestágeno (16).

c) Formulaciones que contienen únicamente progestágeno.

El progestágeno se administra diariamente en dosis pequeñas. A esta formulación se le conoce como "minipíldora". En condiciones de ensayo clínico, este tipo de formulación es tan eficaz como la preparación combinada.

Los trabajos de Roland (21) han demostrado que con dosis pequeñas de progestágeno, es posible inhibir la migración del espermatozoides a la cavidad uterina.

Es importante mencionar otros tipos de anticonceptivos, tales como el anticonceptivo oral que se toma una sola vez al mes y en el que se administra quinestrol (estrógeno de acción prolongada) en combinación con un progestágeno de acción rápida (16).

También se han administrado dosis elevadas de estrógenos en un período de dos o tres días después de un acto sexual no protegido para evitar la eventual implantación de un óvulo fertilizado (22).

Recientemente se ha reportado que una dosis única de D-norgestrel (el cual es un progestágeno), tres hrs. antes del acto sexual previene el embarazo (23). Sin embargo el principal efecto secundario que presenta es la irregularidad en el ciclo menstrual (generalmente disminuye el período del ciclo) (23).

#### 2.1.5 EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS ANTICONCEPTIVOS ORALES

Los efectos secundarios que se atribuyen a los anticonceptivos hormonales orales pueden ser benéficos o adversos. Algunos efectos que se han observado en preparaciones combinadas (estrógeno-progestina), son (24):

a) Efectos benéficos:

**Menstruación.** Los anticonceptivos orales son benéficos para aquellas mujeres que presentan ciclos menstruales irregulares, ya que los ciclos se hacen más regulares y con frecuencia el flujo menstrual disminuye. De aquí se haya reportado mejoría en casos de anemia ferropénica.

**Alivio del dolor intermenstrual.** Al inhibir la ovulación, desaparece el dolor que coincide con ésta.

**Alivio de la tensión premenstrual.** Se sabe que los anticonceptivos orales pueden aliviar algunos de los síntomas de la tensión premenstrual.

**Líbido.** Los cambios en la libido son difíciles de evaluar, pero se han registrado tanto casos de aumento como disminución. El aumento de la libido se debe probablemente a que no existe el temor de riesgo de embarazo.

Inflamación de la pelvis. En los últimos años se ha encontrado que las usuarias de anticonceptivos hormonales presentan una disminución en el riesgo de enfermedad inflamatoria pelviana.

Mejoría del acné. En muchas usuarias, el acné mejora, aunque en algunas otras puede agravarse o aparecer por primera vez, sobre todo en aquellas que toman formulaciones de progestágeno sólo.

Artritis reumatoide. En algunos estudios recientes se ha señalado una protección contra la artritis reumatoide.

Neoplasia. Existen evidencias de que la supresión continuada de la ovulación puede disminuir el riesgo de cáncer ovárico. Hay indicios de que los anticonceptivos orales tienen cierto efecto - protector contra la aparición de tumores benignos de mama.

b) Efectos adversos (24):

La mayoría de los síntomas asociados frecuentemente con los anticeptivos orales son semejantes a los encontrados en las mujeres antes de tomar éstos y durante el embarazo. Los efectos adversos más frecuentes que se presentan con la administración de anticonceptivos combinados son:

Cefalea, jaqueca. Cierta proporción de mujeres pueden sufrir fuertes dolores de cabeza, sobre todo cuando comienzan a tomar anticeptivos.

Secreción vaginal. En algunas mujeres puede producirse leucorrea y en algunas ocasiones aparece ó se agrava la candidiasis vaginal.

Infecciones del tracto urinario. Algunos reportes demuestran la presencia de infecciones del tracto urinario entre las usuarias de anticonceptivos orales.

Aumento de peso. En muchas mujeres se observa un aumento de peso que suele ser menor a 2 kg y se produce dentro de los seis primeros meses de tratamiento.

Transtornos hemorrágicos. En una minoría de mujeres se presenta sangrado extemporáneo intermenstrual o aparición de manchas sanguíneas junto con la administración de anticonceptivos orales, - sobre todo en los primeros ciclos de tratamiento.

Otros síntomas diversos son: Dolor de las mamas, depresión, eczema, caída del cabello, gingivitis, sensibilidad a la luz, urticaria, cloasma.

Los efectos adversos graves que se presentan entre las usuarias de estos fármacos son raros y poco frecuentes, algunos de éstos son (24):

Efectos cardiovasculares. Se ha observado que con el uso prolongado de anticonceptivos orales se produce un aumento (pequeño pero significativo) en la presión sanguínea sistólica y diastólica. Este aumento tiende a ser reversible al interrumpirse el tratamiento.

Existe la posibilidad de riesgo de complicaciones tromboembólicas, los factores que inciden sobre este tipo de complicaciones son la edad, el consumo de cigarrillos y la duración del uso de los anticonceptivos.

Los anticonceptivos orales, están asociados también con los cambios en las concentraciones séricas de lípidos, lo que conduce a un riesgo mayor de enfermedades cardiovasculares.

Cancer. El número de casos que reportan una relación entre el uso de anticonceptivos orales y cáncer es muy pequeño. Por lo que no existen evidencias lo suficientemente fundamentadas para establecer que el riesgo de cáncer está incrementado por el uso de anticonceptivos orales.

Otros síntomas poco frecuentes atribuidos al uso de anticonceptivos orales son:

Alteración del metabolismo de glucosa, aumento en las proteínas plasmáticas, trastornos hepáticos, disminución de los indicadores bioquímicos de las concentraciones sanguíneas de las vitaminas, fecundidad ulterior, amenorrea postratamiento y ligera disminución en la producción láctea (24).

## 2.2 GENERALIDADES SOBRE NORETINDRONA.

### 2.2.1 ANTECEDENTES

Una vez que se hubo demostrado que las hormonas sexuales con actividad progestágena o estrogénica inhibía la ovulación, se realizaron una serie de síntesis químicas con el fin de encontrar compuestos análogos con mayor actividad biológica (25-29).

Usando la metodología química desarrollada en la síntesis de 19-norprogesterona, Djerassi en 1951 (30), logró sintetizar la 19 nor - 17 - etinilttestosterona, conocida genéricamente como noretisterona o noretindrona (NET).

Las primeras evaluaciones de la noretindrona en animales, mostraron que era un progestágeno mucho más activo por vía oral, que los esteroides conocidos en ese tiempo; también se demostró su alta capacidad para inhibir la ovulación (31).

Posteriormente los trabajos de Hertz y Colab. (32), Jadryevic y Colab. (33), Pincus y Colab. (34), Saunders y Colab. (35) y McGinty y Djerassi (36) confirmaron la potencia de la Noretindrona. El Dr. Tyler (37) presentó los primeros resultados clínicos de noretindrona para el tratamiento de desórdenes menstruales y problemas de fertilidad.

Consecuentemente los estudios clínicos de Greenblatt (38), Rock y Colab. (39), Tyler y Colab (40) y Goldzieher y Colab. (41), mostraron que la Noretindrona (NET) proveía una inhibición efectiva de la ovulación y era un regulador confiable de la menstruación.

Pincus (34) y Rock (39), de sus estudios clínicos, concluyeron que la Noretindrona era un posible candidato para ser empleado como anticonceptivo oral en mujeres. En los primeros estudios con NET, se observó que esta presentaba una ligera actividad estrogénica (42), ello se debió a que las preparaciones contenían una contaminación con pequeñas cantidades de un estrógeno activo por vía oral. Posteriormente la técnica para obtener NET fué mejorada, eliminando las impurezas del estrógeno, por lo que la actividad estrogénica no se observó más.

Dado que la administración de NET sola ocasionaba aumento en el sangrado intermenstrual, se propuso administrar esta progestina en combinación con un estrógeno activo oralmente como el mestranol (41). Se sabe que la progestina y el estrógeno actúan de forma sinérgica en la inhibición de la ovulación, sin embargo, la primera sigue siendo considerada como el principal componente de los anticonceptivos orales.

Los primeros estudios clínicos que emplearon una combinación de Noretindrona-mestranol para el tratamiento de desordenes menstruales y como anticonceptivo oral, fueron reportados en 1962 por Goldzieher y Colab. (41) (6232 ciclos estudiados) y Rice-Wray y Colab. (43) (6062 ciclos de tratamiento).

En 1957 la FDA prueba emplear la combinación de Noretindrona-mestranol en el tratamiento de desordenes menstruales y en la regulación menstrual. Más tarde, en 1962 se acepta el uso de esa combinación como anticonceptivo oral. Actualmente la Noretindrona es el esteroide anticonceptivo más utilizado mundialmente, tanto sola como combinada con un estrógeno.

2.2.2 CARACTERISTICAS GENERALES Y PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DE LA NORETINDRONA.

Nombre químico y sinónimos de NET (45)

17-hidroxy-19-Norpregn-4-en-20-yn-3-one

19-norethisterone

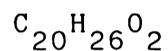
Norpregneninolona

Noretisterona

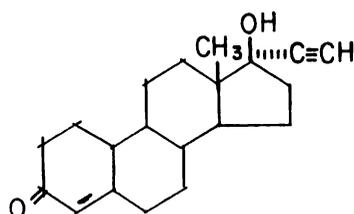
Nombres comerciales más comunes (44)

NET (mg)	+	ESTROGENO (mg)	NOMBRE COMERCIAL
1		0.05	Anovlar 21
1		0.02	Norace-1
2		0.02	Norace
1		0.5	Norinyl-1
0.5		0.1	Ortho-Novum
1		0.08	Ortho-Novum
1		0.035	Ortho-Novum 1/35

Fórmula condensada (44, 45).



Fórmula desarrollada (44, 45).



Peso molecular (45).

298.42

Descripción (44).

Polvo cristalino, blanco o blanco-cremoso, inodoro, con ligero sabor amargo.

Solubilidad (44).

Prácticamente insoluble en agua, soluble 1 en 150 de alcohol, 1 en 90 de acetona, 1 en 30 de cloroformo, 1 en 5 de piridina, soluble en dioxano y ligeramente soluble en eter.

Punto de fusión (45).

Entre 202° y 208°

Pruebas de identificación (44, 45).

- a) El espectro de absorción en infrarojo en una solución al 7% de cloroformo, determinada en una celda de 0.1 mm, muestra una absorbancia máxima similar a lo que presenta el patrón de referencia USP de noretindrona R.S.
- b) El espectro de absorción ultravioleta de noretindrona en etanol exhibe un máximo a 240 nm ( $\log \epsilon$  4.24).

Pruebas de pureza (44, 45).

- a) Contenido: contiene no menos del 97% y no más del 102 % de  $C_{20}H_{26}O_2$  calculado en base seca.
- b) Rotación específica: entre -30° y -38°, determinada en una solución de dioxano conteniendo 200 mg en cada 10 ml.

### 2.2.3 MECANISMO DE ACCION

El mecanismo de acción de la noretindrona cuando se dá sin el estrógeno está relacionado con la dosis administrada (46).

Nygren y Colab. (47) encontraron una eficiencia de anticoncepción muy limitada en un estudio en el cual administraron dosis diarias de 100 mg de NET en los días 21° y 22° del ciclo menstrual a un grupo de mujeres y 50 mg diarios de NET del 19° al 22° día del ciclo menstrual a otro.

En un segundo trabajo Nygren (48) encontró una mejor eficiencia administrando 10 mg ó 25 mg de NET diariamente del 15° al 22° día del ciclo menstrual. Posteriormente reportó que al administrar 11 mg de NET del 8° al 15° día, o bien del 15° al 22° día del ciclo menstrual no hubo inhibición de la ovulación, en el siguiente ciclo (49), por lo que la administración preovulatoria de NET no causó necesariamente una inhibición total de la maduración del folículo durante el tratamiento, y la eficiencia de anticoncepción, bajo éste régimen de dosificación, estuvo regida por otro tipo de mecanismo diferente al de la inhibición de la ovulación.

Los reportes de Larsson (50), han demostrado que al administrar 0.5 mg de NET diariamente por vía oral, a partir del 1er. día del ciclo menstrual, sí hay inhibición de la ovulación, mientras que 0.3 mg por día no tienen un efecto anovulatorio en la mayoría de las mujeres en tratamiento (51).

Landgren y Colab. (52), describieron cuatro tipos diferentes de reacción ovárica al administrar 0.3 mg de NET diariamente, en un ciclo menstrual. De la población estudiada, el 16% no presentaron ni actividad folicular ni luteal, ya que las concentraciones de estradiol y progesterona fueron mínimas; 23% presentaron actividad folicular pero no luteal; 21% tuvieron una actividad folicular normal, pero una insuficiente actividad luteal y el 40% exhibió perfiles de estradiol y progesterona iguales al ciclo menstrual de una mujer sin tratamiento, por lo que éste último grupo presentó actividad tanto folicular como luteal.

Por lo tanto, hubo un perfil anormal de estradiol asociado con una ligera o nula actividad luteal en un 39% de la población estudiada, un perfil normal de estradiol acompañado con una insuficiente función luteal en el 21% de la población y además en un 40% se observó un perfil de ovulación normal. Debido a que la tasa de embarazo con el mismo régimen de dosificación (0.3 mg de NET) en mujeres Suizas está reportado de ser del 1.4% (eficiencia de anticoncepción igual al 98.6%) (56), se pensó que para poder mantener una eficiencia de anticoncepción relativamente alta (98.6%), la NET actúa por un mecanismo diferente al de la inhibición de la ovulación.

Otros estudios que emplearon 0.35 mg de NET encontraron una tasa de embarazo entre el 1.3 y 2.5% (54-56), mientras que cuando se administraron 0.3 mg del acetato de noretindrona ésta fué del 2% (57).

Los mecanismos extraováricos, por los cuales se ha tratado de explicar el mecanismo de acción de NET al ser administrada diariamente en dosis pequeñas (0.35 mg) son: 1) la modificación de la composición del moco cervical (lo hace grueso y escaso), inhibiendo de esta forma la penetración de esperma en la cavidad uterina. 2) alteraciones en la histología endometrial, la cual puede interferir con la implantación y por lo tanto, no ocurre fertilización, 3) inhibición de la movilidad tubarica, impidiendo por tanto el transporte del espermatozoide del óvulo a la cavidad uterina (58-61).

En cambio, cuando la Noretindrona es administrada diariamente a dosis mayores (0.400 - 5 mg), su mecanismo de acción se lleva a cabo suprimiendo la síntesis de LH y FSH (46) (ver mecanismo de acción de anticonceptivos orales (pp 8)).

#### 2.2.4 EFECTOS SECUNDARIOS

La administración de Noretindrona sola (así como también de otras progestinas), como anticonceptivo oral ha sido asociada con diversos cambios metabólicos y efectos benéficos y adversos. A continuación, se revisarán los efectos secundarios más estudiados:

##### a) Efectos cardiovasculares.

No se ha encontrado una asociación directa entre la administración diaria de NET sola y un aumento en el riesgo de enfermedades vasculares (62-64). Sin embargo, en las preparaciones combinadas, se ha encontrado una asociación entre la progestina y enfermedades tromboembólicas venosas, pero no cerebrales ni coronarias (65).

##### b) Cambios hematológicos.

Los reportes en la literatura indican una disminución en la antitrombina III (66) y en la actividad fibrinolítica (67), así como un aumento en los factores VIII y IX y una disminución en el V (67) cuando es administrada NET sola. También se ha observado un aumento en la agregación de plaquetas, aunque éste no es tan grande como el producido en las preparaciones combinadas estrógeno-progestina (68).

A diferencia de las preparaciones combinadas, los anticonceptivos que contienen exclusivamente NET no incrementan la concentración de proteínas plasmáticas, tales como globulinas que fijan tiroxina (69) o globulinas que fijan cortisol y globulinas que unen hormonas sexuales (70).

##### c) Tolerancia a la glucosa.

Cuando la Noretindrona es administrada en dosis bajas no produce cambios en la prueba de tolerancia a la glucosa (71). Existe un reporte en el cual, se encontraron incrementados los valores de insulina en pacientes que habían presentado valores normales en

la prueba de tolerancia a la glucosa (72). Este tipo de efectos desaparece al interrumpirse el tratamiento. No se ha encontrado aún, que este tipo de modificaciones estén relacionadas con la diabetes. Los anticonceptivos orales están contraindicados en casos de diabetes de tipo juvenil con enfermedad cardiovascular y otras complicaciones vasculares. Sin embargo, mujeres con diabetes estable y controlada pueden tomar anticonceptivos orales bajo estrecha vigilancia médica (73).

d) Metabolismo de lípidos.

No se han demostrado cambios en la concentración de triglicéridos en suero o colesterol en usuarias de anticonceptivos orales que contienen Noretindrona como único principio activo (74).

e) Hipertensión.

No se ha asociado el desarrollo de hipertensión con la administración de NET sin el estrógeno.

f) Embarazos actópicos.

Estos puede producirse más frecuentemente en mujeres que toman la Noretindrona sola, que en las usuarias de preparaciones mixtas -- (16).

g) Lactación.

Los anticonceptivos orales preparados a base de progestinas se recomiendan principalmente a las madres en fase de lactancia (75), ya que éstas no alteran los componentes de la leche materna (76) y además dado que la dosis es pequeña, es poco probable que si ésta fuese transferida al infante a través de la leche materna, provoque daños en el niño (77).

Cuando la noretindrona se administra en dosis bajas, tampoco se presentan efectos adversos sobre la duración de la lactancia y es bien tolerada por las madres (78).

h) Sangrado intermenstrual.

Los anticonceptivos orales preparados a base de progestinas, están asociados frecuentemente con un sangrado intermenstrual (64).

Después de la administración diaria de 0.3 mg de Noretindrona durante un ciclo menstrual, se observó en el 50% de la población estudiada sangrado intermenstrual, manchado, reducción en el número de glándulas endometriales, disminución en el diámetro glandular, reducción en la cantidad de polinucleótidos y ac. desoxiribonucleico; por lo que independientemente de su efecto sobre la función ovárica, la Noretindrona induce cambios característicos en la fisiología del endometrio, los cuales pueden representar un factor importante para la presencia de sangrado intermenstrual y manchado (79).

### i) Neoplasia.

Los trabajos de Vessey y Colab. (80) han demostrado una correlación positiva entre la incidencia del carcinoma in situ y el tiempo de uso de los anticonceptivos orales. No así los reportes de Andolsek y Colab. (81) quienes no encontraron una asociación entre la incidencia de lesiones premalignas y malignas en el cervix con respecto a la duración del tratamiento.

Existen evidencias de que mujeres con nivel socioeconómico bajo tienden a desarrollar cáncer cervical más tempranamente y con mayor frecuencia que mujeres con nivel socioeconómico alto (82,83).

La actividad sexual, particularmente a temprana edad y la frecuencia de las relaciones sexuales, son factores importantes, los cuales pueden incrementar considerablemente el riesgo de desarrollo del carcinoma cervical (83). Existen pruebas fundamentadas de que no hay asociación directa entre el uso de Noretindrona sola como anticonceptivo oral y el cáncer de mama, el adenoma hipofisiario y la hiperplasia modular focal entre otros (84).

### j) Acné.

Se dice que el acné mejora en muchas usuarias de los anticonceptivos orales, aunque en algunos casos se agrava o aparece por primera vez, sobre todo en mujeres que toman los preparados a base de noretindrona (16).

## 2.2.5 FARMACOCINETICA.

### 2.2.5 a) ABSORCION.

Algunos estudios de Noretindrona en ratas han demostrado que su absorción se lleva a cabo rápidamente en el intestino delgado (85). Después de 5 minutos, solamente puede encontrarse en el lumen un 17% de la dosis administrada y después de 1 hora, sólo un 10% aproximadamente (86).

En los perros Beagle, cuando se administró una dosis de 0.250 mg/kg de peso de NET, ésta se absorbió rápida y completamente (87). El tiempo para alcanzar la máxima concentración en plasma, después de la administración oral de 1 mg/kg de NET fué de 1.5 hrs., lo cual sugirió que la velocidad de absorción fué tan rápida como la observada en ratas (88).

En el mono Africano también se ha reportado que NET se absorbe rápida y completamente después de la administración oral de una dosis entre 0.0035 a .35 mg/kg (87). De igual forma en el mono Rhesus se

absorbe completamente, después de administrar una dosis de 2 mg/kg. La vida media de absorción fué de 0.3 hrs. y la concentración plasmática máxima de NET fué de 36 ng/ml, la cual se alcanzó después de 1 hora (87).

De igual forma, en el hombre, la Noretindrona se absorbe completamente, a través del intestino delgado, alcanzando una concentración máxima en plasma a las dos horas después de la administración de una dosis única (89).

#### 2.2.5 b) DISTRIBUCION

Después de la administración intravenosa de Noretindrona marcada radiactivamente con tritio en ratas, se cuantificó su concentración en diferentes órganos, encontrando que las cantidades de NET en hígado y riñón disminuyeron rápidamente, mientras que después de 4 horas de la administración de la hormona esteroide, aún se detectaron concentraciones importantes en útero, sangre, cerebelo, hipotálamo e hipófisis. A pesar de ello, estos resultados no fueron indicativos de que la Noretindrona se acumule en áreas específicas, o que la eliminación a partir de estos órganos se vea retardada (90). Este estudio se vió reforzado por trabajos posteriores (87), en donde además se demostró que la Noretindrona es capaz de pasar la barrera placenta-sangre al encontrarse concentraciones considerables de esta hormona y algunos de sus metabolitos en el feto de rata y mono Rhesus (87).

Se ha demostrado que la Noretindrona se une a proteínas plasmáticas (91, 92). Existen evidencias de que la albúmina tiene una baja afinidad por NET (93), mientras que la globulina que une hormonas sexuales (SHBG) posee una alta afinidad (92).

Otros estudios han evidenciado que existe una correlación entre la concentración total y la fracción unida de Noretindrona a SHBG, demostrando que al incrementarse la concentración plasmática de NET, el grado de unión aumenta (89, 94).

#### 2.2.5 c) METABOLISMO

Mahesh y Colab. (95) realizaron un estudio en voluntarias sanas en el cual administraron oralmente 2.5 mg de Noretindrona a las 8:00 pm. y a las 6:00 am., seguidos de una administración intravenosa de 5.5  $\mu$  Ci  $^3$ H-9, 11-NET, para determinar el tiempo de vida media plasmática y la depuración metabólica (MCR) de esta hormona esteroide (95).

El valor promedio de depuración metabólica fué de  $531 \pm 56.8$  l/día, el cual después de 7 meses de tratamiento (administración diaria de NET del 5° al 24° día de cada ciclo menstrual), se incrementó a  $732 \pm 125$  lt/día. Este aumento en el valor de depuración se debió posiblemente a un incremento en el metabolismo de la Noretindrona probablemente por la inducción de enzimas ya sea del hígado o de cualquier otro tejido (96).

A pesar de que la depuración de NET fué rápida, la radioactividad permaneció por tiempos prolongados (97). Esta persistencia de la radioactividad se debió probablemente a la presencia de metabolitos de este esteroide. Para conocer la vida media de estos metabolitos, se administraron 10.1  $\mu$  Ci de  $^3\text{H}$ -Noretindrona por vía intravenosa a voluntarias sanas, y se tomaron muestras plasmáticas a diferentes intervalos de tiempo, encontrándose que el tiempo de vida media de los metabolitos de NET en sangre varió de 42 a 83 hrs.

Dado a que NET se administra por vía oral se realizó otro estudio en el cual se les administró a las voluntarias una cápsula de gelatina conteniendo 10.23  $\mu$  Ci de  $^3\text{H}$ -NET determinándose el tiempo de vida media y la excreción urinaria de los metabolitos. Los resultados obtenidos fueron muy similares a los encontrados después de la administración intravenosa. Después de 5 días de iniciado el estudio, se había excretado por la orina el 48.9% de la dosis administrada (95).

Los estudios antes mencionados, hacían cada vez más evidente la existencia de metabolitos de Noretindrona. Para la caracterización y cuantificación de estos metabolitos en orina, se realizó un estudio en el cual se administraron oralmente 25 mg de Noretindrona, diariamente por 4 días, a voluntarias sanas; colectándose muestras urinarias en intervalos de tiempo preestablecidos.

Los metabolitos que se identificaron por espectrofotometría de masas y cromatografía de gases fueron: cuatro con el anillo A reducido ( $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET;  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET y  $3\beta$ ,  $5\alpha$ NET), uno con el anillo A reducido y un grupo hidroxilo adicional ( $5\beta$ NET), el etinil estradiol y la misma Noretindrona (95, 96, 98). En el esquema 3 se muestra la estructura química de estos compuestos.

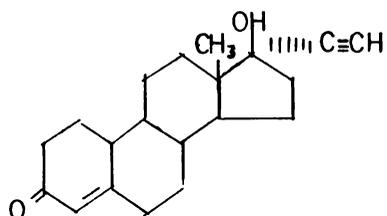
El  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET y el  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET fueron los metabolitos que se encontraron en orina en mayor y menor proporción respectivamente (99).

Para la identificación en plasma de estos metabolitos, se les administró oralmente 2.5 mg de NET diariamente por 6 días a un grupo de voluntarias sanas y a otro grupo 2 mg de NET y 0.1 mg de mestranol, diariamente del 5° al 24° día del ciclo menstrual, por cuatro ciclos consecutivos, tomándose muestras plasmáticas a diferentes intervalos de tiempo.

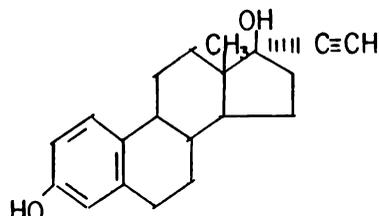
Después del tratamiento agudo, se encontraron los metabolitos  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET;  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET y NET en forma libre, de sulfato y de glucurónico; el  $3\beta$ ,  $5\beta$ NET en forma libre y de sulfato y el  $5\beta$ NET sólo en forma libre.

El isómero  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET en forma de sulfato fué el metabolito predominante en sangre en los primeros días del tratamiento, mientras que el  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET los fué en los últimos días.

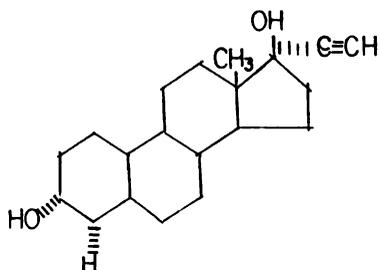
Los compuestos  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET en forma de sulfato presentaron recirculación enterohepática.



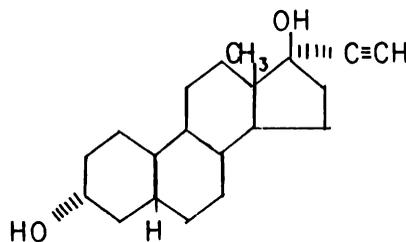
Noretindrone (Net)  
17 $\beta$ -hidroxi - 17 $\alpha$ -etinil - 4-estren - 3 one



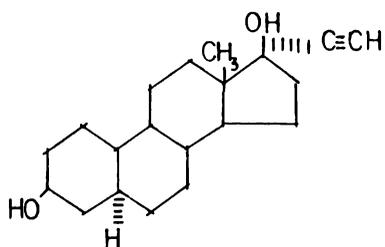
Ethinyl Estradiol (EE)  
1,3,5 (10) estratieno 3,17 $\beta$ -diol



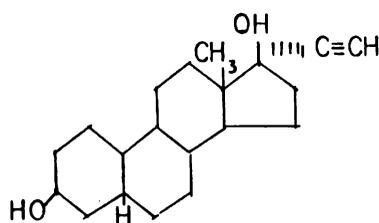
17 $\alpha$ -etinil - 5 $\alpha$ estran - 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol  
(3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ Net)



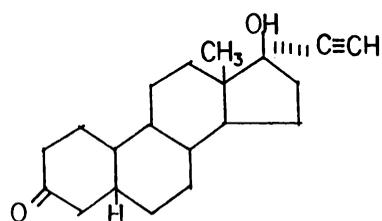
17 $\alpha$ -etinil - 5 $\beta$ estran - 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol  
(3 $\alpha$ ,5 $\beta$ Net)



17 $\alpha$ -etinil - 5 $\alpha$ estran - 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol  
(3 $\beta$ ,5 $\alpha$ Net)



17 $\alpha$ -etinil - 5 $\beta$ estran - 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol  
(3 $\beta$ ,5 $\beta$ Net)



17 $\beta$ -hidroxi - 17 $\alpha$ -etinil - 5 $\beta$ -estran - 3 one  
(5 $\beta$ Net)

**Esquema 3** Metabolitos de Noretindrone identificados en orina y plasma por espectrofotometria de masas y cromatografia de gases (95).

Con respecto al tratamiento crónico, los metabolitos que poseen el anillo A reducido fueron encontrados principalmente en forma de sulfato, mientras que NET inalterado y pequeñas cantidades del  $5\beta$ NET fueron encontrados en forma libre.

Los glucurónidos de los metabolitos  $3\alpha$ ,  $5\beta$ NET y  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET presentaron el mismo perfil cinético que los que se encontraban en forma de sulfato (97, 99).

En este estudio no se demostró una acumulación de los metabolitos de NET en sangre, después de un tratamiento largo, a pesar de que ya se había reportado un tiempo de vida media largo para éstos (42 a 83 hrs.) (95).

En los últimos años se han iniciado una serie de estudios para determinar si los metabolitos de NET poseen actividad de anticoncepción y en caso que la presenten, cuál es su mecanismo de acción (100).

De los primeros estudios realizados en ratas ovariectomizadas, existen evidencias de que el metabolito  $5\alpha$ NET inhibe a la LH y FSH vía receptores de los andrógenos y el  $3\beta$ ,  $5\alpha$ NET inhibe a la FSH vía receptores de los estrógenos, observándose además que estos metabolitos tienen una actividad anovulatoria más potente que la misma NET y que el  $3\alpha$ ,  $5\alpha$ NET (100).

#### 2.2.5 d) EXCRECION.

Las especies en las cuales se ha estudiado la excreción de la Noretindrona son la rata, el perro, el mono africano y el hombre.

Con respecto a la rata se ha demostrado que más del 90% de la dosis administrada por vía oral se elimina en un período de 24 hrs. después de la administración del esteroide. El 76% de la dosis eliminada, se excreta por heces y el 24% por orina, después de un período de 7 días (101). Después de 2 horas de una administración duodenal en la rata, el 65% de la dosis se excreta por vía biliar y después de 24 horas de la administración intravenosa de 50-150 mg/kg de NET, se elimina en heces y orina el 88% de la dosis en la misma proporción que la administración oral, con un tiempo de vida media de excreción biliar de 0.7 hrs. (101).

En el perro, el tiempo de vida media de eliminación es de 12.2 hrs. Después de 7 días de la administración oral de la Noretindrona, el 55% de la dosis ha sido eliminada en orina y el 43% en heces (87).

En el caso del mono Africano, se ha reportado que después de 7 días, el 58% de la dosis dada, administrada por vía oral, se elimina por la orina y el 40% por heces, (87), estos resultados no concuerdan con otros reportes que indican que el tiempo de vida media de excreción de NET es de 2.3 días en esta especie animal (87).

En diversos estudios en perros se ha encontrado que después de la administración oral de NET algunos de sus metabolitos se eliminan por heces en pequeñas cantidades (10%) (96).

Al administrar 10.23  $\mu$  Ci de  $^3\text{H}$ -NET a mujeres, se encontró que del 37% al 80.6% de la dosis administrada se excretó por orina como fármaco inalterado (95, 98).

Se ha demostrado además que algunos metabolitos de NET son eliminados por orina (95).

Tanto en el hombre como en los animales, la Noretindrona también se excreta por bilis, principalmente conjugada con glucurónido o sulfato (102,104). Estos conjugados, cuando alcanzan el lumen intestinal, son hidrolizados por las enzimas de la flora bacteriana intestinal liberando el esteroide original, el cual puede entonces ser reabsorbido a la circulación general y ser conjugado nuevamente para su excreción, completando de esta manera el ciclo de la recirculación enterohepática. El tratamiento con antibióticos orales modifica la flora bacteriana intestinal, interrumpiendo la recirculación enterohepática del esteroide por interferencia con el proceso hidrolítico, provocando por lo tanto una disminución en la reabsorción, un aumento en la excreción por heces y una disminución en la concentración plasmática de la hormona, lo que conduce a una disminución en la eficiencia de anticoncepción (102).

#### 2.2.5 e) BIODISPONIBILIDAD.

La biodisponibilidad de NET, después de una administración oral es incompleta en especies tales como la rata, el perro beagle y el mono rhesus. La biodisponibilidad absoluta en estas especies es del 31% en la rata, del 44% en el perro y del 17% en el mono - (88). Estudios con conejos también han demostrado una baja biodisponibilidad (50%) después de una administración oral (105). Esto se debe a que el sistema microsomal hepático de estas especies tiene una alta capacidad para reducir el anillo A de la Noretindrona (106) por lo que la cantidad de fármaco biodisponible es menor.

En humanos también se demostró que la Noretindrona sufre el efecto del primer paso, ya que su biodisponibilidad después de la administración oral fué incompleta (107). Se ha reportado que esta hormona sexual en mujeres tiene una biodisponibilidad absoluta del 64% (107).

En ratas, el área bajo la curva después de la administración de NET por la vena portal hepática, fué del 32% con respecto al área bajo la curva de una administración intravenosa, mientras que por vía oral fué solo del 13% con respecto a la vía intravenosa, por lo que estos resultados evidencian que la Noretindrona también puede metabolizarse en la pared intestinal (108).

El intestino normalmente está expuesto a un gran número de agentes exógenos, los cuales pueden alterar su capacidad para metabolizar compuestos, por lo tanto, el efecto de fármacos que se administran por tiempos prolongados puede ser de importancia considerable sobre su metabolismo en la pared gastrointestinal.

Se ha demostrado por ejemplo, que la vitamina C puede afectar la disposición de anticonceptivos esteroidales, ya que ésta compite con la hormona esteroide en la conjugación, permitiendo por tanto el incremento en la biodisponibilidad de NET (la vitamina C al igual que las hormonas esteroides se conjugan en el intestino formando compuestos sulfatados o glucorónidos) (109).

La capacidad de metabolismo tanto en la pared intestinal como en el hígado, es por lo tanto de gran importancia para la cantidad de NET que llega al plasma y por ende de su eficiencia de anticoncepción.

Se ha sugerido, que se puede obtener una liberación sostenida de las hormonas esteroides cuando éstas son suspendidas en medios oleosos y administrados en forma de cápsulas (110, 111).

Para el caso de la Noretindrona, se demostró que cuando ésta se suspendió en polietilenglicol 400 y se encapsuló, la cantidad absorbida se incrementó, con respecto a las formulaciones convencionales (tabletas) (112). Este aumento en la biodisponibilidad pudo deberse a que la hormona esteroide suspendida en el medio oleoso se absorbió por vía linfática, impidiendo de esta manera el efecto de primer paso (112). Por lo anterior se sugirió que este tipo de formulaciones pudieran ser útiles para mantener una mejor eficiencia de anticoncepción que las tabletas.

Para medir la eficiencia de anticoncepción de las cápsulas de Noretindrona suspendida en polietilenglicol 400, se les administró a un grupo de voluntarias sanas una cápsula diaria, conteniendo 0.5 mg de NET por un ciclo menstrual.

Se tomaron muestras plasmáticas a lo largo del tratamiento y se cuantificó FSH, LH, progesterona, estradiol, tomándose además muestras de moco cervical. Los resultados demostraron que en este tipo de formulación la NET no inhibió la ovulación, sin embargo los cambios observados en el moco cervical sugirieron que el efecto de anticoncepción se llevó a cabo predominantemente sobre éste (113). La incapacidad de las cápsulas de proveer niveles plasmáticos adecuados para suprimir la ovulación, pudo deberse a la inestabilidad de esta hormona en el polietilenglicol 400.

Estos resultados no concuerdan con los trabajos de otros autores, quienes, han reportado que se tienen concentraciones terapéuticas en plasma por períodos más prolongados de tiempo, cuando este esteroide es administrado en forma de cápsula que de tableta (108).

#### 2.2.5 f) INTERACCION DE LA NORETINDRONA CON FARMACOS.

Este efecto es de gran importancia, debido a que la interacción de las hormonas sexuales con algunos fármacos se disminuye su eficiencia de anticoncepción, produciendo además cambios en su farmacocinética o farmacodinamia.

Existen en la literatura, reportes de tres grupos de fármacos que interaccionan con la Noretindrona:

##### a) Antituberculosos.

Se estudió la farmacocinética de la noretindrona en un grupo de mujeres a las cuales se administró el fármaco solo y posteriormente con rifampicina.

Durante el primer ciclo menstrual del estudio se les administró diariamente un mg de NET y en las subsiguientes cinco semanas, además de la hormona sexual, se les dió un tratamiento con rifampicina (114).

Los resultados demostraron una disminución significativa en el valor del área bajo la curva (ABC) y en el tiempo de vida media de eliminación ( $t_{1/2}$  elim) de la noretindrona durante el tratamiento con rifampicina. La disminución del ABC, varió entre 4.2% y 69.4%, mientras que el  $t_{1/2}$  elim entre 27% y 78%, como consecuencia, la concentración total de NET circulante, en plasma se redujo, de 12.3 a 2.3 ng/ml.

Además hubo un incremento del 70% en la depuración de la rifampicina, del 245% en la velocidad de excreción del  $6\beta$  hidrocortisol y del 64% en la actividad de la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa.

Estos resultados corroboran la hipótesis de que la rifampicina es un agente antituberculoso potente, que induce a las enzimas hepáticas, que metabolizan a los anticonceptivos esteroidales, aumentando el metabolismo de NET y disminuyendo por ende la eficiencia de anticoncepción al disminuir la concentración plasmática de la misma (102).

##### b) Anticonvulsivos.

Se ha reportado sangrado intermenstrual y embarazos ocasionales en mujeres epilépticas, que están bajo tratamiento continuo con fármacos anticonvulsivantes y anticonceptivos esteroidales (115).

Los fármacos de este grupo, a los cuales se les ha demostrado este efecto son la fenitoína, el fenobarbital, la pirimidona y la carbamazepina (116, 117).

En un estudio en el que se administró simultáneamente fenitoína y Noretindrona a un grupo de mujeres epilépticas, se observó que la

concentración plasmática de NET se disminuía en un 70% en la relación a un grupo control, que había sido tratado únicamente con Noretindrona (118).

La disminución de la biodisponibilidad de NET durante el tratamiento con fenitoína, se reflejó en una disminución en la concentración plasmática máxima alcanzada y las concentraciones bajas en plasma, a través del tiempo de estudio. Estas diferencias pueden ser debidas a una inducción del sistema microsomal hepático, acelerando por tanto el metabolismo de NET (119).

En otros estudios también se ha encontrado este efecto, con fenobarbital (119) y otros fármacos anticonvulsivantes en mujeres epilépticas (120, 121).

En el mono Rhesus, se demostró una diferencia en la biodisponibilidad de NET con y sin tratamiento de fenitoína. La cantidad de hormona esteroide biodisponible fué menor en presencia del fármaco antiepiléptico. Esto debido, también a la inducción de enzimas hepáticas que metabolizan a NET (122).

En el caso de la rata y el conejo se ha demostrado que el fenobarbital incrementa el metabolismo de la Noretindrona, tanto en la pared intestinal, como en el hígado (105).

#### c) Antibióticos.

La interacción que existe entre la Noretindrona y los antibióticos es quizás la más importante y discutida, ya que muchas mujeres que toman anticonceptivos esteroidales reciben aún en pequeños períodos, tratamientos con antibióticos por enfermedades comunes.

Se ha reportado que mujeres que están tomando Noretindrona, se embarazan al tomar antibióticos (120, 123, 124).

En el estudio clínico en el cual se estudió el perfil cinético de la Noretindrona durante dos ciclos menstruales, en uno de los cuales se administró también ampicilina en dosis de 250 mg, tres veces al día del primero al 16° día del ciclo menstrual, no se observaron modificaciones en los niveles séricos de NET y los ciclos ovulatorios prevalecieron, por lo que se concluyó que la ampicilina no tuvo ningún efecto sobre el tratamiento de éste anticonceptivo oral. Sin embargo, es posible que durante los dieciseis días de tratamiento con el antibiótico, las bacterias hubiesen desarrollado resistencia a la ampicilina y por lo tanto no se observara efecto sobre la recirculación enterohepática de NET (109).

Existen estudios farmacológicos, que apoyan la interacción de antibióticos como la neomicina, la tetraciclina, las sulfonamidas, el metronidazol y las cefalosporinas con la Noretindrona (102). Sin embargo, otros trabajos presentan evidencias de una pobre o nula interacción (125, 126).

Algunos estudios en ratas indican que la ampicilina, la neomicina y las cefalosporinas, disminuyen la excreción biliar de la Noretindrona, encontrando una buena correlación entre la supresión de la recirculación enterohepática del esteroide y los cambios en la flora intestinal (127).

Cuando se administró rifampicina durante 24 hrs., ésta redujo la excreción biliar de la Noretindrona, no así cuando fué administrada por cuatro días consecutivos, lo cual se debió a que algunas bacterias de la flora intestinal (particularmente las aeróbicas), son resistentes a este antibiótico (127).

#### 2.2.6 ESTUDIOS FARMACOCINETICOS DE NET EN VOLUNTARIOS CLINICAMENTE SANOS.

Después de la administración oral de 0.3, 3.0 y 25 mg de Noretindrona a cuatro mujeres sanas con ciclo menstrual regular y a dos hombres sanos, se observó una concentración máxima en plasma (cpm<sub>máx</sub>) de 6, 30 y 120 ng/ml respectivamente. El tiempo requerido para alcanzar esta concentración (tm<sub>máx</sub>), fué el mismo para las tres dosis y fluctuó entre una y dos horas y media. No se encontraron diferencias entre sexos ni entre dosis con respecto a la velocidad de absorción, la cual fué rápida, ni con respecto a la velocidad de eliminación. En ambos sexos la hormona esteroide se ajustó a un modelo abierto de dos compartimientos (MADC), con un tiempo de vida media de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ) de 3.1 hrs. y uno de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) de 9.3 hrs.

Para todos los casos se observó además, una correlación lineal entre la dosis administrada y la concentración plasmática de Noretindrona (128).

Estos resultados concuerdan con los estudios de Warren y Colab. (129) quienes después de administrar 1 mg de Noretindrona a voluntarios sanos observaron una cpm<sub>máx</sub> de 6 ng/ml y un tm<sub>máx</sub> entre 1 y 2 hrs.

De igual manera reportan que NET se ajustó a un MADC con una  $t_{1/2\alpha}$  de tres horas y una  $t_{1/2\beta}$  de cinco horas. Después de 24 horas, la concentración plasmática fué de 0.2 ng/ml, lo que corresponde al 0.05% de la dosis en el volumen total de plasma.

La Noretindrona administrada en mujeres con ciclo menstrual regular en tres combinaciones comerciales diferentes (1 mg de NET + 0.05 mg Mestranol; 1 mg de acetato de NET + 0.05 mg Etinilestradiol y 1 mg de NET + 0.05 mg Etinilestradiol), presentó perfiles cinéticos muy semejantes. Los autores reportan un tm<sub>máx</sub> y un  $t_{1/2}$  para las tres combinaciones de 1 y 7 hrs. respectivamente, el valor de cpm<sub>máx</sub> en cambio, presentó una gran variabilidad intrasujetos pero no intersujetos; para la combinación de 1 mg de NET + 0.05 mg de Mestranol este valor fluctuó entre 7 y 16 ng/ml, para la de 1 mg de acetato de NET + 0.05 mg de Etinilestradiol entre 9 y 12 ng/ml y para la de 1 mg de NET + 0.05 mg de Etinilestradiol entre 4 y 13 ng/ml (130).

En otro trabajo, en el cual también se estudió el comportamiento cinético de cuatro formulaciones comerciales diferentes conteniendo Noretindrona, se encontró que diferentes preparaciones con dosis y combinaciones idénticas de NET y estrógeno pueden presentar distintos perfiles plasmáticos (131).

Este estudio se llevó a cabo en cuatro grupos de 3 mujeres cada uno, con ciclo menstrual regular; a cada grupo se le administró una formulación diferente, durante cinco días a partir del 5° día del ciclo menstrual. El primero y segundo grupo recibieron 1 mg de NET + 0.05 mg de mestranol de diferente marca comercial, el tercer grupo tomó una combinación de 0.5 mg de NET con 0.035 mg de etinil estradiol y al cuarto grupo se le administró una dosis de 0.350 mg de NET sin estrógeno. En todas las voluntarias se observó un modelo abierto de dos compartimientos (MADC), con un  $t_{1/2}$  de la fase de distribución ( $t_{1/2\beta}$ ) de 2.3, 3.4, 3.9 y 4.4 hrs. para los grupos 1°, 2°, 3° y 4° respectivamente. El  $t_{m\acute{a}x}$  para los 4 grupos varió entre 0.5 y 4 hrs. con un valor promedio de 1.5 hrs. y el  $c_{p\acute{m}ax}$  promedio para el primer grupo fué de 10.2 ng/ml, para el segundo de 10.4 ng/ml, para el tercero de 7.5 ng/ml y para el cuarto de 4.3 ng/ml. En el segundo grupo se observó que las concentraciones plasmáticas de NET después de la cuarta y quinta dosis fueron mayores que las cuantificadas después de la primera y segunda administración. Este aumento pudo deberse al incremento de los metabolitos de NET en suero, los cuáles pueden ser cuantificados como Noretindrona.

Estudios posteriores (89) reforzaron lo antes mencionado, donde no sólo se observaron perfiles cinéticos diferentes después de la administración oral de distintas dosis y combinaciones de NET, sino también una gran variabilidad intrasujetos, quizás debido a una diferencia en el metabolismo de NET.

En este estudio (89), se observó una concentración plasmática promedio en el estado estacionario de 5.9 ng/ml para la combinación de 1 mg de acetato de NET + 0.050 mg de EEz; 8.3 ng/ml para el preparado de 3 mg de acetato de NET + 0.050 mg EEz y 4.8 ng/ml para la formulación de 1 mg de NET + 0.020 mg de EEz. Es importante hacer notar que a las pacientes a las que se les administró el combinado con 3 mg de NET alcanzaron concentraciones plasmáticas en el estado estacionario 1.4 veces mayores que el preparado con 1 mg de NET, cuando se esperaba que fuese cuando menos 3 veces más alto.

En este estudio, al igual que en reportes anteriores (130, - 131), la cinética de NET fué de un MADC con una  $t_{1/2\beta}$  (fase terminal) de 9.2 hrs. después de la administración de una dosis única y de 9.7 hrs. después de que se dieron dosis múltiples (por 3 ó 4 ciclos menstruales).

De forma simultánea se determinó la capacidad de unión de la globulina que une hormonas sexuales (SHBG) y se observó que la capacidad de adhesión se incrementaba cuando la concentración plasmática

de NET era mayor. Esta capacidad era mayor en mujeres tratadas después del parto, que en aquellas que nunca se había embarazado. Estos resultados concuerdan con otros trabajos publicados en la literatura (91-94).

En otro estudio, en el cual también se administraron diferentes dosis y combinaciones de NET a voluntarias sanas, en dosis única (a la mitad del ciclo menstrual) (105), se observó que el fármaco se ajustaba a un MADC con un  $t_{m\acute{a}x}$  de una a dos horas,  $t_{1/2\alpha}$  de 0.41 a 0.26 hrs.,  $t_{1/2\beta}$  de 4.8 a 12.8 hrs., una depuración total (cl) promedio de 362 ml/kg/hr. y un volumen de distribución (vd) de 4.06 l/kg, los cuales se encuentran dentro del intervalo reportado por otros autores (129-131), así mismo estos valores no se vieron alterados con la coadministración del etinil estradiol. Para determinar la biodisponibilidad absoluta (Fabs) de NET, estos autores (107) administraron por vía intravenosa un combinado de 1 mg de NET + 0.050 mg de EEz disueltos en una mezcla de etanol: agua. El valor promedio de biodisponibilidad fué del 64%. Este valor tan bajo pudo deberse a una absorción incompleta de NET, más sin embargo está reportado que esta hormona se absorbe completamente después de una administración oral (111), por lo que la disminución pudo deberse al efecto de primer paso (106, 108).

La biodisponibilidad de la Noretindrona, después de la administración oral de 3 mg de NET fué significativamente menor (52%) que cuando se administró 1 mg de NET (64%). Algo similar había sido demostrado por Okerholm y Colab. (132), los cuales observaron que el ABC después de una dosis oral única de 20 mg de NET, fué solamente dos veces mayor que el ABC al administrar 5 mg de esta hormona esteroide. Estos datos también se relacionan con el estudio de Bach y Colab. (89).

Una posible explicación a este comportamiento, es que cuando las dosis administradas son grandes, la concentración de la hormona en la vena portal hepática sobrepasa la capacidad de unión de SHBG, lo cual podría conducir a un incremento en la concentración de NET libre en la vena portal, aumentando su depuración hepática (107).

Okerholm y Colab. (132) al efectuar un estudio en hombres y mujeres encontró que los niveles en plasma de NET fueron considerablemente mayores en mujeres que en hombres, sobre todo cuando se administraron dosis de 5 mg.

Las  $c_{p\acute{m}ax}$  para el sexo femenino fueron de 42, 63 y 84 ng/ml después de la administración de 5, 10 y 20 mg de NET respectivamente y para el sexo masculino a estas mismas dosis las  $c_{p\acute{m}ax}$  fueron 20, 39 y 71 ng/ml respectivamente. Sin embargo no se encontraron diferencias entre sexos con respecto al  $t_{m\acute{a}x}$  (1-4 hrs.), la  $t_{1/2}$  (4.9-5.5 hrs.) y la velocidad de absorción ( $k_a$ ) (1.6-1.8 hrs.). El valor de la velocidad de absorción reportada en este trabajo (132), fué la primera estimación de este parámetro en humanos.

Los trabajos posteriores de NET fueron haciéndose más escasos, pero más completos (133-136), ya que no sólo se aumentó el número de parámetros farmacocinéticos calculados sino también el tamaño de la población estudiada.

En un análisis farmacocinético realizado después de la administración oral de un combinado de NET y EEz en forma de tableta y solución (135), se observó que la velocidad de absorción de NET de la tableta y la solución fueron significativamente diferentes, así como el ABC (la cual fué mayor para la tableta que para la solución: 84 y 68 ng/ml hr respectivamente); no así la  $c_{p\text{máx}}$ ,  $t_{\text{máx}}$ , el  $t_{1/2\alpha}$  y  $\beta$  los cuales fueron comparables con los reportados por otros autores quienes también trabajaron con poblaciones grandes (24 voluntarios o más) (133, 136).

El conocimiento de que la secreción de ciertas hormonas, así como la concentración de algunos constituyentes plasmáticos y los procesos metabólicos, muestran una variación circadiana (137, 138), permitió que algunos autores (139) postularon que la farmacocinética de NET y por tanto su eficiencia de anticoncepción fuese diferente cuando la administración se efectuaba en la mañana y no por la noche como se administra normalmente. Sin embargo, Kiriwat y Colab. (139) demostraron que el horario no es importante, ya que los parámetros farmacocinéticos de NET no mostraron diferencias estadísticamente significativas, ni la eficiencia de anticoncepción se vió modificada. Los parámetros farmacocinéticos reportados en este estudio son comparables con los calculados en trabajos anteriores observándose también grandes variaciones interindividuales.

Se ha demostrado que el estado nutricional de las personas, influye considerablemente en el metabolismo de algunos fármacos (141) y por lo tanto en la dosis que se requiere para obtener una respuesta terapéutica adecuada. A pesar de su gran importancia clínica, son pocos los estudios que relacionan la farmacocinética de NET con el estado nutricional de la mujer (134, 142). Estos trabajos se realizaron con dos grupos de mujeres Indúes, uno de nivel socioeconómico alto (NSA) y otro bajo (NSB), a las cuales se les administró una dosis de 0.350 mg de NET. Para ambos grupos el  $t_{\text{máx}}$  fué de 1 a 2 hrs. el valor de  $c_{p\text{máx}}$  para el grupo de NSA se encontró en el intervalo de 7.7 y 12.3 ng/ml y para el de NSB entre 4.7 y 14.8 ng/ml. No hubo diferencias con respecto a la velocidad de absorción ( $K_a = 1.73 \text{ hr}^{-1}$  para NSA y  $1.15 \text{ hr}^{-1}$  para NSB), pero sí para la velocidad de distribución y eliminación; el grupo de NSB la eliminó más rápidamente ( $t_{1/2\beta} = 5.9 \text{ hrs.}$  para NSB y  $13.4 \text{ hrs.}$  para NSA). De acuerdo con los resultados obtenidos se postuló que NET puede tener una depuración renal mayor en mujeres con NSB, lo cual implica que para este grupo se requerirán dosis mayores para mantener niveles adecuados de NET en el plasma a tiempos prolongados (12 a 24 hrs.).

Los resultados obtenidos sugirieron que el estado nutricional tiene una implicación importante respecto a la disposición de NET, y que la semejanza en la depuración pudo deberse a una diferencia en

la proporción de la fracción libre y unida de Net, sin descartar la posibilidad de una alteración en la actividad enzimática como resultado de la desnutrición.

En la mayoría de los trabajos se ha observado una gran variabilidad interindividual tanto en los perfiles plasmáticos como en los parámetros farmacocinéticos de NET. Estas diferencias pueden deberse entre muchos factores a aquellos que involucran las condiciones ambientales, constitución física, estado nutricional, capacidad metabólica y contenido de proteínas plasmáticas de la mujer que está sometida al tratamiento con anticonceptivos orales (107, 109, 134).

Los factores antes mencionados, producen en algunas mujeres una disminución en los niveles séricos de la hormona esteroide, provocando por ende una pérdida en la eficiencia de anticoncepción, en otras mujeres estos niveles plasmáticos se ven aumentados, por lo que el riesgo de efectos indeseables es mayor.

Una alternativa que se presenta para mantener con concentraciones plasmáticas de NET dentro del índice terapéutico, son las formulaciones de liberación sostenida (111, 113). Se ha postulado además de que con estas preparaciones sería posible proteger a la molécula de NET del efecto de primer paso, produciendo por ende un aumento en su biodisponibilidad (113, 114).

## 2.3 FORMULACIONES DE LIBERACION SOSTENIDA.

### 2.3.1 INTRODUCCION.

Algunos fármacos presentan una baja biodisponibilidad debido al efecto del primer paso, o por problemas de absorción, lo que obliga a dar dosis grandes para poder garantizar un buen efecto terapéutico. Algunos otros se eliminan rápidamente del organismo ( $t_{1/2}$  elim. pequeña), por lo que su tiempo de permanencia en el mismo es corto, por ello es necesaria la administración de dosis múltiples en intervalos pequeños de tiempo para mantener una eficiencia terapéutica adecuada y constante. Existe el caso, como el de las progestinas sintéticas que se absorben rápidamente, dando origen a concentraciones en plasma muy por encima del índice terapéutico y por ende a efectos secundarios indeseables.

En el caso de los tratamientos crónicos, en los cuales es necesario que se administren dosis grandes del fármaco por tiempos prolongados, existe la posibilidad de que este se acumule en el organismo produciendo concentraciones tóxicas en plasma, con los consecuentes efectos indeseables.

Una alternativa que se ofrece a los fármacos que presentan cualquiera de las características desfavorables antes mencionadas son las formulaciones de liberación sostenida (F.L.S.), las cuales permiten una liberación constante del fármaco a partir de la forma farmacéutica, manteniendo concentraciones de éste en niveles adecuados en

el organismo, por tiempos prolongados. (144). Esta propiedad permite además, reducir la dosis administrada sin comprometer el efecto terapéutico, disminuyendo así el riesgo de efectos secundarios indeseables.

### 2.3.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACION SOSTENIDA.

Los sistemas de liberación sostenida, presentan una serie de ventajas sobre las vías convencionales de administración de fármacos (144):

- a) Los niveles plasmáticos del fármaco se mantienen constantes dentro del rango terapéutico.
- b) Los efectos indeseables que se producen en la administración sistémica pueden disminuirse o eliminarse al administrar localmente un sistema de liberación sostenida.
- c) Pueden administrarse fármacos que poseen una vida media pequeña.
- d) Pueden administrarse dosis menores a las convencionales sin disminuir la eficiencia terapéutica.
- e) Se logra una mayor estabilidad del fármaco.
- f) Es posible aumentar la biodisponibilidad de los compuestos al proteger al fármaco del efecto de primer paso.
- g) Algunos métodos y compuestos para la preparación de este tipo de sistemas son económicos.

Sin embargo, las desventajas que presentan las formulaciones de liberación sostenida son:

- a) Toxicidad o falta de biocompatibilidad del implante empleado como sistema de liberación controlada.
- b) Toxicidad de los productos empleados para la elaboración de este tipo de formulaciones.
- c) En el caso de los implantes subdermales se requiere de cirugía menor para colocarlos.
- d) En algunos sistemas, los componentes empleados son caros y por ende poco accesibles.
- e) La velocidad de liberación in vivo puede en algunos casos, no corresponder a lo obtenido in vitro

### 2.3.3 TIPOS DE SISTEMAS DE LIBERACION SOSTENIDA.

Los primeros intentos para lograr formulaciones de liberación sostenida para los fármacos se realizaron utilizando capas de disolución lenta, complejos de fármacos con sales o con resinas de intercambio iónico, suspensiones, emulsiones o tabletas comprimidas (144), sin embargo estos métodos sólo permitían la liberación sostenida por un día y la velocidad de liberación estaba sujeta a grandes variaciones como el pH del tracto gastrointestinal, motilidad, vaciamiento gástrico, etc.

Más recientemente, se han utilizado polímeros y bombas peristálticas (144), productos revestidos con delgadas capas poliméricas (145) y mezclas eutécticas del fármaco con esteroides (146).

Actualmente, se han diseñado sistemas de liberación sostenida para ser administrados como: implantes subdérmicos (144), por vía oral (145) y productos inyectables por vía intramuscular (144).

#### 2.3.3 a) IMPLANTES

Normalmente están formados por polímeros. La liberación del fármaco, se lleva a cabo bajo tres diferentes mecanismos (difusión, químico y activación de solventes), los cuales dependen del tipo de polímero empleado (144).

##### a) Difusión.

Existen dos tipos de implantes que liberan el fármaco por difusión, uno es el conocido como depósito en el cual un núcleo del fármaco es rodeado por una película del polímero el cual no es biodegradable. Este presenta la desventaja de que si se llegase a romper, el fármaco se liberaría bruscamente alcanzándose niveles tóxicos en el organismo; además no es posible emplear fármacos con peso molecular grande.

El segundo tipo es el sistema de matriz en donde el fármaco es distribuido homogéneamente en el polímero. Las principales ventajas de este sistema son su bajo costo de manufactura y su seguridad relativa en el caso de que se llegase a romper. Mientras que entre las desventajas se encuentra que se emplean polímeros no biodegradables y no siempre se logra una velocidad de difusión constante. A este sistema también se le conoce como microesfera.

##### b) Químico.

En los sistemas controlados químicamente, la liberación del fármaco está regulada por una reacción química con el polímero. Existen dos sistemas de control químico. El primero consiste en la erosión o biodegradación del polímero. Esta propiedad ofrece una ventaja significativa sobre los polímeros no biodegradables, ya que

el cuerpo puede absorberlo y no es necesario estarlo removiendo e implantando constantemente. Sin embargo, una desventaja es la posibilidad de que los productos absorbidos sean tóxicos, inmunogénicos ó carcinogénicos.

Al segundo tipo, se le conoce como sistema de cadena pendiente, en el cual el fármaco se liga por uniones químicas ó grupos espaciadores a un polímero resistente. La velocidad de liberación del fármaco depende de la hidrofiliidad del polímero resistente, o bien por la ruptura de la unión fármaco-polímero por una reacción enzimática.

c) Activación de solventes.

Esta tercera categoría involucra un mecanismo de hinchamiento u osmosis. En el sistema controlado por hinchamiento, el fármaco está disperso en el polímero, cuando el polímero exterior está ex puesto a los fluidos biológicos éste se hincha permitiendo que el fármaco difunda al exterior.

En el sistema controlado osmóticamente, el agua penetra a la matriz polímero-fármaco por la presión osmótica producida en el medio biológico, formándose poros por los cuales se facilita la liberación del fármaco. La ventaja de este sistema es que la presión osmótica es una fuerza constante. Sin embargo, estos sistemas no siempre proporcionan una liberación constante del fármaco.

También se han empleado implantes lípido-esteroide para proveer un sistema de liberación sostenida (147). Para ello el lípido y el esteroide se mezclan en proporciones adecuadas para obtener una liberación constante del esteroide; el inconveniente en este tipo de sistema es el que no se obtiene reproducibilidad en la composición del implante y por ende la velocidad y la cantidad de esteroide liberado varía grandemente entre implante e implante producido.

Posteriormente se demostró que una mezcla eutéctica del esteroide con esteroides no sólo mantiene una liberación controlada de la hormona por tiempos largos, sino que además este sistema es reproducible (146).

El mecanismo de liberación en este sistema es principalmente por difusión y se han empleado esteroides tales como colesterol y  $\kappa$ -sitoesterol.

Los sistemas que emplean una mezcla eutéctica del fármaco con esteroides son de los pocos que realmente logran una cinética de liberación de orden cero in vivo (146).

### 2.3.3 b) FORMAS DE DOSIFICACION ORAL.

El revestimiento de películas es un proceso que involucra la aplicación de una película polimérica delgada, (compuesta de polímeros, plástico, colorantes y posiblemente aditivos). Aunque este proceso es empleado para dar una "calidad estética" a las formulaciones de dosificación oral (148), es ideal para modificar la liberación del fármaco, logrando una formulación oral de liberación sostenida (145).

Existen tres mecanismos que pueden ser empleados para lograr una liberación sostenida de formas orales aprovechando la técnica de revestimiento de películas: difusión del fármaco, disolución o erosión del polímero y osmosis (145).

#### a) Difusión del fármaco.

En este sistema la tableta o el gránulo se cubre con un polímero insoluble en agua, (sólo o en combinación con un ingrediente soluble en agua), con el fin de que el agua o el fluido gastrointestinal pueda penetrar a través de la película y disolver el fármaco del centro, facilitándole su difusión al exterior.

La ventaja de este sistema es que la liberación del fármaco es independiente del pH gastrointestinal y de la motilidad gástrica, pero sí depende de algunas propiedades específicas del fármaco, como su pka y solubilidad.

#### b) Disolución o erosión del polímero.

En este sistema la tableta o gránulo se cubre con una película polimérica de solubilidad variable, la cual es dependiente del pH, de tal forma que la liberación del fármaco va a estar determinada por la velocidad de disolución de la película.

#### c) Osmosis.

En este sistema la tableta o gránulo se cubre con una membrana semipermeable a la cual se le hacen unos pequeños orificios. El agua o el fluido gastrointestinal pasa a través de la membrana por osmosis a una velocidad controlada, determinada por la permeabilidad de la película polimérica y el núcleo de la formulación, disolviendo el fármaco en el centro.

Debido a que la película polimérica no permite una expansión de volumen de este sistema, el fármaco en solución puede salir por los orificios a la misma velocidad que el agua penetra por osmosis.

La liberación del fármaco de este tipo de sistema es independiente del pH gastrointestinal y de la motilidad gástrica.

### 2.3.3 c) FORMULACIONES INTRAMUSCULARES DE LIBERACION SOSTENIDA.

Generalmente, se elaboran a base de polímeros y en forma de microcápsulas. La microencapsulación comprende la cubierta de pequeñas gotas o partículas con paredes sólidas (normalmente polímeros) conformando así una forma encapsulada con diámetros que van desde uno - hasta varios cientos de micrometros (149).

La microencapsulación básica puede dividirse en tres procesos diferentes, el químico, el fisicoquímico y el mecánico (150).

#### a) Microencapsulación química.

Este proceso es una polimerización interfacial, el cual requiere de dos monómeros en un sistema de fase doble. Un monómero forma parte de una fase continua de una emulsión y el otro está disuelto dentro de pequeñas gotas de una emulsión, la cual también contiene el fármaco.

En este sistema, el fármaco se libera en la barrera interfacial - después de una reacción química.

#### b) Microencapsulación fisicoquímica.

En este tipo de microencapsulación existen tres procesos diferentes. El más importante es el de separación de fases o coacervación, ésta es la técnica más elaborada que se conoce para la microencapsulación de compuestos. En este sistema el fármaco se libera por difusión.

El segundo proceso es el conocido como emulsión compleja, en ésta se forma una emulsión de tipo agua en aceite, la cual se dispersa en una solución acuosa que contiene un coloide, formándose de esta manera una emulsión compleja de tipo agua-aceite-agua.

El tercer proceso de microencapsulación fisicoquímica es el de "dispersión fundible", en este sistema se emplean soluciones de polímeros hidrofílicos. El fármaco se libera de este tipo de sistemas al erosionarse la pared que lo encapsula.

#### c) Microencapsulación mecánica.

En este tipo, las partículas sólidas del fármaco son suspendidas en el aire usando la técnica de "lecho fluidizado".

La liberación del fármaco de este tipo de microencapsulación al - cual también se le conoce como "cubierta de lecho fluidizado", se realiza o bien por erosión debido a una biodegradación o por simple difusión a través del polímero intacto.

#### 2.3.4 APLICACIONES CLINICAS DE LAS FORMULACIONES DE LIBERACION SOSTENIDA.

##### 2.3.4 a) ENFERMEDADES OCULARES.

El primer sistema de liberación sostenida utilizado en estas enfermedades fué un implante de polímero y pilacarpina, para el tratamiento de glaucoma (151). Con éste se logró un mejor control de la presión intraocular a dosis menores que las convencionales y con la ventaja de que el dispositivo se coloca una vez por semana, en lugar de la administración de gotas cuatro veces al día. Los inconvenientes que se presentaron fueron problemas en la inserción o retención y la molestia de implante ya que éste es colocado debajo del párpado inferior.

##### 2.3.4 b) APLICACION DENTAL.

Se han diseñado dispositivos de liberación sostenida que se colocan en la cavidad bucal para mantener niveles constantes de flúor durante 30 a 180 días (152). La desventaja de este tipo de dispositivos es que si estos se llegasen a romper y se ingiriera todo el contenido que normalmente están en dosis de 200 a 485 mg, se alcanzarían concentraciones tóxicas en el organismo.

Para infecciones dentales se han diseñado unas fibras a base de acetato de celulosa, a las cuales se les incorpora tetraciclina. Estos dispositivos también pueden ser colocados sobre los dientes lográndo una liberación controlada del antibiótico por tiempos prolongados reduciendo por lo tanto el número de bacterias (153).

##### 2.3.4 c) INMUNIZACION.

Los métodos convencionales para inmunizar animales y al humano, requieren normalmente de inyecciones múltiples que pueden provocar irritación en el tejido. En algunos casos como en el tratamiento de alergias, las inyecciones tienen que ser administradas semanalmente por largos períodos que cubren hasta varios años, por lo cual se postuló la posibilidad de diseñar sistemas de liberación sostenida que con una sola administración proporcionaran una respuesta tan efectiva como las dosis múltiples. Los primeros ensayos se realizaron en ratas a las cuales se les administró subcutáneamente un implante elaborado en base a polímeros y albúmina sérica bovina como antígeno, observándose que la respuesta inmune inducida por el antígeno en el polímero fué comparable o superior a la inducida por la misma dosis del antígeno empleando la técnica convencional (una aplicación inicial y cuando menos 2 de refuerzo). Con este implante se logró una respuesta inmune por seis meses y sin irritación en el tejido (154).

#### 2.3.4 d) CANCER.

También se han diseñado formulaciones de L.S. para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, se han usado implantes de silicona que liberan testosterona por un año en pacientes con cáncer de próstata (155). Para cáncer de próstata y de mama, también se han empleado microcápsulas que son administradas subcutáneamente una vez al mes. Estas formulaciones se preparan utilizando el proceso de separación de fases empleando una matriz polimérica y un análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (156).

#### 2.3.4 e) ANTAGONISTAS NARCOTICOS.

La naltrexona es un antagonista narcótico que se emplea para desintoxicar a personas dependientes de sustancias opioides. Este antagonista tiene un tiempo de vida media pequeña, por lo que se requieren de administraciones frecuentes y por varios meses, lo que resulta molesto para el paciente. Para contrarrestar esto se han diseñado sistemas de liberación sostenida empleando polímeros biodegradables como el ac. láctico y el glicólico, dichos implantes subcutáneos pueden liberar constantemente naltrexona por 50 días (157).

#### 2.3.4 f) DIABETES.

Para este tipo de patología, los estudios para la aplicación de formulaciones de L.S. se encuentran en fase preclínica. En ratas diabéticas, se han logrado disminuir los niveles de glucosa en sangre por la liberación constante de insulina por un mes a partir de implantes subcutáneos compuestos de acetato de vinil-etileno (158).

#### 2.3.4 g) ARTRITIS.

Se han diseñado microesferas cubiertas con polímeros inertes que proporcionan una liberación lenta de indometacina para el tratamiento de la artritis. Los estudios en humanos han demostrado que la formulación oral de liberación sostenida presenta una velocidad de absorción más prolongada y uniforme, proporcionando niveles en plasma sostenidos después de la ingestión y obteniendo una biodisponibilidad mayor que el tratamiento con cápsulas convencionales (159, 160).

#### 2.3.4 h) ANTICONCEPTIVOS.

La aplicación de la tecnología de los sistemas de liberación sostenida a la anticoncepción puede proporcionar además de seguridad y eficiencia, una disminución de la cantidad del esteroide en el organismo, disminuyendo por ende el riesgo de efectos indeseables (161). Actualmente existen seis tipos de formulaciones de liberación sostenida como métodos de anticoncepción:

a) Inyecciones mensuales:

Presentan la ventaja de proporcionar un mejor control del ciclo menstrual que otros métodos, con la desventaja de que tiene que administrarse una vez al mes, lo cual puede ser molesto para la usuaria.

Estas formulaciones pueden estar constituidas por la combinación de un estrógeno y por un prostágeno o el prostágeno sólo. La liberación del esteroide es prolongada por la esterificación de la hormona o bien por el empleo de una suspensión de microcristales. Para este tipo de formulaciones se han empleado, acetato de medroxiprogesterona (MPA), norgestrel, enantato de Noretindrona y estradiol (162).

b) Inyecciones de acción prolongada.

Estas formulaciones disminuyen los efectos indeseables producidos por los anticonceptivos orales y las inyecciones de esteroides mensuales. Una desventaja es que el retorno a la fertilidad es lento después de que se ha interrumpido el uso de estas inyecciones, las cuales pueden liberar cantidades constantes del esteroide hasta por 12 meses. La acción tan prolongada se debe al empleo de profármacos o compuestos con solubilidad limitada en microesferas (161). Los esteroides empleados por estos productos son el MPA y el enantato de NET, en este último la acción tan prolongada, se debe a la baja velocidad con la que el enantato es hidrolizado a Noretindrona, la cual es la responsable de la acción de anticoncepción (163, 164).

c) Dispositivo intrauterino.

Este tipo de dispositivo tiene la ventaja sobre la vía sistémica de que disminuye considerablemente la cantidad total del esteroide en el organismo (ya que se coloca directamente sobre el aparato reproductivo), sin comprometer su efectividad anticonceptiva. Al reducir la cantidad del esteroide, se pueden disminuir o eliminar completamente los efectos secundarios indeseables sistémicos y el posible desarrollo de cáncer. Otra ventaja es que la acción anticonceptiva desaparece al retirarse el dispositivo. Sin embargo, el dispositivo intrauterino aumenta las irregularidades menstruales en algunos casos, además de que éste sólo puede ser colocado por personal médico calificado (161).

Actualmente se emplean en la clínica dos tipos de dispositivos intrauterinos. Uno que contiene progesterona dentro de la parte vertical de un dispositivo en forma de T, el esteroide se libera con una velocidad de 65  $\mu\text{g}$  por día durante por lo menos un año, (165) y el Cu-7, el cual es un dispositivo en forma de 7 de polipropileno con 89 mg de alambre de cobre cubriendo el brazo vertical, con una velocidad de liberación de 9.87  $\mu\text{g}$  por día durante -

40 meses. El mecanismo de antifertilidad del cobre no está bien definido, pero se ha postulado que altera a los receptores de esteroides o bien que modifica el metabolismo celular (166). Para ambos dispositivos, la expulsión de la cavidad uterina es el efecto indeseable más frecuentemente reportado.

d) Anillo vaginal.

El anillo vaginal representa otro sistema de liberación de esteroides directamente sobre el aparato reproductivo. Esto permite al igual que el dispositivo intrauterino, la disminución de la cantidad total del esteroide en el cuerpo y por ende de los efectos indeseables sistémicos (161).

El anillo vaginal está hecho de silastic, tiene un diámetro entre 60 y 50 mm y un grosor de 7 a 10 mm. Dentro del anillo se colocan cantidades suficientes del esteroide para lograr una liberación continua por un período de 6 a 7 ciclos menstruales. Los esteroides más comúnmente empleados son el MPA, NET (con una velocidad de liberación de 50 ó 200  $\mu\text{g}$  por día), norgestrel y levonorgestrel (161). Algunos anillos emplean la combinación del progestágeno y el estrógeno, como es el caso del que contiene levonorgestrel + estradio, con una velocidad de liberación de 290  $\mu\text{g}$  y 180  $\mu\text{g}$  por día respectivamente (144).

El anillo se coloca en la vagina al principio del ciclo menstrual y se utiliza continuamente por tres semanas, después de las cuales se remueve para permitir el sangrado. La inserción o remoción puede ser realizada por la misma usuaria. El mecanismo de acción es doble, ya que no sólo se inhibe la ovulación, sino que también hay un efecto sobre el moco cervical dificultando la penetración de los espermatozoides (167).

Se han empleado otros anillos vaginales que utilizan en lugar de un esteroide un agente espermicida como el nonoxinol (166).

e) Implantes subdermales no biodegradables.

Un quinto método para la liberación controlada de esteroides incluye el empleo de polímeros no biodegradables como el "silastic". A este polímero se le da una forma de cápsula o barra conteniendo en el centro el esteroide el cual es implantado en forma subdérmica. Su acción de anticoncepción, puede mantenerse por 6 ó 7 años y ser interrumpida con el simple retiro del implante. Las desventajas que presentan son irregularidades en el sangrado menstrual y efectos secundarios sistémicos, así como el hecho de que estos dispositivos solo pueden ser implantados o removidos por personal médico especializado (161).

El implante más empleado en la clínica es el que contiene Levonorgestrel; normalmente se colocan seis cápsulas de 34 mm de largo, conteniendo cada una 36 mg del esteroide, las cuales liberan al Levonorgestrel por un período de 6 a 7 años, en una proporción de 70  $\mu\text{g}/\text{día}$ . Los reportes han indicado una alta eficiencia de anticoncepción, la cual se debe a la inhibición de la ovulación o de la función luteal (168).

Otros esteroides que también han sido empleados son el estradiol, el ST 143 que es un derivado del 19-norprogesterona y que es 7 veces más potente para inhibir la ovulación que el levonorgestrel (169) y la Noretindrona (170).

f) Implantes subdermales biodegradables.

Lo más reciente que se conoce para el diseño de sistemas de liberación sostenida de esteroides anticonceptivos, es el empleo de polímeros biodegradables (161). Estos parecen proporcionar un mejor sistema ya que pueden liberar al esteroide a una velocidad programada por lo cual se pueden eliminar las irregularidades menstruales que se asocian con los niveles altos del esteroide.

El inconveniente es que en este tipo de implantes se emplean dosis mucho mayores que las de otros métodos. Después de la implantación o inyección, el dispositivo puede ser empleado por tres meses o más, posteriormente éste es absorbido por el organismo, la desventaja es la posible toxicidad de los componentes del polímero empleado. Los polímeros que han sido estudiados para el desarrollo de este tipo de implantes son: poliortoéster (171); poli E-caprolactona (172); polipéptidos compuestos de ac. glutámico (173, 174) y ácido poliláctico o ácido láctico-glicólico (175).

Los principales esteroides empleados son la Noretindrona y el levonorgestrel (176).

Se ha reportado que las microesferas de ac. poliláctico y NET pueden liberar el esteroide cuando menos durante seis meses; el polímero posteriormente se degrada por hidrólisis del ac. láctico, en un período de 20 meses (175).

Debido a que este polímero se acumula en el organismo después de la administración de dosis múltiples y por su tiempo tan prolongado de biodegradación, se han desarrollado microcápsulas preparadas a base de copolímeros; con éstos se ha logrado una liberación de la Noretindrona por tres meses y la degradación del copolímero en seis meses (177). Algunos otros estudios han empleado poli E-caprolactona y levonorgestrol, con este tipo de implante se ha logrado una liberación del esteroide por difusión, durante un año (178).

También se han preparado implantes subcutáneos compuestos de un pelet de Noretindrona fusionada con colesterol. Con éstos se ha logrado una velocidad de liberación constante del esteroide por seis ciclos menstruales; La desventaja de este sistema es el sangrado intermenstrual que se presenta durante los dos o tres primeros meses de uso del implante (179).

### III. PARTE EXPERIMENTAL

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 DETERMINACION DE LA PUREZA DE NET UTILIZADA.

Antes de preparar las formulaciones de Noretindrona fué necesario determinar la pureza de ésta.

##### 3.1.1 EQUIPO.

- Aparato para determinar punto de fusión con capilar. Thomas Hoover.
- Espectrofotómetro de infrarojo. Perkin-Elmer 599 B.
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible. Perkin-Elmer 202.
- Lámpara de luz ultravioleta.

##### 3.1.2 REACTIVOS.

- Noretindrona. Donada por los laboratorios Syntex, No. de Lote C3 CT - 002.
- Silica gel. Merck.
- Acetato de etilo. Merck.
- Benceno. Merck.
- Etanol absoluto. J.T. Baker.

##### 3.1.3 METODOS EMPLEADOS PARA DETERMINAR LA PUREZA DE NET.

###### 3.1.3 a) PUNTO DE FUSION.

###### 3.1.3 b) CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Para determinar el Rf de NET se utilizó la cromatografía en capa fina, para lo cual se emplearon placas de vidrio de 6 x 2.5 cm recubiertas con sílica gel y como fase móvil una mezcla de acetato de etilo: benceno (60:40).

La mancha obtenida se localizó utilizando una lámpara de luz ultravioleta.

###### 3.1.3 c) ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA.

###### 3.1.3 d) ESPECTRO DE ABSORCIÓN EN INFRAROJO.

### 3.2 DESARROLLO DE LA FORMULACION QUE SE PROPONE DE LIBERACION SOSTENIDA Y DE LA FORMULACION CONTROL.

#### 3.2.1 EQUIPO.

- Parrilla de calentamiento.
- Agitador Vortex
- Balanza analítica. Mettler.
- Microscopio óptico. Zeiss.
- Espectrofotómetro. Beckman DB
- Hemocitómetro.

#### 3.2.2 REACTIVOS.

- Noretindrona. Donada por los laboratorios Syntex de México
- Lactosa. Donada por los laboratorios Up John de México
- Colesterol. Pharmacia.
- Cápsulas de gelatina dura del No. 3. Donadas por Searle.
- Hielo seco.
- Acetona. R.A. Baker.
- Eter etílico. R.A. Baker.
- Etanol absoluto. R.A. Baker.

#### 3.2.3 DESARROLLO DE LA FORMULACION DE LIBERACION SOSTENIDA. (NET: COLEST: LACT)

La proporción en que se mezcló la NET con el Colesterol fué de 1:4 ya que esta relación permite obtener una mezcla eutéctica. Para ello 35 mg de NET se mezclaron con 140 mg de Colesterol; esta mezcla se colocó en un vaso de pp. y sobre una placa de calentamiento hasta que la muestra se fundió completamente. La mezcla se enfrió por un minuto en hielo seco/acetona y se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos horas. Los cristales se separaron de las paredes del recipiente y se trituraron hasta obtener un tamaño de partícula menor a 100 micras; para verificar este tamaño, se colocó una muestra sobre un hemocitómetro y se observó al microscopio.

La cantidad de NET en la mezcla se cuantificó al U.V. utilizando el método de la sección 3.3 y se aceptó sólo si se obtenía un resultado del  $100 \pm 10\%$ . A la combinación de NET: COLEST se le adicionaron lentamente 5.325 g de lactosa y se mezcló perfectamente. Se cuantificó la cantidad de NET presente en la combinación de NET: COLEST: LACT y se aceptó sólo si se obtenía un resultado del  $100 \pm 10\%$ . Con esta mezcla se procedió a llenar manualmente cada una de las cápsulas con 55 mg de la mezcla y el contenido de NET en las mismas se cuantificó nuevamente, determinándose además la variación del peso de las cápsulas vacías y llenas.

Cada cápsula contenía: 0.35 mg de NET, 1.40 mg de Colesterol y 53.25 mg de lactosa.

#### 3.2.4 DESARROLLO DE LA FORMULACION CONTROL. (NET: LACT).

35 mg de NET fueron fundidos dentro de un vaso de precipitado sobre una placa de calentamiento y enfriados en hielo seco/acetona durante un minuto. La muestra se desprendió de las paredes y el fondo del vaso y se trituró hasta obtener un tamaño de partícula menor a 100 micras. Este tamaño se verificó por observación al microscopio con ayuda de un hemocitómetro. Se adicionaron lentamente 5.465 g. de lactosa y se mezcló perfectamente. Se cuantificó el contenido de NET en la mezcla y se aceptó sólo si se obtenía el  $100 \pm 10\%$ . Con esta mezcla se procedió a llenar manualmente cada una de las cápsulas con 55 mg de la mezcla y se cuantificó la cantidad de NET presente en las mismas, aceptándose sólo si se obtenía el  $100 \pm 10\%$ ; determinándose también la variación de peso de las cápsulas vacías y llenas.

Cada cápsula contenía: 0.35 mg de NET y Lactosa cbp 55 mg.

#### 3.2.5 LLENADO DE LAS CAPSULAS.

Se eligió la forma farmacéutica de cápsulas ya que estas no presentan tantas variables de formulación como las tabletas, las cuales requieren del empleo de una granulación húmeda o seca, fuerza de compresión, empleo de lubricantes, así como de colorantes y saborizantes artificiales, que en conjunto influyen en la liberación del fármaco de la formulación farmacéutica y consecuentemente en la disposición del mismo en el organismo.

Para conocer la variación de peso, por grupo, se calcula el valor promedio, la desviación estandar y el coeficiente de variación.

### 3.3 CONTROL QUIMICO DE LAS FORMULACIONES ELABORADAS.

#### 3.3.1 METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE NET EN LAS FORMULACIONES.

##### 3.3.1 a) CURVA PATRON

Pesar 10 mg de NET y aforar con metanol absoluto a 10 ml para obtener una concentración de 1mg/ml (solución A); de esta solución tomar una alicuota de 200  $\mu$ l y aforar a 10 ml con etanol absoluto para obtener una concentración final de 20  $\mu$ g/ml (solución B).

A partir de la solución B realizar dobles diluciones con etanol absoluto para obtener las siguientes concentraciones: 0.62, 1.25, 2.5, 5 y 10  $\mu$ g/ml. Determinar la D.O. de cada una de las diluciones anteriores a  $\lambda = 240$  nm. La concentración de NET en las muestras se calculó interpolando las absorbancias en la curva patrón.

##### 3.3.1 b) PROCEDIMIENTO

A 55 mg de muestra (ya sea del preparado experimental o del control) adicionar 5 ml de eter y agitar en vortex durante un minuto. Del sobrenadante tomar una alicuota de 600  $\mu$ l y transferirla a un tubo de ensaye; evaporar la alicuota a sequedad en un baño de agua a 37°C; resuspender la muestra en 5 ml de etanol y determinar su D.O. a  $\lambda = 240$  nm.

#### 3.3.2 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE NET EN LA FORMULACION DE REFERENCIA (DIANOR<sup>®</sup>, SYNTEX, TABLETAS. A GRANEL).

En este caso se efectuó la prueba de uniformidad de contenido, para lo cual la tableta se pulveriza entre dos papeles encendidos hasta obtener un polvo fino, este se transfiere a un tubo de ensaye y se sigue el mismo procedimiento descrito en la sección 3.3.1 b).

Para determinar la cantidad de NET en las diferentes formulaciones se utilizó la siguiente relación:

$$\text{valor interpolado de la curva patrón } (\mu\text{g/ml}) \times \text{vol. eter (ml)} \times \frac{1}{\text{aliquota (ml)}} \times \text{vol. etanol (ml)} = \mu\text{g muestra}$$

#### 3.3.3 VARIACION DE PESO DE LAS CAPSULAS VACIAS, LLENAS Y DE LAS TABLETAS.

De manera aleatoria elegir 30 cápsulas vacías, 30 llenas (de cada una de las formulaciones) y 30 tabletas y pasarlas de forma individual en una balanza analítica.

### 3.4 METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA EN SUERO.

#### 3.4.1 EQUIPO

- Baño de temperatura regulable
- Espectrofotómetro para emisiones beta. Tri Carb Packard.
- Radiocromatógrafo. Packard.
- Cámara cromatográfica.
- Vortex.
- Tubos de ensaye para radioinmunoanálisis.
- Viales de vidrio de centelleo de 20 ml.
- Centrífuga refrigerada. Beckman J.GB.
- Espectrofotómetro. Beckman D.B.

#### 3.4.2 REACTIVOS

- Tolueno. R.A. Baker.
- Eter etílico. R.A. Baker.
- Etanol absoluto. R.A. Baker.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . R.A. Merck.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . R.A. Merck.
- NaCl. R.A. Baker.
- Azida de sodio. R.A. Sigma.
- Gelatina. R.A. Merck.
- Carbón. R.A. Sigma.
- Dextrán. Who RIA Reagent Programme.
- Permafluor o liquifluor. New England Nuclear.
- NET Syntex.

- 6.7  $^3\text{H}$ -NET con actividad específica de 55 Ci/mmol y una pureza mayor al 95%. New England Nuclear.
- Anticuerpo contra NET. Proporcionado por el Dr. R.F. Palmer de los laboratorios G.D. Searle Co. High Wycombe, Inglaterra.
- HCl 0.1N. R.A. Baker.
- NaOH 0.1N, R.A. Baker.
- Nitrógeno.
- Eter de petróleo. R.A. Baker.
- Benceno. R.A. Baker.
- Metanol. R.A. Baker.
- Hidrazida del ácido isonicotínico. Sigma.

### 3.4.3 SOLUCIONES DE TRABAJO EMPLEADAS.

- a) Solución amortiguadora PBS 0.1M + 0.1% de gelatina pH 7.2

Pesar 11.6 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y disolverlos en 400 ml de agua desionizada caliente; <sup>2</sup>adicionar 8.8 g de NaCl y disolver, agregar 2.7 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  disolviendo con agitación; añadir 300 ml de agua <sup>2</sup>desionizada tibia, 0.1 g de azida de sodio y disolver. Solución A.

Disolver 1 g de degelatina en 100 ml de agua desionizada caliente y adicionarla a la solución A.

Enfriar la solución resultante a temperatura ambiente; ajustar el pH a 7.2 con HCl 0.1N ó NaOH 0.1N y aforar con agua desionizada a 1000 ml.

Esta solución en refrigeración es estable por un mes.

- b) Solución de carbono-dextrán

Disolver 0.0625 g de dextrán en 20 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina; adicionar en forma alternada 0.625 g de carbón con 80 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina. (vol. final 100 ml).

Esta solución debe ser preparada el día en el que será empleada, manteniéndola a 4°C y no debe usarse después de cuatro días de su preparación.

c) Líquido de centelleo

En un matraz aforado de 1000 ml adicionar 42 ml de perfluor o líquifluor y 21 ml de etanol, mezclarlos perfectamente y aforar con tolueno a 1000 ml.

El líquido de centelleo preparado debe guardarse a temperatura ambiente, protegido de la luz y puede emplearse - hasta seis meses después de su preparación.

d) Sistema empleado para determinar la pureza de  $6.7\text{-}^3\text{H-NET}$  por cromatografía en papel.

En un embudo de preparación se mezclan vigorosamente 66.6 ml de éter de petróleo, 33.3 ml de benceno, 80 ml de metanol y 20 ml de agua destilada. La mezcla resultante se - deja reposar para permitir que se separen dos fases.

La fase inferior se emplea como fase fija y la superior - como móvil.

#### 3.4.4 DESCRIPCION DEL METODO ANALITICO.

El método elegido para la cuantificación de NET en suero fué el de radioinmunoanálisis (RIA), el cual se basa en la medición de la actividad inmunológica de ésta hormona (180).

El fundamento de esta técnica es:

Una muestra biológica que contiene una cantidad desconocida de hormona no radiactiva (antígeno no marcado), se incuba con una cantidad fija de hormona radiactiva (antígeno marcado) y con una cantidad constante del antisuero específico el cual contiene una población de anticuerpos polivalentes. La hormona no radiactiva (estándard o muestra biológica) compite con la hormona radiactiva por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo, de tal manera que entre mayor sea la cantidad de hormona presente en el estándar o muestra de valor desconocido, menor será la cantidad de hormona radiactiva que se unirá al anticuerpo y - visceversa, posteriormente la hormona unida al anticuerpo se separa de la hormona no unida o libre empenado carbón activado recubierto con dextrán y se cuantifica el contenido de radioactividad para calcular el porcentaje de unión. La concentración de la hormona en la muestra biológica se determina construyendo una - curva dosis-respuesta, como se muestra en el apéndice 1.

En esta técnica los parámetros a controlar son los siguientes:

1) Dilución de trabajo del anticuerpo (AC), 2) Límites de sensibilidad y linealidad de la curva dosis-respuesta, 3) cantidad de hormona radiactiva, 4) tiempo y temperatura - de incubación para la formación del complejo antígeno-anticuerpo, 5) tratamiento de las muestras antes de su cuan

tificación, 6) preparación y evaluación de los pooles de control de calidad. A continuación se describirán las técnicas utilizadas para el control de estos parámetros.

En el apéndice 1. se describe de manera más detallada el fundamento y los parámetros empleados en el RIA.

En la tabla 1 se muestra el número y las combinaciones utilizadas para la optimización del método analítico.

#### 3.4.4.1 DILUCION DE TRABAJO DEL ANTICUERPO.

La dilución de trabajo del anticuerpo se obtuvo a partir de tres curvas, en las cuales diferentes diluciones del Ac se incubaron frente a: 1) una concentración constante del antígeno radiactivo ( $Ag^*$ , 5000 cpm) en ausencia de antígeno no radiactivo ( $Ag^o$ ), 2)  $Ag^*$  en presencia de  $Ag^o$  en una concentración constante de 15 pg/200  $\mu$ l, 3)  $Ag^*$  en presencia de  $Ag^o$  en una concentración constante de 1000 pg/200  $\mu$ l.

##### a) Preparación de las diluciones del anticuerpo.

Disolver lentamente 4 mg del Ac en 0.4 ml de agua desionizada, para obtener una dilución inicial de 1:1000. A partir de esta solución efectuar dobles diluciones utilizando una solución amortiguadora de PBS + gelatina para obtener las siguientes diluciones: 1:4000; 1:8000; 1:16000; 1:32000; 1:64000; 1:128000 y 1:256000. Estas diluciones deben prepararse el día del ensayo y no deberán emplearse después de cuatro días de su preparación.

##### b) Preparación de las concentraciones del antígeno no radiactivo.

Preparar una solución etanólica de NET conteniendo 0.5  $\mu$ g/ml; tomar 1 alícuota de 0.1 ml y transferirla a un vial de vidrio de 20 ml. Evaporar la alícuota hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno. Adicionar 10 ml de una solución amortiguadora de PBS + gelatina e incubar a 40°C durante 40 minutos. Agitar en vortex por 1 minuto. A partir de esta solución preparar dos diluciones con solución amortiguadora de PBS + gelatina para obtener diluciones de 15 y de 1000 pg/200  $\mu$ l.

##### c) Ensayo.

Como se especificó en el inciso 3.4.4.1 para determinar la dilución de trabajo del Ac, se prepararon tres curvas:

TABLA 1. PARAMETROS Y CONDICIONES DE TRABAJO PROBADAS PARA LA OPTIMIZACION DEL RADIOINMUNOANALISIS DE NORETINDRONA

Num. DE COMBINACION	CT DE $^3\text{H-NET}$ 6,7	TIEMPO Y TEMP. DE INCUBACION	TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS
1	5,000 cpm	60', 37°C + 30', 4°C	Directo
2	5,000 cpm	60', 37°C + 30', 4°C	Extracción
3	5,000 cpm	18 hrs, 4°C	Directo
4	5,000 cpm	18 hrs, 4°C	Extracción
5	10,000 cpm	60', 37°C + 30', 4°C	Directo
6	10,000 cpm	60', 37°C + 30', 4°C	Extracción
7	10,000 cpm	18 hrs, 4°C	Directo
8	10,000 cpm	18 hrs, 4°C	Extracción

Curva 1): a tubos de ensayo para RIA adicionar 100  $\mu$ l de cada dilución del Ac, 400  $\mu$ l de solución reguladora de - PBS + gelatina y 100  $\mu$ l  $^3\text{H}$ -NET (5000 cpm). Agitar en Vortex.

Curva 2): a tubos de ensayo para RIA adicionar 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones del Ac; 200  $\mu$ l de  $\text{Ag}^\circ$  en una - concentración de 15 pg/200  $\mu$ l; 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de PBS + gelatina y 100  $\mu$ l de  $^3\text{H}$ -NET (500 cpm). - Agitar en vortex.

Curva 3): a tubos para RIA adicionar 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones del Ac; 200  $\mu$ l de  $\text{Ag}^\circ$  en una concentración de 1000 pg/200  $\mu$ l; 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de PBS + gelatina y 100  $\mu$ l  $^3\text{H}$ -NET (5000 cpm). Agitar en vortex.

El procedimiento fue el mismo para las tres curvas: incubar las muestras a 4°C por 18 hrs.; adicionar 500  $\mu$ l de - una solución de carbono-dextrán e incubar durante 15 min. a 4°C; centrifugar a 3000 rpm por 15 min. a 4°C; decantar el sobrenadante en viales de 20 ml y adicionar 5 ml de líquido de centelleo. Limpiar los viales con alcohol, agitarlos con vortex 30 segundos y dejarlos reposar 6 horas a temperatura ambiente, antes de medir la radiactividad - presente en un espectrofotómetro para emisiones beta.

La dilución de trabajo del Ac será aquella que una al antígeno (NET) en un 50% y presente una mayor discriminación entre la curva de NET no radiactiva ( $\text{Ag}^\circ$ ) conteniendo 15 y 1000 pg / 200  $\mu$ l y la curva que contiene sólo Ag radiactivo.

#### 3.4.4.2 LIMITES DE SENSIBILIDAD Y LINEALIDAD DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA.

Para determinar los límites de sensibilidad y linealidad de la curva dosis-respuesta se tomó en cuenta los resultados de trabajos anteriores, de aquí que sólo se haya trabajado con un - sólo intervalo, el cual fué de 0.78 a 5 ng/ml (100).

##### a) Preparación de los estándares de NET.

Preparar una solución de NET etanol absoluto que contenga una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml (solución A). Corroborar esta concentración por espectrofotometría de la siguiente manera: Tomar una alícuota de la solución A y leer su densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 240 nm, empleando como blanco etanol absoluto. Para conocer la concentración real, relacionar este valor de D.O. con el coeficiente de extinción de NET:

$$\text{conc. mg/ml} = \frac{\text{D.O.} \times \text{P.M.}}{\epsilon}$$

donde:

D.O. = densidad óptica de la solución A de NET a  $\lambda = 240 \text{ nm}$

P.M. = peso molecular de NET = 290.41 g/gmol.

$\epsilon$  = coeficiente de extinción de NET = 17378

Una vez verificada la concentración de la solución A tomar de ésta un alícuota de 1 ml, adicionar 9 ml de etanol absoluto y agitar en vortex (conc. 50 ng/ml), solución B. Tomar una alícuota de 1.2 ml de la solución B y evaporar la muestra a sequedad con nitrógeno; resuspender ésta con 2 ml de suero; incubar la muestra a 37°C durante 60 minutos y agitar en vortex por un minuto. A partir de este estándar cuya concentración es de 30ng/ml hacer dobles diluciones con suero para obtener las siguientes concentraciones: 0.46, 0.93, 1.87, 3.75, 7.5 y 15 ng/ml (0.078, 0.115, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5 y 5 ng/ml concentraciones finales en el RIA). Las soluciones de NET en etanol y refrigeración son estables por 6 meses, mientras que las diluciones en suero sólo por una semana. Por lo que éstas últimas pueden ser congeladas y emplearse hasta 6 meses después de su preparación.

b) Determinación de linealidad y sensibilidad

Con el fin de determinar si la relación entre concentración y LOGIT (ver apéndice 1) era lineal, se elaboraron cinco curvas de calibración en el intervalo de concentraciones de 0.78 a 5 ng/ml, probando diferentes condiciones de trabajo, las cuales se mencionan en la tabla 1.

Los diferentes ensayos se realizaron de acuerdo con los lineamientos que se describen posteriormente en el inciso 3.4.5.

3.4.4.3 CANTIDAD DE RADIATIVIDAD DEL ANTIGENO MARCADO (Ag\*).

En el ensayo es de suma importancia determinar el número de cuentas totales (CT) y la pureza de la hormona ya que una sobresaturación de ésta, impediría un buen desplazamiento del anticuerpo y la unión máxima del mismo podría verse abatida.

a) Determinación de la pureza de 6, 7, <sup>3</sup>H-NET (Ag\*).

Del vial original de <sup>3</sup>H-NET con 55 Ci/mmol tomar una alícuota de 60  $\mu$ l y transferirlos a un tubo cónico, la muestra se evapora a sequedad en una atmósfera de nitrógeno.

De una solución patrón de NET frío (no radiactivo) con una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  tomar dos alícuotas de 0.5 ml cada una y se transfieren a dos tubos cónicos (uno por alícuota) y se evaporan a sequedad en una atmósfera de nitrógeno.

Ambas muestras ( $^3\text{H-NET}$  y NET frío) se resuspenden en 0.1 ml de etanol absoluto y se aplican con un capilar sobre papel cromatográfico. Empleando un carril por muestra. Cada muestra se aplica hasta cinco veces sobre el mismo punto, secando cada aplicación con nitrógeno antes de realizar la siguiente aplicación.

A los extremos de las muestras se aplica un colorante azul, el cual se emplea como guía para ver el frente de la corrida.

Una vez aplicadas las muestras y el colorante, colocar el papel dentro de la cámara por 18 horas con el propósito de saturar a éstas con la fase fija; después de este tiempo adicionar la fase móvil, dejando correr el cromatograma hasta 5 cm antes del frente del papel, retirar de la cámara el papel y secar a temperatura ambiente durante 12 horas aproximadamente.

Una vez seco el cromatograma, cortar la tira donde se corrió el  $^3\text{H-NET}$  y colocarlo en el radiocromatograma con el fin de detectar la radiactividad presente en la muestra. Para revelar la mancha de NET frío obtenida en el cromatograma emplear hidrazida del ácido isonicotínico y secar sobre una parrilla ligeramente caliente. Colocar la tira de NET frío sobre el radiocromatograma obtenido para verificar que el pico de  $^3\text{H-NET}$  coincide con la posición de la mancha de NET frío.

b) Preparación de las diluciones del antígeno radiactivo.

Del vial original conteniendo 55 Ci/mmol de 6, 7,  $^3\text{H-NET}$  tomar una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  y evaporarla a sequedad en una atmósfera de nitrógeno; adicionar 10 ml de solución reguladora de PBS + gelatina y agitar en vortex; incubar la muestra durante 10 min. a  $37^\circ\text{C}$  y agitar en vortex por un minuto, para obtener una muestra con 10000 cpm. Esta dilución debe corroborarse en un espectrofotómetro para emisiones beta y no debe tener un error mayor al  $\pm 10\%$ . Del preparado anterior, tomar una alícuota de 5 ml, adicionar 5 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina y agitar en vortex durante un minuto, para obtener una muestra con 5,000 cpm. Esta dilución debe corroborarse en un espectrofotómetro para emisiones beta y no debe presentar un error mayor a  $\pm 10\%$ .

c) Ensayo.

Una vez preparadas las dos diluciones conteniendo 5000 y 10000 cpm de Ag radiactivo se probaron bajo diferentes condiciones de trabajo, las cuales se encuentran especifi

cadadas en la tabla 1 de acuerdo con los lineamientos del - inciso 3.4.5.

#### 3.4.4.4 TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACION PARA LA FORMACION DEL COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO.

Los tiempos y temperaturas que se probaron fueron los siguientes:

- a) 60 min. a 37°C y posteriormente 30 min. a 4°C
- b) 18 hrs. a 4°C.

De acuerdo con los lineamientos del inciso 3.4.5.

#### 3.4.4.5 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS ANTES DE SU CUANTIFICACION.

Con el fin de verificar cual método era más adecuado para la cuantificación de NET en suero se probaron dos condiciones de trabajo, el método directo y el método de extracción.

- a) Método directo.

A 0.1 ml de muestra, adicionar 0.4 ml de una solución amortiguadora de PBS + gelatina, incubar a 60°C durante 30 minutos. Tomar una alícuota de 0.2 ml para el ensayo descrito en la sección 3.4.5.

- b) Método de extracción.

A 0.1 ml de muestra, adicionar 0.3 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina, 0.1 ml de 6, 7, <sup>3</sup>H-NET con 1000 cpm e incubar la muestra a 40°C por 30 min.; agitar en vortex durante 10 seg. Adicionar 5 ml de eter, agitar en vortex por un minuto y dejar reposar durante 10 minutos. Congelar la muestra sobre hielo seco/acetona; decantar el sobrenadante a otro tubo y evaporar hasta sequedad en un baño de temperatura regulada a 37°C. Resuspender la muestra con 0.6 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina, - incubar a 60°C por 10 minutos y agitar en vortex durante un minuto. Tomar una alícuota de 0.2 ml para el ensayo - descrito en la sección 3.4.5 y otra de 0.1 ml para determinar el porcentaje de recuperación de extracción.

- c) Determinación del porcentaje de recuperación de extracción.

Tomar 0.1 ml de la muestra previamente tratada con el método de extracción (inciso b), añadir 5 ml de líquido de centelleo, agitar en vortex por 30 seg. y limpiar las paredes externas del vial con alcohol. Dejar reposar las muestras durante 6 a 12 hrs. a temperatura ambiente y obs

curidad continua y determinar la radiactividad de cada muestra durante 4 min. en un espectrofotómetro de emisiones beta. El ensayo sólo será aceptado si las muestras presentan un porcentaje de recuperación mayor al 90%. Los cálculos para determinar el % de recuperaciones se detallan en el apéndice 1.

#### 3.4.5 DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO PARA CUANTIFICAR NET EN SUERO POR RIA.

Este ensayo se empleó para probar los diferentes parámetros de trabajo, descritos en líneas anteriores y enmarcados en la tabla 1. Cuando se hace referencia a la cantidad de "muestra", ésta puede ser estándares de NET de la curva dosis-respuesta preparados de acuerdo con el inciso 3.4.6 a) o muestra problema previamente tratada con el método directo o de extracción.

A 0.2 ml de muestra, adicionar 0.2 ml de solución amortiguadora de PBS + gelatina, 0.1 ml de anticuerpo (en la dilución que se haya elegido de la curva de dilución del anticuerpo, inciso 3.4.5) y 0.1 ml de  $^3\text{H}$ -NET con 5000 ó 10000 cpm.

Incubar durante 60 minutos a 37°C y posteriormente 30 min. a 4°C o bien por 18 hrs. a 4°C. Adicionar 0.5 ml de una suspensión de carbono-dextrán, incubar durante 15 minutos a 4°C y centrifugar a 3000 rpm por 15 min. a 4°C. Decantar el sobrenadante en un vial de vidrio y adicionar 5 ml del líquido de centelleo. Agitar en vortex por 30 seg., limpiar el vial con alcohol e incubar a temperatura ambiente y obscuridad durante 6 a 12 hrs. Medir la radiactividad presente en un espectrofotómetro para emisiones beta.

En el ensayo deben incluirse las cuentas totales (CT), la unión máxima (Bo) y la unión no específica (UNE). El concepto y uso de estos parámetros se presenta en el apéndice 1. Los resultados de los estándares de NET se expresan como LOGIT (apéndice 1) y se construye la curva dosis-respuesta graficando LOGIT contra log concentración de NET, a partir de la cual se interpolan los valores de LOGIT de las muestras desconocidas para conocer sus respectivas concentraciones.

#### 3.4.6 CONTROL DE CALIDAD DEL RIA DE NET.

Dado que en muchos casos la precisión de la curva dosis-respuesta no es uniforme, y que la reproducibilidad puede verse afectada por cambios en las condiciones del análisis y/o en la composición de los reactivos, es necesario incluir para la variación intra e interanálisis varias muestras con concentraciones conocidas de hormona: Concentración baja (A), concentración media (B) y concentración alta (C), colocadas en tres posiciones diferentes de la curva dosis - respuesta de NET. Generalmente las muestras de control de calidad existen comercialmente en el mercado, en este caso en particular no es así, por lo que primero fueron preparadas y evaluados en el laboratorio, antes de que estas muestras de control de calidad fueran empleadas como tales.

#### 3.4.6 a) PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD.

A partir de una solución etanólica de NET con concentración igual a 2.5 ug/ml, tomar una alícuota de 1 ml y evaporarla a sequedad en una atmósfera de nitrógeno. Adicionar 5 ml de suero e incubar a 37°C por 10 min.; adicionar nuevamente 5 ml de suero e incubar a 37°C por 10 min. Este procedimiento se repite hasta que se hayan adicionado 25 ml de suero; para obtener una solución con una concentración de 100 ng/ml (concentración alta (C)). Por último, agitar en vortex por 1 min.

De la muestra (C) tomar una alícuota de 5 ml y transferirlos a otro vial. Adicionar 15 ml de suero y agitar en vortex por 1 min., para obtener una solución con una concentración de 25 ng/ml (concentración media (B)). De ésta tomar una alícuota de 2 ml, adicionar 18 ml de suero y agitar en vortex durante 1 min., obteniéndose así la concentración baja (A) con una concentración de 2.5 ng/ml.

Estas muestras pueden conservarse hasta 6 meses en congelación.

#### 3.4.6 b) EVALUACION DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD.

La evaluación de las muestras de control de calidad se realiza de acuerdo a los lineamientos descritos en las secciones 3.4.4.5 b) y 3.4.5 determinándose además la variación intraanálisis (diferentes ensayos en el mismo día) e interanálisis (diferentes ensayos en diferentes días).

Para conocer el valor real de las muestras, el valor obtenido de LOGIT de cada uno fué interpolado en la curva dosis-respuesta de LOGIT contra concentración de NET.

En el apéndice No. 1 se resume el protocolo a seguir para la preparación de la curva dosis-respuesta y el análisis de las muestras desconocidas tomando en consideración las condiciones de trabajo seleccionadas.

### 3.5 ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE NET EN VOLUNTARIOS SANOS.

#### 3.5.1 FORMULACIONES.

Las formulaciones utilizadas en este estudio fueron:

- a) Producto comercial. Tabletas a granel de Syntex, Dianor<sup>(R)</sup> conteniendo 0.5 mg de NET.
- b) Formulación control. Anticonceptivo hormonal oral control. Cada cápsula contiene 0.35 mg de NET (NET: LACT).
- c) Formulación experimental. Anticonceptivo hormonal oral propuesto como formulación de liberación sostenida. Cada capsula contiene 0.35 mg de NET y 1,4 mg de colesterol (NET: COLEST).

#### 3.5.2 POBLACION DE ESTUDIO.

En el estudio participaron 10 voluntarios clínicamente sanos, 5 de sexo femenino y 5 de sexo masculino, entre 20 y 30 años de edad, de 50 a 70 kg de peso y entre 1.55 y 1.75 mts. de estatura. Las mujeres además presentaban un ciclo menstrual regular. Ningún voluntario tenía antecedentes de enfermedades endócrinas y no habían estado sometidos a tratamiento medicamentoso crónico, no presentaban padecimientos gastrointestinales ni enfermedad febril, las dos semanas previas al estudio, ninguno tenía antecedentes de alcoholismo o adicción a drogas o a otros compuestos químicos ni presentaban alguna enfermedad actual que requiriera ser tratada con esteroides.

#### 3.5.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

La administración de las formulaciones se realizó utilizando un "Diseño de Bloques al Azar".

A cada voluntario se le administraron las formulaciones en una dosis única por vía oral con 100 ml de agua natural, después de la toma de sangre basal (0 min.). En el caso del sexo femenino la dosis fué administrada el 5º día del ciclo menstrual (contando a partir del primer día de sangrado). Para el sexo masculino la administración se realizó sin una fecha específica y entre la administración de una y otra formulación transcurrió un período de cuando menos 2 semanas.

Se tomaron 8 ml de sangre venosa de una de las venas antecubital.

.Para la formulación comercial (Dianor) y el control (NET: LACT), los tiempos de muestreo fueron: 0 min. (antes de la administración) y después de la dosis a la 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12, 24 y 36 hrs.

Para la formulación experimental (NET: COLEST) además de los tiempos antes mencionados se tomaron muestras a las 48, 60, y 72 hrs. después de la dosis; Todas las muestras fueron centrifugadas por 15 min. a 3000 rpm. y el suero separado se congeló a -20°C hasta el momento de su análisis por RIA. La cuantificación de NET en las muestras séricas se realizó cuando menos por duplicado. El día del estudio todos los voluntarios se presentaron en ayuno de 10 hrs. y cada uno de ellos fué instalado en una unidad metabólica en la que permanecieron las primeras 4 horas, durante las cuales se tomaron las muestras de sangre venosa a través de un catéter endovenoso.

Después de este tiempo (4 hrs.), se retiró el catéter y se dió una dieta estándar ligera, compuesta por un emparedado de jamón, una pieza de fruta, una gelatina y 200 ml de jugo de fruta. Después de 8 horas de iniciado el estudio la ingestión de alimentos fué "ad-libitum" evitando el exceso de grasa y picante.

A los voluntarios se les indicó que deberían evitar hacer ejercicio físico intenso o prolongado, no podían ingerir bebidas alcohólicas ni fumar, tomar café o productos que contenían cafeína, en las 24 hrs. previas al estudio ni durante el mismo. Además, dos semanas previas al estudio y durante el mismo deberían evitarse el uso de fármacos que originaran inducción enzimática o tuviesen interacción con la Noretindrona.

#### IV. RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS

##### 4.1 DETERMINACION DE LA PUREZA DE NET UTILIZADA.

###### 4.1.1 PUNTO DE FUSION.

El punto de fusión obtenido fué de 203 a 205°C, el valor reportado en la U.S.P. es de 202-208°C (45).

###### 4.1.2 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

La cromatografía en capa fina utilizando acetato de etilo: benceno como fase móvil presentó una sola mancha con un Rf de 0.8, el cual corresponde con el valor reportado por Nygren y Colab. - (128).

###### 4.1.3 ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA.

El espectro de u.v. como lo muestra la figura 1, presentó un máximo de absorción a  $\lambda = 240$  nm, el cual corresponde con lo indicado por la U.S.P. (45).

###### 4.1.4 ESPECTRO DE ABSORCION EN INFRAROJO.

En la figura 2 se presenta el espectro obtenido, el cual es característico para Noretindrona.

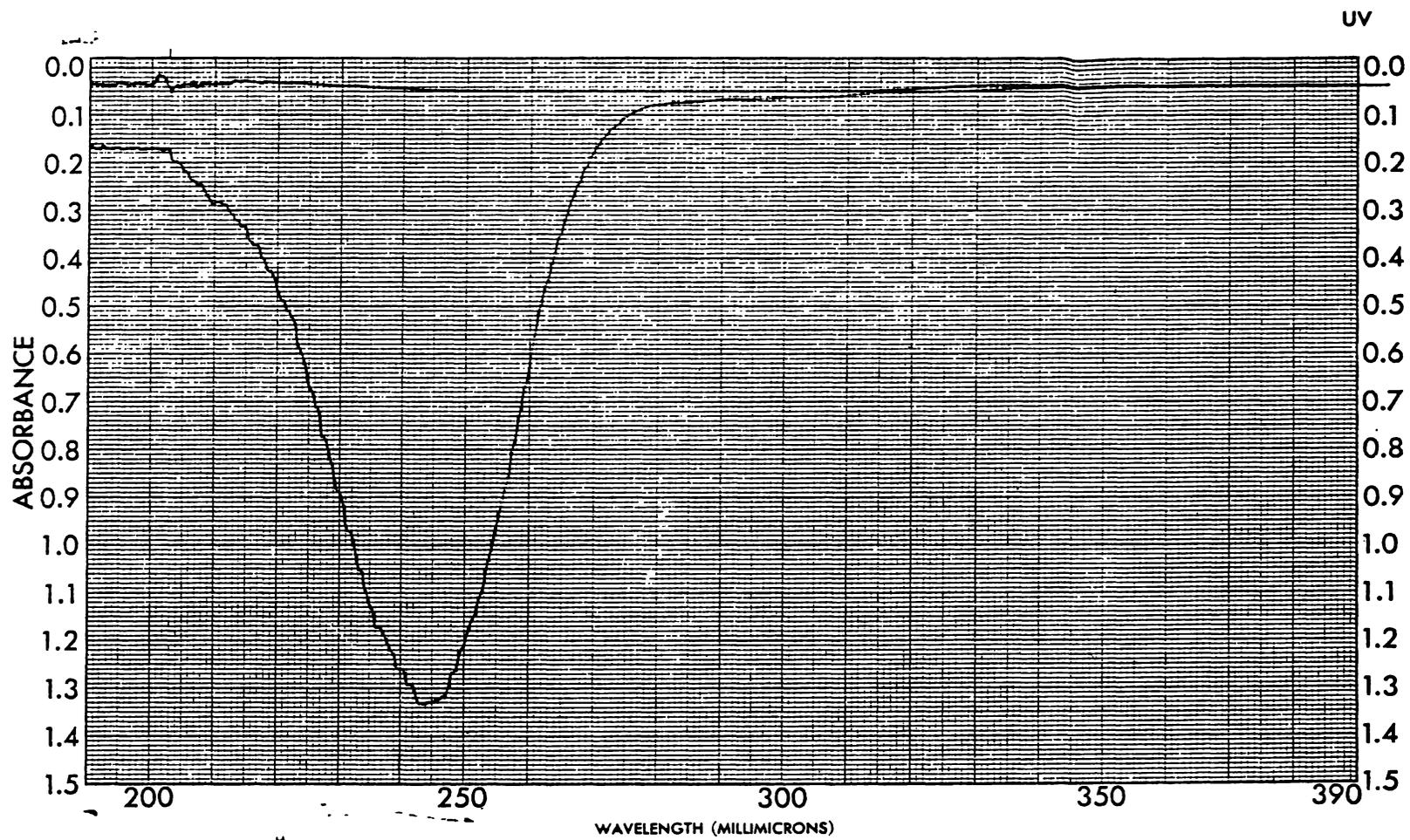


Figura 1 Espectro de absorción de Noretindrona al Ultravioleta



#### 4.2 DETERMINACION DE LA PUREZA DE NET DESPUES DEL PROCESO DE FUNDICION.

Con el fin de garantizar que NET no se descomponía después del proceso de fundición y enfriamiento brusco en hielo seco/acetona (secciones 3.2.3 y 3.2.4), se determinó su pureza por cromatografía en capa fina y por espectrofotometría de absorción en luz ultravioleta e infrarojo.

Al efectuar la cromatografía en capa fina utilizando el sistema acetato de etilo: benceno, se encontró que tanto el patrón de referencia (NET sin fundir) como la muestra (NET fundido) presentaron una única mancha con un Rf de 0.82.

En la figura 3 se presenta el espectro de u.v. en el cual se observa que el máximo de absorción, al igual que el de NET sin fundir, fué a 240 nm.

Asímismo la muestra de NET fundida presentó un espectro de absorción al infrarojo característico para NET (figura 4).

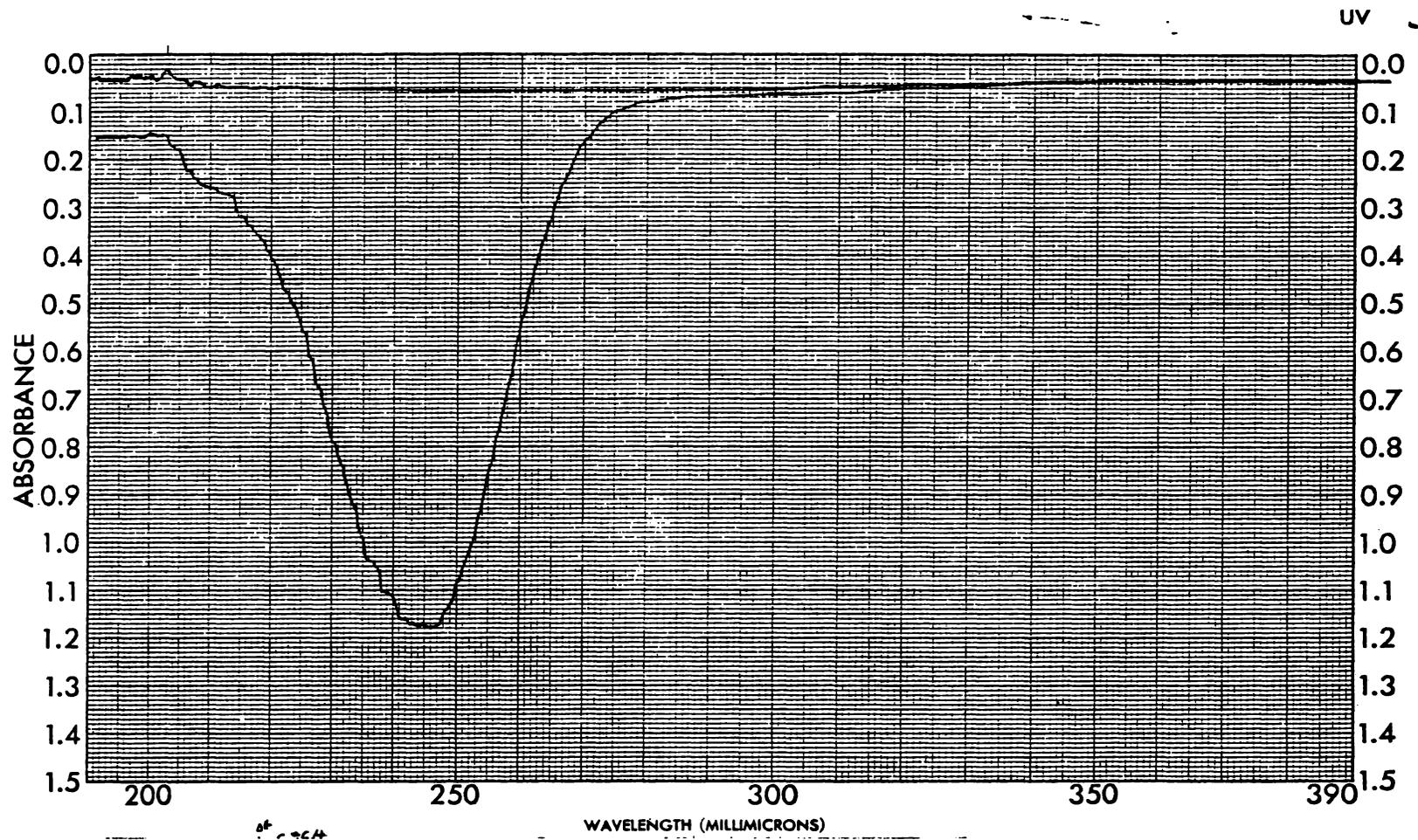


Figura 3 Espectro de absorción al Ultravioleta de Noretindrona Fundida

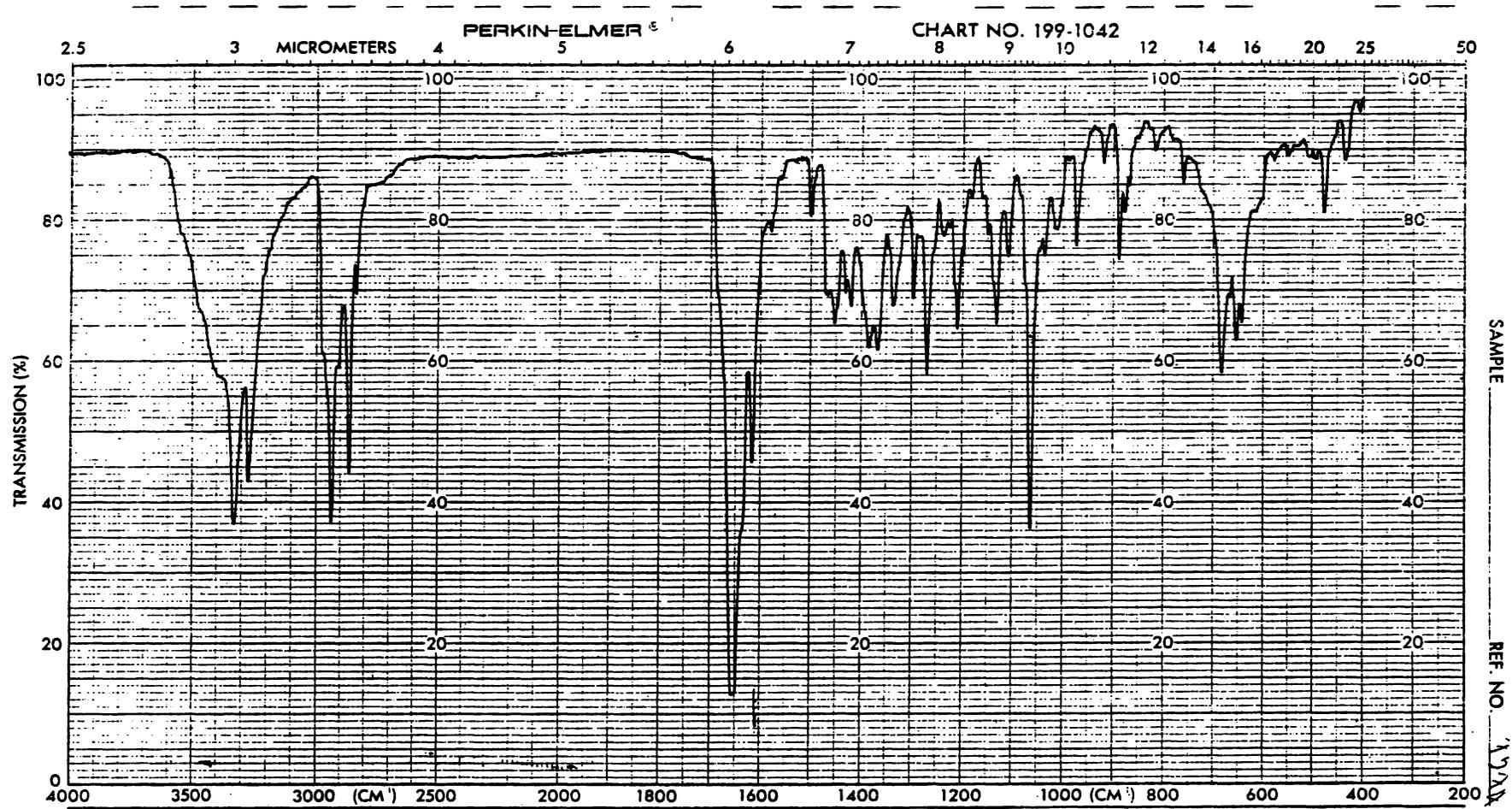


Figura 4 Espectro de absorción al Infrarrojo de Noretindrona Fundida

#### 4.3 CONTROL QUIMICO DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE NET.

##### 4.3.1 METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR NET EN LAS FORMULACIONES.

###### 4.3.1 a) CURVA PATRON DE NET EN ETANOL.

En la figura 5 se muestra la curva típica promedio de No-retindrona en etanol, obtenida al utilizar el método espectrofotométrico.

En la tabla 2 se presentan los valores promedio ( $\bar{x}$ ) de densidad óptica de ocho repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar ( $\sigma$ ) y sus coeficientes de variación en porciento (c.v.).

###### 4.3.1 b) CONTENIDO PROMEDIO DE NET EN LA FORMULACION EXPERIMENTAL. NET: COLEST: LACT.

La preparación de la mezcla de NET + colesterol se aceptó después de repetirla cuatro veces, el contenido promedio de NET obtenido en este paso intermedio (NET + COLEST) de la preparación de esta formulación se muestra en la tabla 3.

Después de la adición de la lactosa a la mezcla de NET + COLEST, el contenido promedio de NET fué del 96% (tabla 3) y finalmente después de encapsular la mezcla de NET: COLEST: LACT - (producto terminal) este contenido fué del 93.53% (tabla 3).

###### 4.3.1 c) CONTENIDO PROMEDIO DE NET DE LA FORMULACION CONTROL. NET: LACT.

Después de tres intentos en la preparación de NET + Lactosa, se obtuvo un porciento de NET dentro de lo establecido por la U.S.P., el valor obtenido fué del 96.75% de la dosis deseada (tabla 3) mientras que el contenido promedio de NET después de encapsular esta muestra, fué del 93.85% (tabla 3).

###### 4.3.1 d) CONTENIDO PROMEDIO DE NET EN EL PRODUCTO COMERCIAL. DIANOR (R).

El contenido promedio de NET que se obtuvo después de 10 determinaciones fué del 95.08%, en la tabla 3 se reporta este valor promedio con su respectiva desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación en porciento (c.v.).

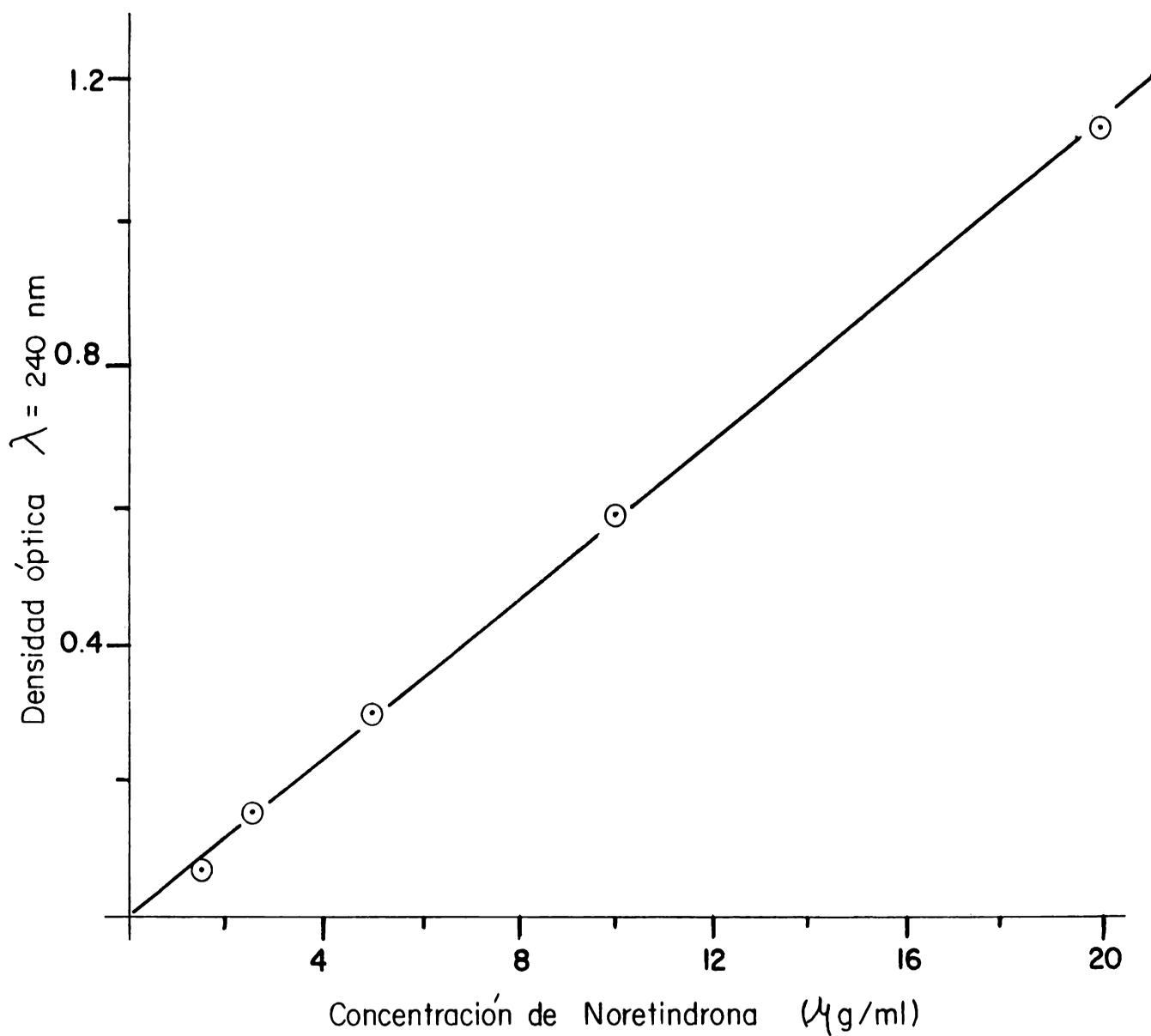


Figura 5 Curva patrón de Noretindrona en etanol utilizando un método espectrofotométrico ( $n=8$ ).  $m=0.05613$ ,  $r=0.9997$  y  $b=0.0152$

TABLA 2. VALORES PROMEDIO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA DETERMINACION DE NORETINDRONA EN ETANOL ABSOLUTO (n=8)

Concentración de Noretindrona (Mg/ml)	Valores de D.O. $\lambda = 240 \text{ nm}$		
	$\bar{X}$	$\sigma$	C.V.
1.25	0.0807	0.0037	4.66 %
2.5	0.1568	0.0045	2.91 %
5	0.303	0.0138	4.57 %
10	0.590	0.0052	1.56 %
20	1.130	0.026	2.3 %

$$m = 0.05613$$

$$r = 0.9997$$

$$b = 0.01527$$

TABLA 3. CONTENIDO DE NET EN LAS DIFERENTES FORMULACIONES, DURANTE Y AL TERMINO DEL DESARROLLO DE LAS MISMAS.

I. Formulación experimental, Net: colest: Lact

Contenido promedio de Net	Net: colest	Net: colest: lact	Net=colest=lact (producto terminal)
$\bar{X}$	97.8 %	96 %	93.53 %
$\sigma$	1.85	2.022	0.026
C.V.	1.9 %	2.10 %	7.2 %
n	6	6	10

II. Formulación control. Net=Lact

Contenido promedio de Net	Net: lactosa	Net: lactosa (producto terminal)
$\bar{X}$	96.75 %	93.85 %
$\sigma$	0.3535	0.9429
C.V.	0.305 %	0.5252
n	6	10

III. Producto comercial. Dianor

Contenido promedio de Net	Net
$\bar{X}$	95.08 %
$\sigma$	1.7149
C.V.	1.80 %
n	10 %

#### 4.3.2 VARIACION DE PESO DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE NET.

En la tabla 4 se presentan los valores promedio ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar, ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación en porcentaje (% c.v.) obtenidos al determinar la variación de peso de las cápsulas vacías, las cápsulas llenas de la mezcla correspondiente - (formulación experimental o control) y de las tabletas en el caso del producto comercial; así como el promedio de la mezcla de NET: COLEST: LACT ó NET: LACT obtenidos por cápsula.

TABLA 4. VARIACION DE PESO DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE NET.

		Formulación Experimental (Net=colest=lact)	Formulación Control ( Net= lact)	Producto Comercial Dianor®
Cápsulas Vacías	$\bar{X}$	0.04927 g	0.05004	
	$\sigma$	0.0017	0.00097	
	C.V.	3.6 %	1.94 %	
	n	30	30	
Cápsulas Llenas	$\bar{X}$	0.10426 g	0.10499	
	$\sigma$	0.0017	0.0009	
	C.V.	1.58 %	0.95 %	
	n	30	30	
Tabletas	$\bar{X}$			0.1008 g
	$\sigma$			0.0017
	C.V.			1.7 %
	n			30
Peso promedio de la mezcla por cápsula	$\bar{X}$ teórico	0.055 g	0.055 g	
	$\bar{X}$ calculado	0.05499 g	0.05495 g	

#### 4.4 OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO.

##### 4.4.1 DILUCION DE TRABAJO DEL ANTICUERPO.

En la figura 6 se muestran las curvas promedio (n=5) del log de la dilución del anticuerpo contra por ciento de unión de 6, 7 <sup>3</sup>H-NET utilizando a) Ag radiactivo (5000 cpm) en ausencia de antígeno no radiactivo (-o-), b) Ag radiactivo en presencia de Ag no radiactivo en una concentración de 15 pg/200 µl (-o-) y c) Ag radiactivo en presencia de Ag no radiactivo en una concentración de 1000 pg/200 µl (-Δ-).

##### 4.4.2 DETERMINACION DE LA PUREZA DE 6, 7 <sup>3</sup>H-NET.

En la figura 7 se muestra el pico obtenido del radiocromatograma de 6, 7 <sup>3</sup>H-NET en el cual se observa que éste coincide con la mancha de NET frío obtenida de la cromatografía en papel.

##### 4.4.3 VALIDACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE NORETINDRONA EN SUERO UTILIZANDO EL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS.

Las condiciones de trabajo que se probaron para la validación de la curva dosis-respuesta de NET en suero, fueron:

- a) Cuentas totales (CT) del antígeno radiactivo (6, 7 <sup>3</sup>H-NET): 5000 cpm y 10000 cpm.
- b) Tiempo y temperatura de incubación para la formación del complejo antígeno-anticuerpo, 60 min. a 37°C y posteriormente 30 min. a 4°C o bien 18 hrs. a 4°C.
- c) Tratamiento de las muestras séricas antes de su cuantificación por RIA: método directo y método de extracción.

En la tabla 1 se presentan las combinaciones probadas, y en la tabla 5 se encuentran los resultados obtenidos de la concentración mínima detectable, la pendiente (m), el coeficiente de correlación (r), el porcentaje de unión máxima (%Bo), el porcentaje de unión no específica (% UNE), la dosis al 50% (D 50%) y el porcentaje de recuperaciones (cuando se empleó el método de extracción), de la curva dosis-respuesta de NET en suero utilizando el método de RIA, para estas combinaciones.

De las combinaciones probadas se eligió la No. 4 por presentar los mejores resultados (sección 5.3.2), por lo cual se procedió a determinar la reproducibilidad de la dosis-respuesta de NET con las condiciones de trabajo de la combinación No. 4: 5000 cpm como cuentas totales de 6,7 <sup>3</sup>H-NET, 18 hrs a 4°C como tiempo y temperatura de incubación para la formación del complejo

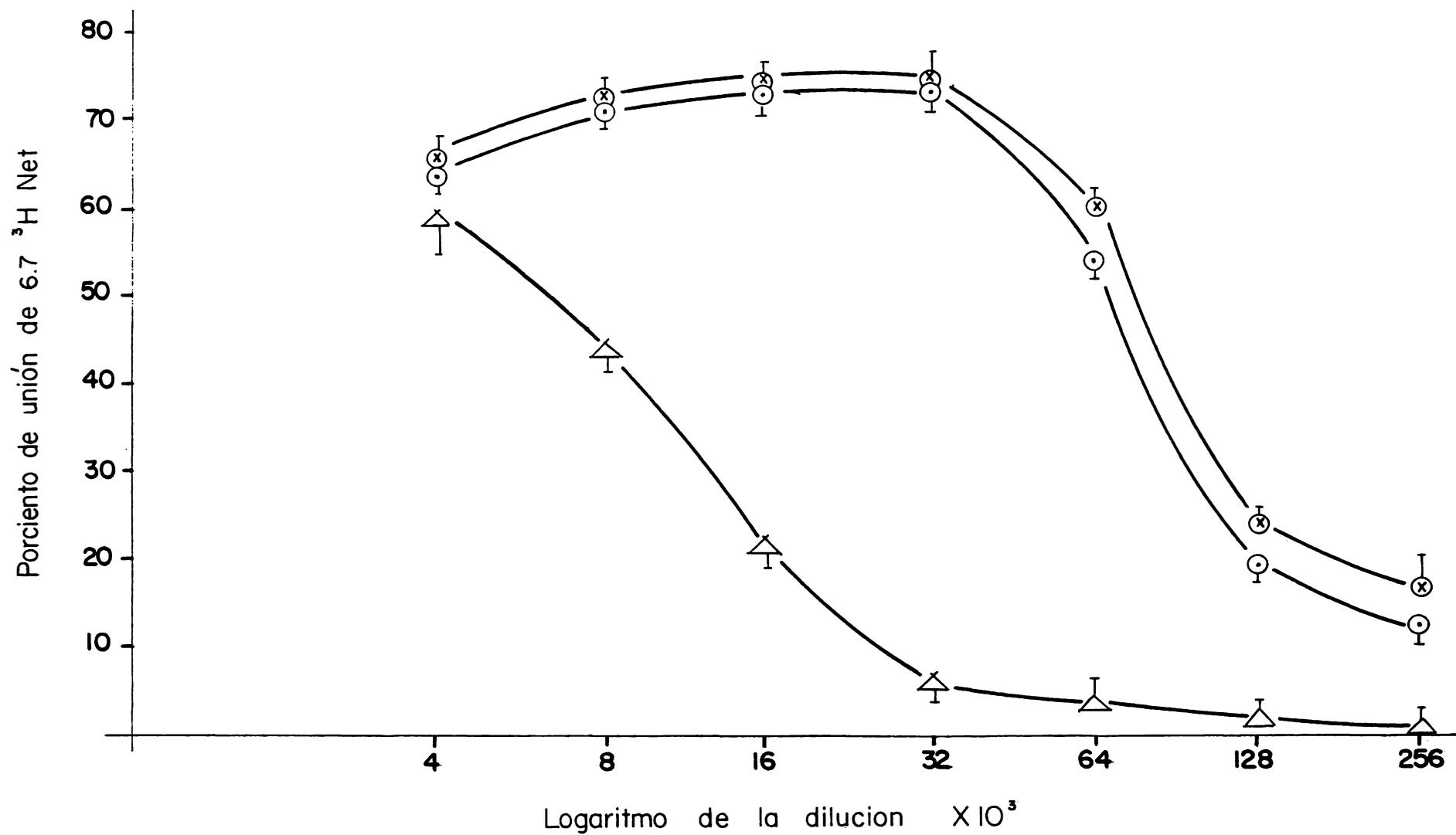


Figura 6 Curva de dilución del anticuerpo en ausencia (-○-) y presencia de Noretindrona no radioactiva (15 pg/200 μl -⊗- y 1000 pg/200 μl -△-)

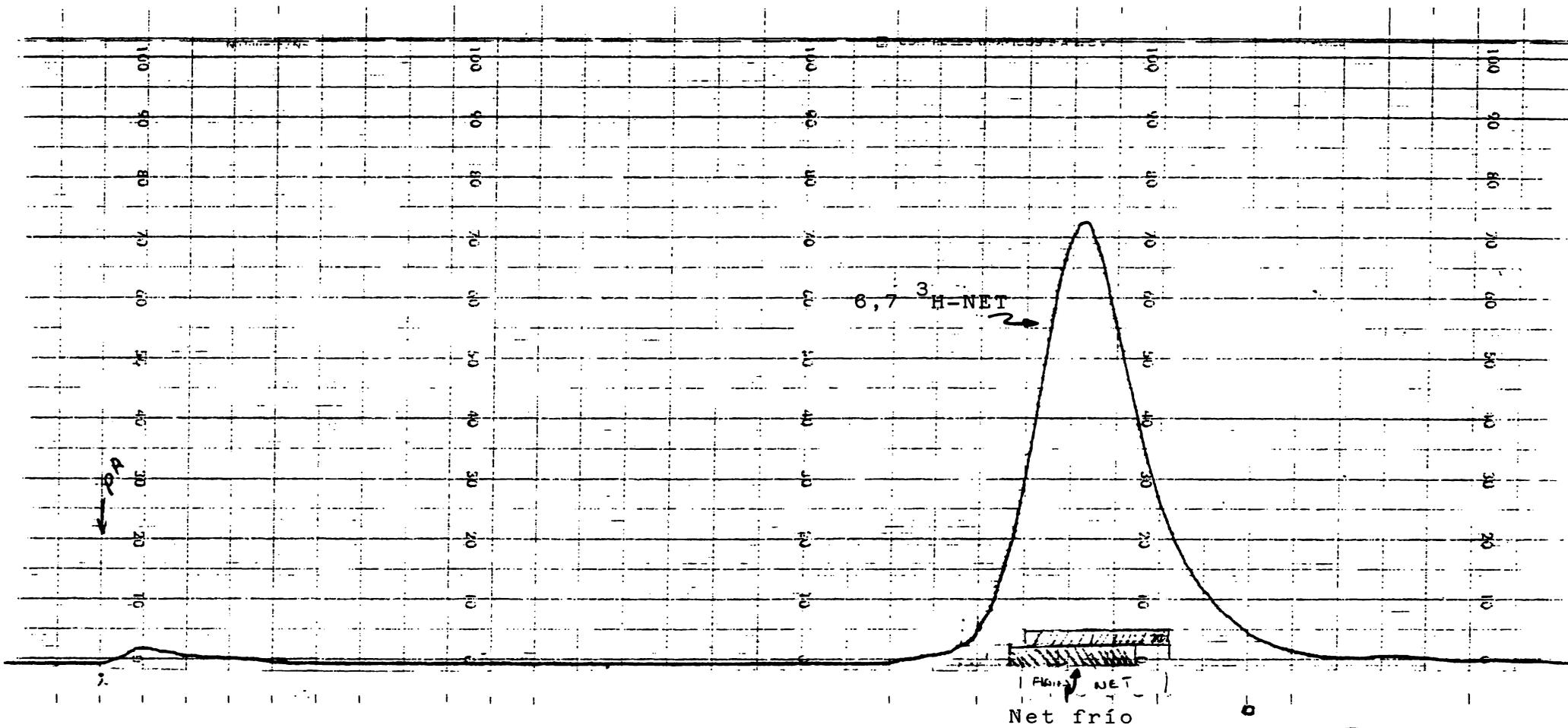


Figura 7 Radiocromatograma obtenido de 6,7 <sup>3</sup>H-NET

U N I V E R S I T A D  
D. E. I. P. M. S.



TABLA 5. PARAMETROS DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE NET EN SUERO UTILIZANDO EL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS DESPUES DE REALIZAR OCHO COMBINACIONES CON LAS DIFERENTES CONDICIONES DE TRABAJO DE ACUERDO CON LA TABLA 1 (n=5)

Num. de Combinación (De acuerdo con la tabla 1)	Conc. mínima detectable (ng/ml)	m	r	Bo (%)	UNE (%)	D50% (ng/ml)	% de Recuperaciones
1	0.156	-2.0	0.95	57	2	0.215	-
2	0.078	-2.25	0.99	60	1	0.143	97
3	0.156	-2.05	0.98	58	2	0.28	-
4	0.078	-2.28	0.995	63	1	0.16	94
5	0.156	-2.03	0.988	40	3	0.415	-
6	0.078	-2.10	0.98	50	2	0.345	93
7	0.156	-2.03	0.988	40	3	0.415	-
8	0.078	-2.12	0.98	50	2	0.339	96
m = pendiente r = coeficiente de correlación b = intercepto Bo= unión máxima UNE= unión no específica D50%= dosis al 50%							

antígeno-anticuerpo y el método de extracción como tratamiento - previo de las muestras antes de su cuantificación por RIA.

#### 4.4.4 VALIDACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA LINEARIZADA DE NET.

Con el fin de validar el método se determinaron las variaciones del %Bo, %UNE, D50%, m, r y % de recuperación

En la figura 8 se muestra la curva dosis-respuesta de NET en suero resultante de 16 ensayos independientes, en la cual se observa la linealidad del método en el intervalo de concentraciones de 0.078 a 5 ng/ml (las barras verticales indican la desviación estándar de cada punto), con una pendiente igual a -2.275 y un coeficiente de correlación de 0.9950.

En la figura 9 se presentan las variaciones obtenidas a lo largo de las 16 determinaciones independientes. Como media aritmética ( $\bar{x}$ ) más-menos una y dos desviaciones estándares ( $\pm 1\sigma$ ,  $\pm 2\sigma$ ) del porcentaje de unión máxima (%Bo), porcentaje de la unión no específica (%UNE) y dosis al 50 por ciento (D 50%). Las variaciones en los valores de la pendiente (m), coeficiente de correlación (r) y en el porcentaje de recuperaciones se presentan en la figura 10.

#### 4.4.5 CONTROL DE CALIDAD DEL RADIOINMUNOANALISIS DE NET.

Se encontró que al utilizar la combinación No. 4 de la tabla 1 (5000 cpm de CT, tiempo y temperatura de incubación de 18 hrs. a 4°C y el método de extracción como tratamiento previo de las muestras antes de su análisis), la exactitud y precisión con respecto a la evaluación de las muestras de control de calidad de NET fueron mayores.

Los resultados obtenidos con respecto a la variación intra análisis, después de 10 determinaciones independientes y a la variación interanálisis después de 16 determinaciones, para la evaluación de las muestras de control de calidad de NET, se muestran en la tabla 6.

Para valorar la calidad del RIA de NET, a lo largo de 16 ensayos se cuantificaron estas muestras y se registró su variabilidad a través de los mismos.

En la figura 11 se presenta la gráfica representativa del control de calidad del método de radioinmunoanálisis para la cuantificación de NET en suero, en la cual se muestran las variaciones a lo largo de las 16 determinaciones de las 3 muestras de control de calidad de NET. Estas variaciones se reportan como la media aritmética ( $\bar{x}$ ) más-menos una y dos desviaciones estándar ( $\pm 1\sigma$ ,  $\pm 2\sigma$ ).

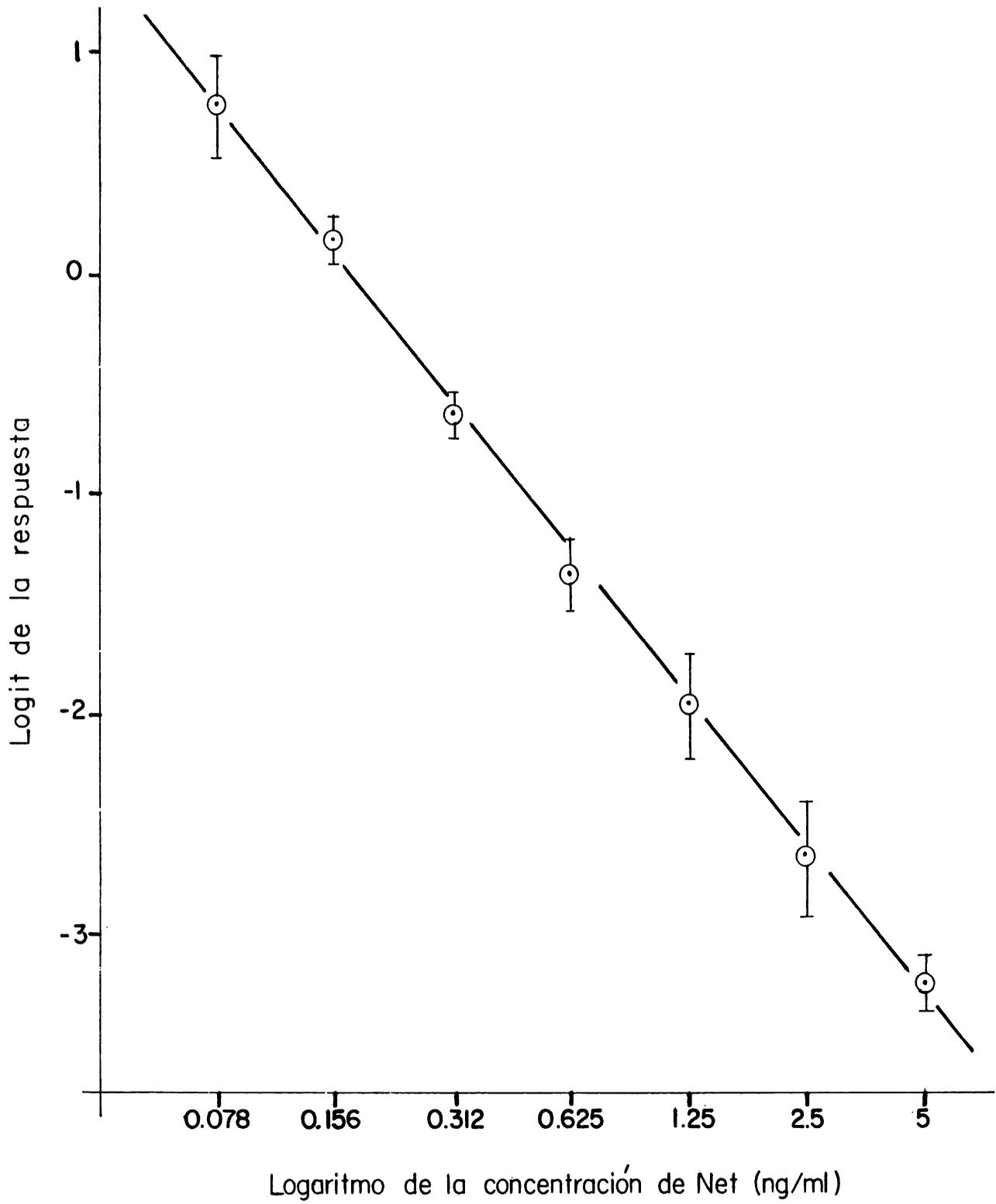


Figura 8 Curva dosis - respuesta linealizada de Noretindrona en suero empleando el método de radioinmunoanálisis (N=16).

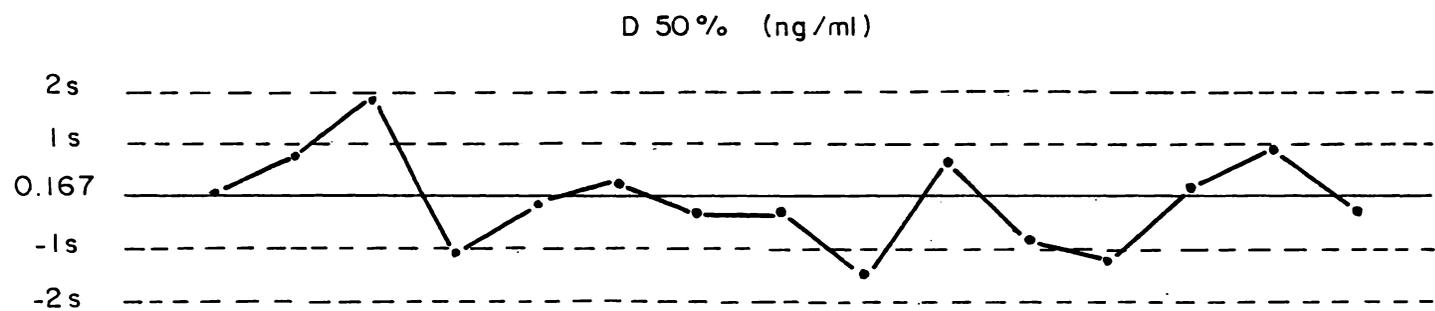
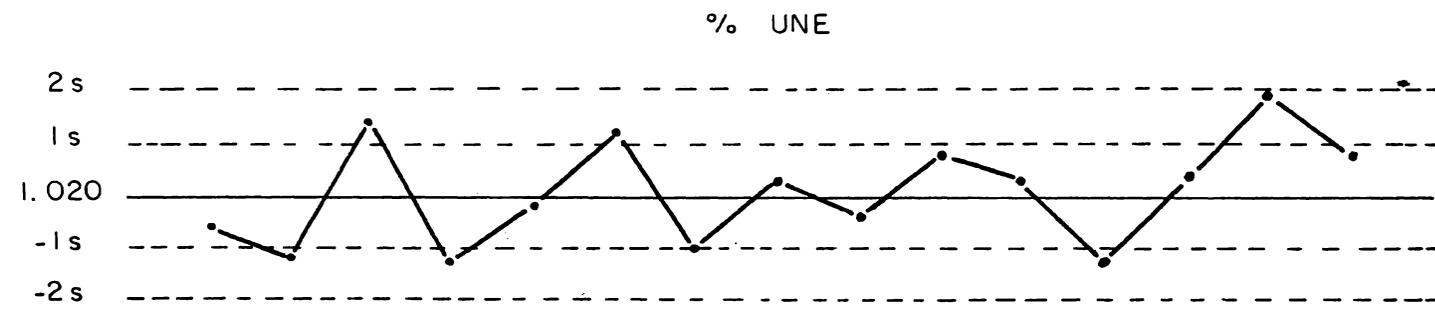
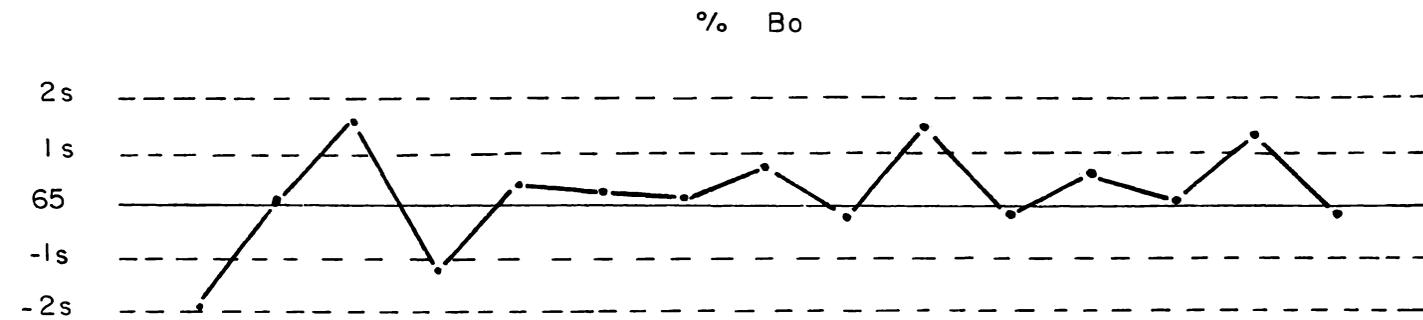


Figura 9 Control grafico de tres parametros de control de calidad del radioinmunoanálisis de Noretindrona. Bo = union maxima  
 UNE = union no especifica  
 D 50% = dosis al 50 por ciento

TABLA 6. EVALUACION DE LAS MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD DE NORETINDRONA.

a) VARIACION INTRA-ANALISIS			
Muestra	A	B	C
Valor teórico (pg/0.2 ml)	83.3	833	3333
$\bar{X}$ Valor calculado (pg/0.2 ml)	86.98	862	3243
S	6.61	66.3	207.5
% C.V.	7.6	7.7	6.4 ✓
n	10	10	10
Exactitud	+4.38%	+3.48	-2.70%

b) VARIACION INTERANALISIS			
Muestra	A	B	C
Valor teórico (pg/0.2ml)	83.3	833	3333
$\bar{X}$ Valor calculado (pg/0.2 ml)	87.16	880	3467
S	5.9	53.43	314.68
% C.V.	6.7	6	9
n	16	16	16
Exactitud	+4.63%	+5.6%	+4%

A = concentración baja

B = concentración media

C = concentración alta

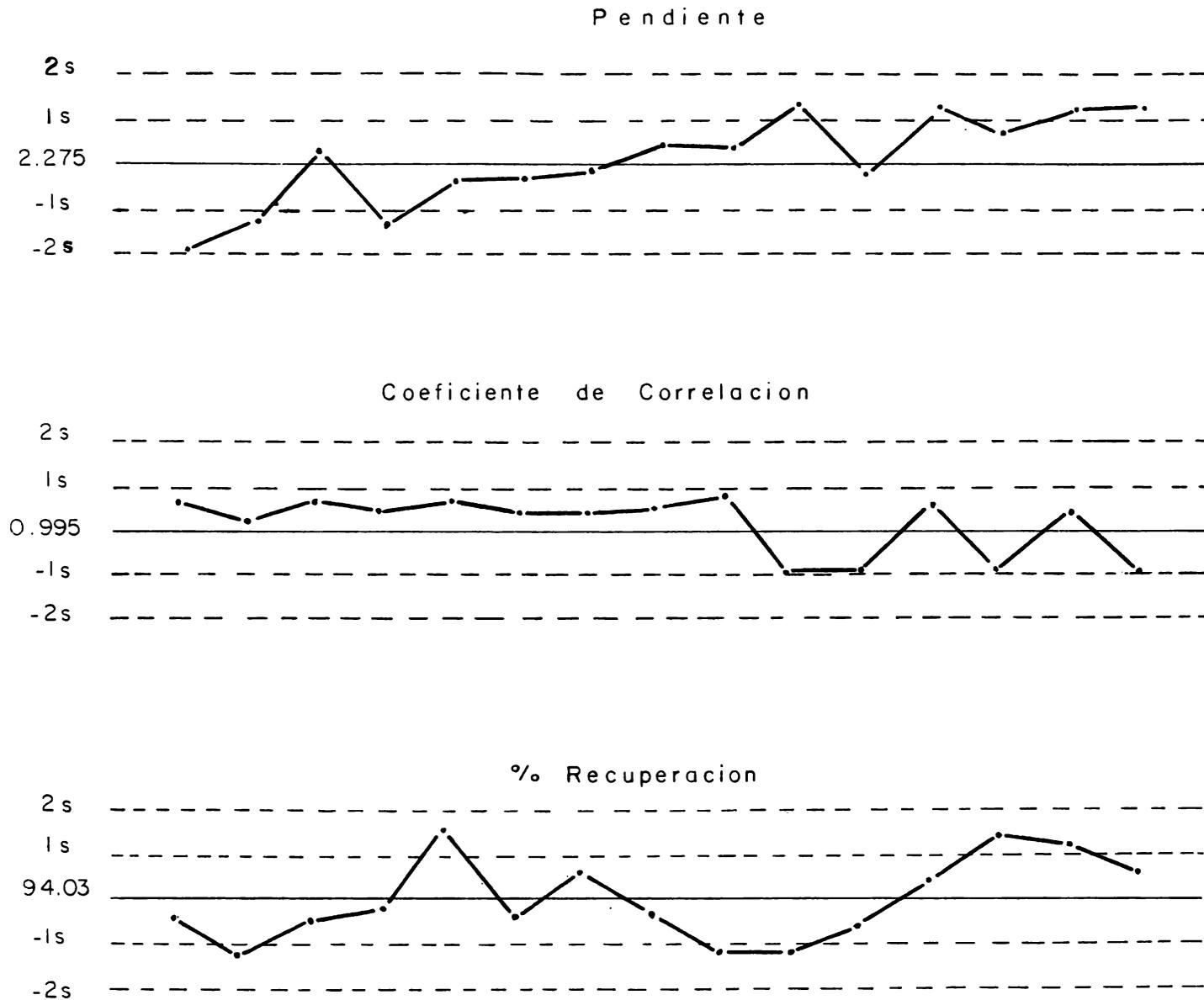


Figura 10 Fluctuaciones obtenidas de la pendiente (m), el coeficiente de correlacion (r) y el porcentaje de recuperacion a lo largo de los 16 ensayos de RIA para la validacion de la curva dosis respuesta linealizada de Noretindrona.

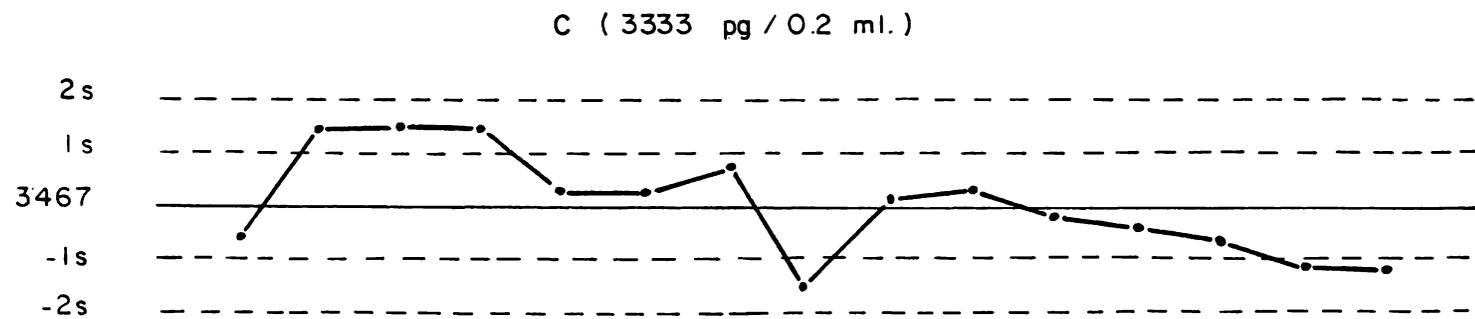
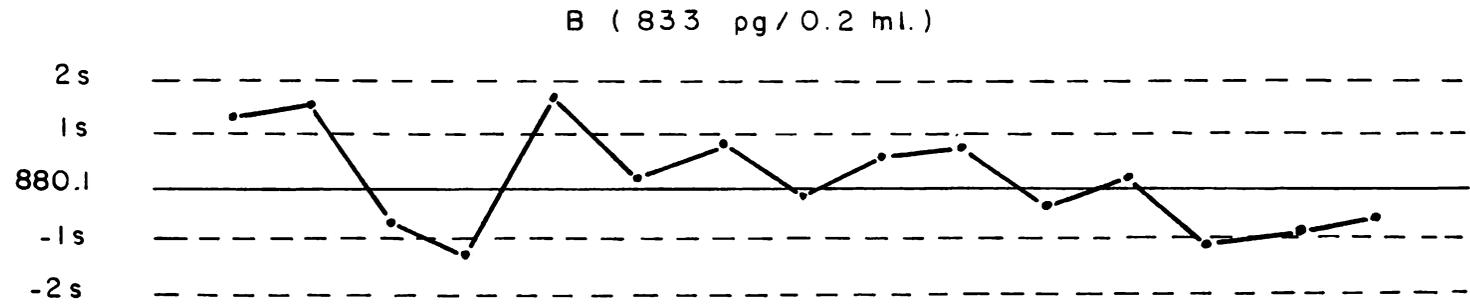
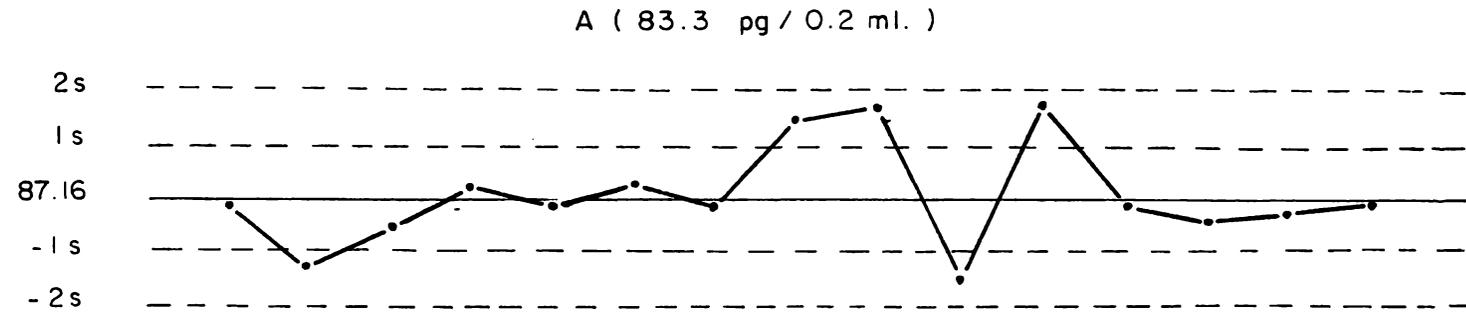


Figura II - Control gráfico de las muestras de control de calidad de radioinmunoanálisis de No-retindrona. A = Concentración baja  
B = Concentración media  
C = Concentración alta

#### 4.5 ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES FARMACEUTICAS DE NET EN VOLUNTARIO SANOS.

##### 4.5.1 POBLACION DE ESTUDIO.

Al seleccionar los voluntarios se tomó la precaución de que no existiera una gran variabilidad entre características tales como la edad, el peso y la estatura, así como hábitos alimenticios y de ejercicio. En su mayoría (7 de 10) eran estudiantes.

En la tabla 7 se muestran las variables biológicas de los 10 voluntarios, 5 de sexo femenino (F) y 5 de sexo masculino (M), que fueron seleccionados para realizar el estudio de bioequivalencia de NET. De ésta puede observarse que las fluctuaciones en edad (23 a 27 años), peso (52 a 70 kg) y estatura (1.55 a 1.72 m) son pequeñas.

##### 4.5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

Como se había mencionado en la sección de Parte Experimental, el estudio de bioequivalencia se realizó utilizando un diseño estadístico de "bloques al azar".

En el caso del sexo femenino las formulaciones se administraron entre el cuarto y sexto día del ciclo menstrual.

Para el sexo masculino la administración de cada formulación se realizó en intervalo de 30 días, entre cada una de ellas.

En la tabla 3 se muestra el diseño en bloques utilizado, separándolos en dos grupos (sexo femenino y sexo masculino) y la secuencia de administración de las tres formulaciones farmacéuticas de NET.

Para registrar las observaciones durante la administración del fármaco y el período de la toma de las muestras sanguíneas, se empleó una hoja control por voluntario.

##### 4.5.3 PERFILES DE NET EN SUERO CON RESPECTO AL TIEMPO.

En el apéndice 3 se presentan los valores individuales de la concentración en suero de NET a cada tiempo de muestreo. En estas tablas se ha incluido tanto la concentración en suero observada (C obs.), como la concentración estimada (C est., valor ajustado al aplicar el método de los residuos (181)). En la tercera columna se enlista el porcentaje de desviación (% Desv.) el cual representa la diferencia en porcentaje del valor de C obs. menos la de C est.

TABLA 7 VARIABLES BIOLÓGICAS DE LOS VOLUNTARIOS QUE PARTICIPARON EN EL ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE NORETINDRONA

Voluntario	Sexo	Edad (años)	Peso (Kg)	Estatura (m)
1 - LYE	F	26	52	1.56
2 - MC	F	24	55	1.55
3 - MaL	F	27	60	1.56
4 - CARM	F	24	60	1.61
5 - LTF	F	27	62	1.55
6 - FDB	M	27	70	1.66
7 - HOM	M	23	60	1.70
8 - GER	M	24	65	1.63
9 - RIC	M	23	68	1.72
10 - SAM	M	26	52	1.63

Tabla 8. Distribucion de los voluntarios y las diferentes formulaciones farmaceuticas empleando el diseño de bloques al azar utilizado en el estudio de bioequivalencia.

		TRATAMIENTOS			
No. Voluntario	Sexo Femenino	1° adm.	2° adm.	3° adm.	
BLOQUES	1	LYE	B	C	A
	2	MC	A	B	C
	3	MoL	B	A	C
	4	CARM	A	C	B
	5	LTF	B	C	A

		TRATAMIENTOS			
No. Voluntario	Sexo Masculino	1° adm.	2° adm.	3° adm.	
BLOQUES	6	FDB	B	A	C
	7	HDM	A	B	C
	8	GER	C	B	A
	9	RIC	B	C	A
	10	SAM	A	B	C

A = Producto comercial = Dianor<sup>®</sup>  
 B = Formulacion control = Net = Lact  
 C = Formulacion experimental = Net : Colest : Lact

En este mismo apéndice se presentan las gráficas de la concentración estimada en suero de NET contra el tiempo para cada uno de los voluntarios. Para lograr una mejor apreciación de las mismas, en una sola gráfica se presentan los perfiles obtenidos de un mismo voluntario después de la administración de las tres formulaciones farmacéuticas, por lo cual la formulación de NET: COLEST: LACT, sólo se graficó hasta las 36 horas.

Una vez obtenidos los perfiles séricos de NET contra tiempo, se procedió a determinar el modelo farmacocinético utilizando el criterio de Akaike (AIC) (el cual se describe en el apéndice 2), encontrándose que para todos los voluntarios y las tres formulaciones el modelo seleccionado fué modelo abierto de dos compartimientos (MADC) excepto para la voluntaria No. 3-MAL, la cual presentó un modelo abierto de un compartimiento (MAUC) después de la administración del producto comercial, no así para las formulaciones control y experimental, el cual también fué de dos compartimientos.

En el apéndice 4 se muestran los parámetros farmacocinéticos calculados, de manera individual. Los valores de  $C_{p\max}$ ,  $t_{\max}$  y  $t_{[NET] > 1 \text{ ng/ml}}$  se obtuvieron por observación directa de las gráficas de concentración en suero de NET contra tiempo; el ABC $\phi$  se calculó utilizando el método de los trapezoides;  $k_0$  fué obtenida según Zerbe y Colab. (182) y el resto de los parámetros fueron calculados empleando el método de los residuos (181) (apéndice 2).

En la tabla 9 se presentan los valores promedio de la concentración observada ( $C_{\text{obs}}$ ) y estimada ( $C_{\text{est}}$ ) en función del tiempo, obtenidos en los cinco voluntarios del sexo femenino. También se indica el porcentaje de desviación (% Desv.) y en la parte inferior de cada valor de  $C_{\text{est}}$  el error estándar correspondiente a cada punto. Para el producto comercial se promediaron los valores de cuatro voluntarias, ya que la voluntaria No. 3-MAL se descartó por presentar grandes fluctuaciones en los valores de concentración sérica. Dado a que estas variaciones no se presentaron al administrar la formulación control y la experimental, en estos casos, los valores promedio fueron de las cinco voluntarias.

En la figura 12 se presentan los perfiles promedio de la concentración sérica de NET contra tiempo, de las tres formulaciones farmacéuticas estudiadas en las voluntarias del sexo femenino.

En la tabla 10 se enmarcan los valores promedio de la concentración observada y estimada de NET en función del tiempo obtenidos de los voluntarios de sexo masculino ( $n=5$ ). Así como también el porcentaje de desviación obtenido de la diferencia de  $C_{\text{obs}}$  y  $C_{\text{est}}$ , y el error estándar correspondiente a cada valor de  $C_{\text{est}}$ .

TABLA 9 DATOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACION SERICA A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA DOSIS ORAL DE 0.35 mg DE NORETINDRONA DE TRES FORMAS FARMACEUTICAS A CINCO VOLUNTARIAS CLINICAMENTE SANAS DE SEXO FEMENINO.

Tiempo hrs	Dianor			Net: Lact			Net: Colest:Lact		
	Cob.	Cest	% Desv	Cob	Cest	% Desv	Cobs	Cest	% Desv
0.5	1.4	1.0 ± 0.27	-28.57	1.02	1.00 ±0.07	-1.96	0.878	0.88 ±0.15	0.22
1	3.45	3.05 ± 0.43	-11.59	1.68	2.10 ±0.27	25	1.151	1.20 ±0.17	4.25
1.5	3.22	3.3 ± 0.45	2.48	2.28	2.40 ±0.40	5.28	1.459	1.45 ± 0.15	-0.61
2	2.96	3.10 ± 0.69	4.72	2.43	2.25 ±0.22	-7.40	1.706	1.55 ± 0.18	-9.14
4	1.92	1.90 ± 0.29	-1.04	1.50	1.30 ±0.13	-13	1.524	1.56 ± 0.33	2.36
8	0.992	0.95 ± 0.20	-4.23	0.88	0.88 ±0.12	0	1.4462	1.55 ± 0.34	7.19
12	0.633	0.76 ± 0.12	20	0.66	0.72 ±0.07	9	1.229	1.30 ± 0.19	5.27
24	0.559	0.585 ± 0.108	-4.6	0.516	0.54 ±0.04	4.6	0.85	0.90 ± 0.06	5.88
36	0.478	0.453 ± 0.06	-5.23	0.417	0.401 ±0.08	-3.8	0.715	0.692 ± 0.10	-3.21
48							0.624	0.527 ± 0.07	-15.6
60							0.554	0.402 ± 0.06	-27
72							0.44	0.307 ± 0.05	-30.2

C obs= Concentración observada

Cest = Concentración estimada al aplicar el método de los residuos

% Desv = Diferencia porcentual entre Cob y Cest

En la parte inferior de cada valor de Cest se reporta ± error estándar

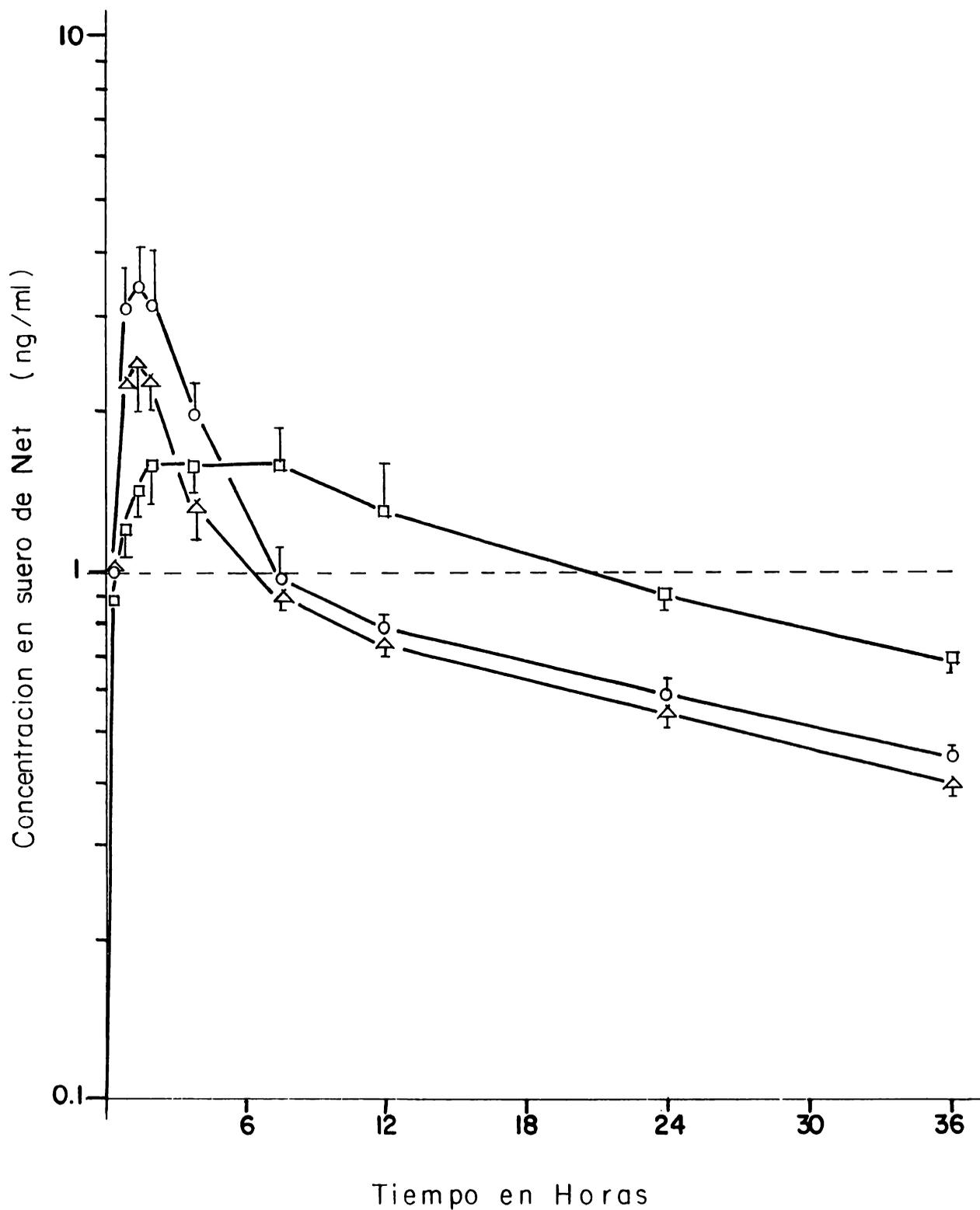


Figura 12 Concentración sérica promedio de Noretindrona contra tiempo, después de la administración de una dosis oral única de 0.35 mg de Net de Dianor<sup>®</sup> -○- (n=4) Net:Lact -△- (n=5) y Net:colest:Lact -□- (n=5) en una población femenina.

Los perfiles obtenidos de la concentración estimada promedio de NET en suero contra tiempo en el sexo masculino, para cada una de las tres formulaciones farmacéuticas se muestran en la figura 3.

En la tabla 11 se muestran los parámetros farmacocinéticos promedio y los intervalos de confianza al 95% obtenidos después de la administración oral de las tres diferentes formas farmacéuticas de NET. Estos valores promedio fueron calculados a partir de los datos individuales que se encuentran en el apéndice 4.

TABLA 10 DATOS PROMEDIO DE LA CONCENTRACION SERICA CONTRA TIEMPO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA DOSIS ORAL DE 0.35 mg. DE NORENTINDRONA DE TRES FORMAS FARMACEUTICAS A CINCO VOLUNTARIOS CLINICAMENTE SANOS DE SEXO MASCULINO.

Tiempo hrs	Dianor			Net: Lact			Net:Colect :Lact		
	Cobs	Cest	% Desv	Cobs	Cest	% Desv	Cobs	Cest	% Desv
0.5	1.84	1.35 ±0.55	-26	1.009	0.905 ±0.26	-10.3	1.164	1.164 ±0.3	0
1.0	3.167	3.3 ±0.74	4.19	1.703	1.60 ±0.22	-6.05	1.448	1.44 ±0.47	-0.55
1.5	3.713	3.5 ±0.56	-5.7	1.83	1.80 ±0.306	-1.63	1.387	1.45 ±0.55	4.5
2	2.769	3.4 ±0.26	22.7	1.52	1.60 ±0.27	5.26	1.442	1.44 ±0.45	-0.13
4	1.336	1.60 ±0.11	19.76	0.98	0.87 ±0.21	-11.2	1.322	1.35 ±0.10	2.11
8	0.75	0.92 ±0.08	22	0.600	0.60 ±0.13	0	1.188	1.20 ±0.10	1.01
12	0.51	0.514 ±0.095	0.78	0.438	0.449 ±0.05	2.5	1.10	1.15 ±0.2	4.54
24	0.39	0.383 ±0.07	1.79	0.364	0.345 ±0.05	-5.2	0.556	0.65 ±0.06	16.9
36	0.284	0.286 ±0.07	0.70	0.259	0.265 ±0.03	3.31	0.481	0.42 ±0.06	-12.7
48							0.416	0.317 ±0.086	-23.8
60							0.344	0.239 ±0.08	-30.5
72							0.28	0.181 ±0.08	-35.3

Cobs= Concentración observada

Cest= Concentración estimada al aplicar el método de los residuos.

%Desv.= Diferencia porcentual de Cest menos Cobs.

En la parte inferior de cada valor de Cest se reporta ± el error estándar.

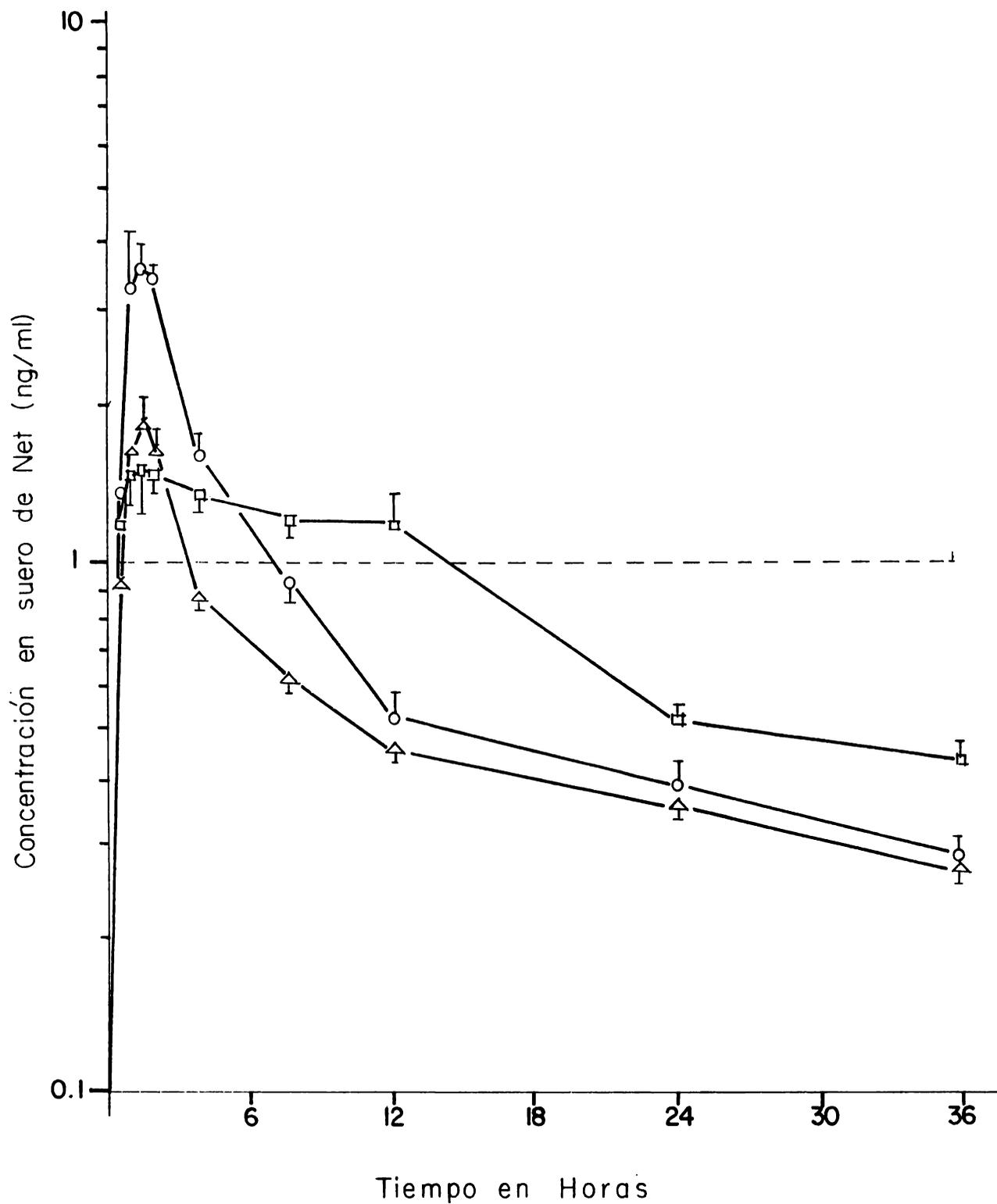


Figura 13 Concentración sérica promedio de Noretindrona contra tiempo, después de la administración de una dosis oral única (0.35 mg.) de Dianor<sup>®</sup> (-○-) Net:Lact (-△-) y Net:colest:Lact (-□-), a 5 voluntarios de sexo masculino.

## V. DISCUSION DE RESULTADOS.

## V. DISCUSION DE RESULTADOS.

### 5.1 DETERMINACION DE LA PUREZA DE NET ANTES Y DESPUES DEL PROCESO DE FUNDICION.

Para la elaboración de una formulación farmacéutica es de suma importancia la pureza del principio activo a emplear. Para NET ésta fué verificada con la determinación de su punto de fusión, el cual fué de 203° a 205°C, también se le determinó su Rf por cromatografía en capa fina siendo éste igual a 0.80; En las figuras 1 y 2 se muestran los espectros de absorción al u.v. e I.R. respectivamente, en los cuales se puede observar que corresponden a NET. En base a todos estos resultados, se demuestra la pureza de la NET utilizada.

Dado que para obtener las formulaciones de NET: COLEST: - LACT y de NET: LACT la Noretindrona se fundió y enfrió bruscamente, se verificó que el fármaco no sufriera cambios estructurales.

El Rf calculado de una cromatografía en capa fina fué igual al obtenido de NET sin fundir, de igual manera sólo se obtuvo una sola mancha, lo que indica que NET no se descompone o degrada, después de este proceso. Por otro lado, tanto en el espectro de u.v. (fig. 3) como en el de I.R. (fig. 4), no se detectaron diferencias con respecto a los de la muestra de NET no fundido. Por lo que los resultados obtenidos de los parámetros antes mencionados indican que NET después de ser fundida y enfriada bruscamente no se descompone y mantiene su grado de pureza.

Algunos estudios en animales han demostrado un aumento significativo en la potencia de hormonas esteroides cuando éstas son administradas en formas de liberación sostenida (147). La mayoría de estas son preparadas como implantes subcutáneos y emplean polímeros o lípidos como vehículo; la desventaja que presentan, sobre todo éstos últimos es su baja reproducibilidad en la elaboración y por lo tanto en la respuesta farmacológica. Joseph y Colab. (146) ofrecen una alternativa a éste problema, que es la elaboración de implantes de liberación sostenida a base de una mezcla eutéctica del esteroide con esteroides. De acuerdo con los reportes de estos autores, fué con el colesterol con el que obtuvieron mejores resultados.

En base a estos antecedentes, se eligió al colesterol para la elaboración de la formulación experimental. La proporción empleada de colesterol: NET fué de 4:1, ya que ésta proporcionaba una mezcla eutéctica.

## 5.2 CONTROL QUÍMICO DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES FARMACEUTICAS DE NORETINDRONA.

Es de vital importancia contar con un control químico adecuado en la elaboración de una formulación farmacéutica.

Además es esencial que éste se lleve a cabo tanto en el paso intermedio de la manufactura, como en el producto terminal.

En la figura 5 y en la tabla 2 se presentan los datos de la validación del método espectrofotométrico para cuantificar NET en las diferentes formulaciones; a pesar de que este no es el reportado por la U.S.P. se puede observar que el método es sensible, reproducible y por lo tanto confiable, ya que se logró una muy buena linealidad ( $r = 0.9997$ ) en un intervalo de concentraciones de 0.62 a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con una pendiente de 0.05613 y un intercepto igual a 0.0152. Los valores del coeficiente de variación que se obtuvieron para cada una de las concentraciones de la curva patrón fueron menores del 5% lo cual indica una buena repetibilidad del método.

De acuerdo con la U.S.P. cuando la cantidad del principio activo en la formulación farmacéutica es muy pequeña ( $< 1 \text{ mg}$ ) se deberá efectuar la prueba de uniformidad de contenido, esto es, cuantificar de manera individual la cantidad del principio activo presente en cada tableta o cápsula.

Para el caso de la formulación experimental (NET: COLEST: LACT), los resultados de la determinación del contenido de NET tanto en los pasos intermedios de la elaboración, como en el producto terminal (tabla 3) estuvieron dentro de los límites que establece la U.S.P. (90% - 110%).

En la tabla 4 se muestra la variación de peso de las cápsulas vacías y llenas, la cuál, en ambos casos no presentó un coeficiente de variación mayor al 4%.

El error que se obtuvo del peso promedio de la mezcla de NET: COLEST: LACT por cápsula (tabla 4), fué pequeño (-0.08%), por lo que la desventaja y por lo tanto el error que representaba realizar la encapsulación manualmente no fué significativo.

De acuerdo con el mismo protocolo con el cual se desarrolló la formulación experimental (NET: COLEST: LACT), se preparó una formulación de NET con lactosa, sin colesterol (NET: LACT), la cual se empleó como formulación control de la preparación que se propone como de liberación sostenida.

Al efectuar la prueba de contenido de NET en la formulación control se encontró que éste fué del 96.75% en el producto intermedio y del 93.85% en el producto terminal (tabla 3), lo cual indica que el método de elaboración fué bueno. La variación de peso de las cápsulas vacías y llenas no presentó un coeficiente de variación mayor al 3% (tabla 4), lo que refleja una alta uniformidad de las mismas.

Al igual que la formulación experimental, la control presentó un error muy pequeño (-0.90%) comparado con el valor teórico con respecto al peso promedio de la mezcla de NET: LACT por cápsula (tabla 4).

Con respecto al producto comercial, Dianor<sup>(R)</sup>, el contenido promedio de NET obtenido fué del 95% (tabla 3) y la variación de peso de las tabletas fué de  $\pm 0.8\%$  (tabla 4).

La U.S.P. acepta para estos dos parámetros una dispersión del  $100\% \pm 10\%$ , por lo que tanto el producto comercial, como las formulaciones experimental y control pasaron la prueba de control químico.

Es importante mencionar que la dosis de NET empleada para la elaboración de las formulaciones experimental y control fué de 0.35 mg, que es la misma que contiene el producto comercial elegido.

### 5.3 OPTIMIZACION DEL METODO ANALITICO.

Desde 1960, el radioinmunoanálisis (RIA) ha sido una de las técnicas más importantes para cuantificar cantidades extremadamente pequeñas (en rangos de pg), de diversos compuestos químicos (183). La cuantificación de estrógenos y progestinas sintéticas, en fluidos biológicos utilizando este método, ha propiciado un gran avance en los estudios de farmacología clínica, ya que con la determinación de éstos, es posible estudiar la seguridad, potencia, eficiencia y farmacocinética, de los métodos orales de anticoncepción (183).

#### 5.3.1 DILUCION DE TRABAJO DEL ANTICUERPO.

Las características que debe tener la dilución de trabajo de Ac para ser elegida como tal son, 1) que presente un % U entre el 40% y el 60%, 2) que logre una buena discriminación entre una curva de dilución de Ac con: a) Ag radiactivo en ausencia de Ag no radiactivo, b) Ag radiactivo en presencia de Ag no radiactivo, éste en la concentración más pequeña de la curva dosis-respuesta y c) Ag radiactivo en presencia de Ag no radiactivo, este en la concentración más grande de la curva dosis-respuesta y 3) que presente un punto de inflexión en la curva de dilución de Ac.

En la figura 6 se muestran las curvas de dilución del anticuerpo con Ag radiactivo en ausencia de Ag no radiactivo (-○-) en presencia de Ag no radiactivo en una concentración de 15 pg/200 µl (-●-) y de 1000 pg/200 µl (-△-), en las que se midió la capacidad de interacción del Ac con el Ag como porcentaje de unión (%U); por lo que un alto %U implicó un buen reconocimiento e interacción y un valor bajo de %U una interacción pobre.

De acuerdo con el perfil obtenido se encontró que las diluciones de 1:32000 y 1: 64000 son óptimas para trabajar, ya que en ambas se presetan punto de inflexión. De éstas se eligió la de 1:64000 ya que el porcentaje de unión al antígeno se encuentra entre el 40 y el 60%, además de que con esta dilución el anticuerpo presenta una mayor dicriminación entre la curva que sólo contiene Ag radiactivo (-○-) y la que contienen tanto Ag radiactivo como no radiactivo (-●- y -△-).

Esta dilución de trabajo elegida, coincide con la reportada por Tovar, N.B. y Colab. (184), quien empleó el mismo anticuerpo de NET.

#### 5.3.2 VALIDACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA DE NET EN SUERO.

La precisión en la preparación de la dilución del Ag no radiactivo para la curva dosis-respuesta es fundamental para obtener un alto grado de exactitud. Por lo tanto es recomendable que después de pesar la cantidad deseada y antes de realizar

las dobles diluciones; se confirme su concentración por otros procedimientos fisicoquímicos, tales como la absorción de luz ultravioleta (185). De aquí que cuando eran preparadas las soluciones de NET para la curva dosis-respuesta, siempre fué verificada la concentración de la solución patrón a partir de la cual se realizaban las dobles diluciones, como se muestra en la sección 3.4.4.2. Sólo se utilizaron aquellas soluciones que no presentaban un error mayor de  $\pm 3\%$ .

Es igualmente importante la pureza tanto de la hormona radiactiva como de la no radiactiva. En la figura 7 se muestra el radiocromatograma obtenido de  $^3\text{H-NET}$ , el haber obtenido un solo pico es indicativo de que la muestra está pura.

Con respecto al Ag no radiactivo su pureza fué comprobada con sus espectros de absorción en U.V e I.R. (Figs. 1 y 2).

En el RIA la curva dosis-respuesta representa la relación entre el grado de unión del Ag radiactivo y no radiactivo con el Ac. Una de las alternativas para la expresión gráfica de la curva dosis-respuesta es la transformación LOGIT-LOG (185).

La validación de la curva dosis-respuesta de NET se desarrolló con la prueba de diferentes condiciones de trabajo; en la tabla 1 se enmarcan las combinaciones que se utilizaron y en la tabla 5 los resultados de las mismas. Es de suma importancia el número de cuentas totales (CT) del Ag radiactivo empleadas en el ensayo, ya que una sobresaturación de éste, impediría un buen desplazamiento del anticuerpo y la unión máxima del mismo podría verse abatida. De aquí que se hayan probado 5,000 cpm y 10,000 cpm como CT de  $6,7 \text{ } ^3\text{H-NET}$  (antígeno radiactivo).

Con respecto al tiempo y temperatura de incubación se ha reportado que para el RIA de NET es necesario incubar la mezcla del ensayo durante 60 min. a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente 30 min. a  $4^\circ\text{C}$  para la formación del complejo antígeno-anticuerpo (184). Por cuestiones prácticas además de este tiempo y temperatura de incubación, la mezcla de reacción se incubó a  $4^\circ\text{C}$  durante 18 hrs. Los resultados obtenidos (tabla 5) muestran que cuando se emplearon 5,000 cpm como CT de  $^3\text{H-NET}$ , se logró un mejor desplazamiento del Ac y una unión máxima superior que la obtenida con la combinación en que se emplearon como CT 10,000 cpm.

Con respecto al tiempo de temperatura de incubación no se encontraron diferencias significativas entre las opciones de 60 min. a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente 30 min. a  $4^\circ\text{C}$  y 18 hrs. a  $4^\circ\text{C}$ .

En cuanto al tratamiento previo de las muestras, al utilizar el método directo se obtuvo una linealidad en el intervalo de concentraciones del 0.156 a 5 ng/ml con una pendiente promedio de -2.03 y una correlación de 0.988. La unión no específica se vió incrementada (3%) cuando se emplearon 10,000 cpm de  $6,7 \text{ } ^3\text{H-NET}$ , lo mismo que la D50% (0.415 ng/ml), mientras que el % Bo se vió disminuido (40%) con respecto al método de extracción.

Cuando las muestras fueron pretratadas con el método de extracción se obtuvieron mejores resultados, ya que con éste la linealidad obtenida de la curva dosis-respuesta de NET abarcó un intervalo de concentraciones mayor al emplear tanto 5,000 como 10,000 cpm de 6,7  $^3\text{H}$ -NET. Este intervalo fué de 0.078 a 5 ng/ml. El valor promedio de la pendiente fué de -2.25 cuando se emplearon 5,000 cpm y cuando se incrementó el número de CT, ésta se vió disminuida notoriamente (-2.03). La D50% promedio fué de 0.16 ng/ml con 5,000 cpm, mientras que con 10,000 cpm se elevó a 0.34 ng/ml. Lo que nos refleja que con 5,000 cpm de 6,7  $^3\text{H}$ -NET se obtiene un mejor desplazamiento del Ac, pues el valor de la pendiente está más cercano al teórico (-2.3) y el método es más sensible, ya que mientras menor sea el valor de D50% (sin descuidar el resto de los parámetros como % Bo y %UNE), menor será la cantidad de anticuerpo necesario para unir el 50% de Ag radiactivo.

Por lo cual el método de extracción permitió purificar y concentrar la muestra logrando una mayor especificidad y sensibilidad ya que los valores de %Bo, m, r, fueron mayores con respecto al método directo y los valores de % UNE y D50% fueron menores (tabla 5). Asimismo la dosis mínima detectable fué menor para el m. de extracción (0.078 ng/ml) que para el m. directo (0.156 ng/ml).

De acuerdo con los resultados obtenidos se eligió la combinación No. 4: 5,000 cpm de 6,7  $^3\text{H}$ -NET, periodo y temperatura de incubación igual a 18 hrs. a 4°C y el método de extracción como tratamiento de las muestras antes de su cuantificación por RIA. En el apéndice 1 se resume el protocolo empleado para la cuantificación de NET en suero utilizando las condiciones de trabajo previamente elegidas.

### 5.3.3 VALIDACION DE LA CURVA DOSIS-RESPUESTA LINEARIZADA DE NET

Una vez elegida la combinación No. 4 se demostró su reproducibilidad en base a un registro de las variaciones presentadas en el %Bo, el %UNE, la D50%, la pendiente, el coeficiente de correlación y el porcentaje de recuperaciones, a lo largo de 16 ensayos.

En la figura 8 se muestra la curva dosis-respuesta promedio (n=16) en la cual se demuestra la linealidad de la misma en un intervalo de concentraciones de 0.078 a 5 ng/ml, con una pendiente igual a -2.275 y un coeficiente de correlación de 0.9950.

En las figuras 9 y 10 se presentan las variaciones interanálisis de los distintos parámetros empleados para la validación de la curva dosis-respuesta linearizada. En todos los parámetros las dispersiones no fueron mayores a  $\pm 2$  desviaciones estándar lo que nos permite concluir que el método es adecuado, pues de acuerdo con los lineamientos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (180. 185) una curva dosis-respuesta linearizada se considera validada cuando la dispersión de los parámetros: %Bo, %UNE, D50%, m y r no presentan una fluctuación mayor a  $\pm 2$  desviaciones estándar en cuando menos 10 ensayos independientes.

En la figura 10 se reportan las variaciones para el porcentaje de recuperación en la que también se observa que la dispersión no fue mayor a  $\pm 2$  desviaciones estándar, lo cual es indicativo de que el método de extracción es reproducible. El porcentaje de extracción más bajo fué del 90% lo que refleja que el método además de confiable es efectivo.

#### 5.3.4 CONTROL DE CALIDAD DEL RADIOINMUNOANÁLISIS DE NET.

El control de calidad en el radioinmunoanálisis permite un análisis crítico de los resultados a corto y largo plazo. A corto plazo permitiendo rechazar valores individuales o aún el análisis completo y a largo plazo, permitiendo valorar la estabilidad, reproducibilidad, sensibilidad y exactitud del método (185).

En la tabla 6 se presentan los resultados de las muestras de control de calidad utilizadas, en la cual se puede observar que el error obtenido entre el valor teórico y el calculado fué menor del 6% (valor mínimo aceptado por la O.M.S.). El coeficiente de variación intra e interanálisis de las tres muestras no fué mayor del 10%. Ambos resultados reflejan que el procedimiento empleado para la preparación de las muestras de control de calidad es confiable y se corrobora la reproducibilidad del método analítico.

En la figura 11 se pueden apreciar los valores promedio  $\pm 1$  y  $\pm 2$  desviaciones estándar de las tres muestras de control de calidad empleadas. En las tres, las fluctuaciones a lo largo de 16 ensayos no fueron mayores a  $\pm 2$  desviaciones estándar lo que es fiel reflejo de que el método de radioinmunoanálisis presenta un buen control de calidad; ya que cumple con las especificaciones de la O.M.S. (185).

#### 5.4 ESTUDIO DE BIOEQUIVALENCIA DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES DE NET EN VOLUNTARIOS SANOS.

La inclusión de voluntarios de sexo masculino en el estudio de bioequivalencia de un producto de aplicación en una población femenina fué con el fin de estudiar también las diferencias entre sexos.

En el caso de los voluntarios del sexo femenino era de suma importancia que la administración de las diferentes formulaciones farmacéuticas fuese siempre entre el cuarto y el sexto día del ciclo menstrual, ya que en este periodo, las hormonas endógenas que participan en el ciclo, se encuentran en el estado basal y por ende no interfieren en la cinética de la Noretindrona (140).

La finalidad de incluir en el estudio de bioequivalencia una formulación control, fué la de poder distinguir si las diferencias entre el producto comercial y experimental se debían al efecto del colesterol presente en la formulación o a la forma farmacéutica (cápsula o tableta); ya que existía el antecedente de Avendano y Colab. (110) quien sugirió que era posible mantener niveles constantes en sangre de un esteroide por tiempos más prolongados cuando éste era administrado en una cápsula. Sin embargo también existen reportes en los cuales no se encontraron diferencias al administrarlo en cápsula o tableta (109-111).

En la tabla 11 se muestran los valores promedio con sus intervalos de confianza al 95% de los diferentes parámetros farmacocinéticos que se calcularon después de la administración de las diferentes formulaciones farmacéuticas. Los valores de  $k_a$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ , ABC, Cpmáx y tmáx obtenidos después de la administración del producto comercial y del control corresponden con los encontrados en la literatura (89, 105, 132, 134, 135, 139). No así para el caso de la formulación con colesterol, para la cual sólo los valores de  $\alpha$ ,  $\beta$  y tmáx concuerdan con los de la literatura mientras que los de ABC y Cpmáx difieren de los reportados.

Todas las formulaciones a excepción de Dianor en la voluntaria No. 3 Mal (Fig. 16, apéndice 3), se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimientos (MADC), lo cual concuerda con lo reportado por diferentes autores (89, 105, 132, 134, 135, 139).

Analizando las gráficas individuales de la concentración en suero de NET contra tiempo, se puede apreciar que tanto el producto comercial Dianor, como la formulación control NET: LACT y la experimental NET: COLEST: LACT, presentan un incremento rápido de la concentración de NET en un período de 0 a 2.5 hrs. después de administrada la dosis.

En ambos sexos, después de que el producto comercial y el control habían alcanzado una concentración máxima, los niveles séricos disminuyeron, con un cambio de pendiente (característica de un MADC) hasta alcanzar concentraciones en el orden de 0.25 a

TABLA 11 PARAMETROS FARMACINETICOS PROMEDIO E INTERVALOS DE CONFIANZA AL 95 %, OBTENIDOS EN VOLUNTARIOS CLINICAMENTE SANOS, DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA DOSIS ORAL UNICA DE 0.35 mg DE NORETINDRONA DE UN PRODUCTO COMERCIAL (DIANOR<sup>®</sup>), UNA FORMULACION CONTROL (NET:LACT) Y UNA EXPERIMENTAL (NET:COLEST:LACT)

CONSTANTE FARMACOCINETICA	DIANOR <sup>®</sup>		NET:LACT		NET:COLEST:LACT	
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
$k_a$ ( $\text{hrs}^{-1}$ )	1.6164 (1.16-2.06)	1.9392 (1.41-2.46)	1.3677 (0.74-1.98)	2.073 (1.31-2.83)		
$k_o$ ( $\text{ng/hr}$ )					0.0281 (0.01-0.04)	0.04717 (0.01-0.07)
$\alpha$ ( $\text{hrs}^{-1}$ )	0.3351 (0.22-0.48)	0.5224 (0.39-0.64)	0.4434 (0.30-0.51)	0.4728 (0.17-0.76)	0.4693 (0.36-0.57)	0.32217 (0.17-0.46)
$\beta$ ( $\text{hrs}^{-1}$ )	0.0560 (0.04-0.069)	0.0605 (0.04-0.07)	0.0564 (0.04-0.07)	0.0569 (0.05-0.06)	0.0552 (0.04-0.064)	0.0533 (0.04-0.06)
$t_{1/2ka}$ ( $\text{hrs}$ )	0.4446 (0.31-0.57)	0.3370 (0.27-0.47)	0.492 (0.28-0.70)	0.356 (0.23-0.47)		

continuación de la tabla 11

CONSTANTE FARMACOCINETICA	DIANOR <sup>®</sup>		NET:LACT		NET:COLEST:LACT	
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
$t_{1/2 \alpha}$ (hrs)	2.06975 (1.6-2.97)	1.3614 (1.07-1.64)	1.7244 (1.35-2.09)	1.8298 (0.66-2.9)	1.5276 (1.09-1.95)	2.0382 (1.09-2.98)
$t_{1/2 \beta}$ (hrs)	12.3271 (9.77-14.87)	11.67 (9.63-13.71)	12.6168 (9.93-15.3)	12.2548 (10.9-13.6)	12.3144 (10.1-14.4)	13.0758 (12.0-14.15)
$ABC_{\infty}$ (ng ml <sup>-1</sup> hr)	34.5652 (16.9-52.5)	32.269 (28.4-36.1)	40.339 (34.3-46.3)	30.536 (20.5-40.5)	64.375 (37.5-91.2)	47.03 (25.8-68.1)
$C_{p \max}$ (ng/ml)	3.448 (2.31-4.58)	3.958 (3.06-4.85)	2.85 (2.06-3.63)	1.87 (1.1-2.63)	1.415 (1.08-1.74)	1.452 (0.75-2.15)
$t_{\max}$ (hrs)	1.60 (0.92-2.27)	1.3 (0.74-1.85)	1.6 (1.08-2.11)	1.4 (1.12-1.67)	2.4 (1.28-3.51)	1.5 (0.85-2.14)
$t_{[NET] > 1ng/ml}$ (hrs)	6.0666 (0.85-11.2)	5.74 (3.93-7.54)	7.68 (4.09-11.26)	3.125 (1.68-4.56)	19.75 (11.45-30.0)	16.875 (11.08-22.66)

0.4 ng/ml después de 36 hrs. de la administración oral, con un tiempo de vida media de distribución de 1.3 a 2.06 hrs. y uno de eliminación de 11.6 a 12.3 hrs.

En cambio, el comportamiento de la formulación de NET: COLEST: LACT fué diferente, ya que después de que alcanzó su Cpmáx, la concentración de NET en suero permaneció constante durante un período promedio de aproximadamente 10 hrs. (Figs. 12 y 13); tiempo después del cual la concentración del fármaco disminuyó con un comportamiento igual al presentado por las otras dos formulaciones, con un  $t_{1/2\alpha}$  : de 1.52 a 2.03 hrs. y un  $t_{1/2\beta}$  de 13 hrs. La concentración en suero de NET, después de 36 hrs. de la administración de la formulación de NET: COLEST: LACT, se encontró entre 0.42 a 0.7 ng/ml.

De acuerdo con los reportes en la literatura (186) se eligió 1 ng/ml como concentración mínima efectiva de anticoncepción, si se observan en las gráficas de concentración en suero de NET con respecto al tiempo, este valor aparece marcado con una línea para facilitar el análisis de los resultados.

En ambos sexos se encontraron concentraciones en suero superiores a 1 ng/ml ( $t_{[Net]} > 1$  ng/ml) por tiempos más prolongados al administrar la preparación con colesterol que cuando se administró el Dianor o la formulación control.

Los valores de Cpmáx alcanzados después de administrar el Dianor y NET: LACT en el sexo femenino, fueron notablemente mayores que el alcanzado por NET: COLEST: LACT. Para el caso del sexo masculino el Cpmáx después de la administración de Dianor también fué mayor que el alcanzado por NET: COLEST: LACT, pero éste no fué diferente al obtenido con la preparación de NET: LACT.

El tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima ( $t_{máx}$ ) fué muy semejante para las tres formulaciones (1 a 2 hrs), a excepción de dos voluntarios 1-LYE y 7-HOM (Figs. 14 y 20 respectivamente del apéndice 3), cuyo  $t_{máx}$  fué de 4 y 7 hrs. respectivamente, después de la administración de la formulación de NET: COLEST: LACT.

Con respecto al ABC<sub>3</sub> obtenida, ésta fué menor para el Dianor y la preparación control, que para la formulación de NET: COLEST: LACT en ambos sexos. Estas diferencias se presentaron en 8 de los 10 voluntarios, cuatro del sexo femenino y cuatro del masculino.

La voluntaria No. 3-MAL (Fig. 16, apéndice 3), después de la administración del producto comercial presentó un Cpmáx de 2.94 ng/ml, a las 2 hrs. después del cual la concentración del fármaco disminuyó; pero 12 hrs. posteriores a la administración de la formulación se presentó un notable incremento de la concen

tración sérica de NET alcanzando una concentración de 9.2 ng/ml y aún después de 36 hrs. de la administración del fármaco la concentración de NET era muy alta (2.4 ng/ml). Estos valores, coincidieron con algunas molestias como mareo, las cuales probablemente se hayan debido a una recirculación enterohepática de NET. En base a estos resultados se consideró que esta voluntaria no era un buen candidato para el uso de éste tipo de anticonceptivo.

La formulación de NET: COLEST: LACT en el voluntario 7-HOM (Fig. 20, apéndice 3 ) presentó una liberación sostenida, pero los niveles séricos de NET nunca fueron mayores a la concentración mínima efectiva de anticoncepción (1 ng/ml).

En el caso del voluntario 9-RIC (Fig. 22, apéndice 3 ) no se encontraron diferencias en los perfiles séricos de NET después de la administración de las diferentes formulaciones farmacéuticas.

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre formulaciones de un mismo sexo se empleó el análisis de varianza de dos vías y la prueba de análisis de rangos múltiples de Newman-Keuls. Para determinar las diferencias entre sexos después de la administración de cada una de las formulaciones se empleó la prueba t de Student.

En el apéndice 2 se encuentran las fórmulas utilizadas en las diferentes pruebas estadísticas empleadas.

En la tabla 12 se puede apreciar que para el sexo femenino el producto comercial Dianor y el experimental NET: COLEST: LACT, son BIOINEQUIVALENTES así como también lo fueron el control NET: LACT: y el experimental ya que sus valores de  $C_{p\max}$  y  $ABC_0$  fueron estadísticamente diferentes, mientras que el producto comercial y el control fueron bioequivalentes. Con respecto al sexo masculino, sólo el  $C_{p\max}$  de Dianor fué estadísticamente diferente al de NET: COLEST: LACT y al de NET: LACT.

Con lo relacionado al tiempo de permanencia en suero de concentraciones mayores a 1 ng/ml, en ambos sexos fué estadísticamente mayor para la formulación con colesterol que para el producto comercial o el control.

En la tabla 13 se presentan las diferencias encontradas entre sexos, que fueron estadísticamente significativas: el  $C_{p\max}$  después de la administración de la formulación de NET: LACT, la vida media de distribución ( $t_{1/2\alpha}$ ), después de la administración de Dianor y el  $ABC_0$  cuando se dió NET: LACT fueron mayores en el sexo femenino. La velocidad de distribución ( $\alpha$ ) después de la administración de Dianor, fué mayor en el sexo masculino.

TABLA 12. PRUEBA DE RANGOS MULTIPLES DE NEWMAN-KEULS PARA COMPARAR  
 LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS ENTRE FORMULACIONES DE  
 UN MISMO SEXO\*.

Parámetro Farmacocinético	Sexo	Comparaciones	Nivel de Significancia
$ABC_{\infty}$	Femenino	Dianor = Net: LACT Dianor $\neq$ Net: COLEST Net:Lact $\neq$ Net: COLEST	- $\alpha = 0.01$ $\alpha = 0.01$
$C_{pm\acute{a}x}$	Femenino	Dianor = Net: LACT Dianor = Net: COLEST Net:Lact $\neq$ Net: COLEST	- $\alpha = 0.01$ $\alpha = 0.01$
$t \text{ [Net]} > 1 \text{ ng/ml}$	Femenino	Dianor = Net: LACT Dianor $\neq$ Net: COLEST Net:Lact $\neq$ Net: COLEST	- $\alpha = 0.01$ $\alpha = 0.05$
$C_{pm\acute{a}x}$	Masculino	Dianor $\neq$ Net: LACT Dianor $\neq$ Net: COLEST Net:Lact = Net: COLEST	$\alpha = 0.01$ $\alpha = 0.01$ -
$t \text{ [Net]} > 1 \text{ ng/ml}$	Masculino	Dianor = Net: LACT Dianor $\neq$ Net: COLEST Net:Lact $\neq$ Net: COLEST	- $\alpha = 0.01$ $\alpha = 0.01$

\* Unicamente se reportan los parámetros farmacocinéticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 13. PRUEBA DE t DE STUDENT PARA COMPARAR LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS ENTRE SEXOS DE UNA MISMA FORMULACION\*

Parametro Farmacocinético	Formulación	Nivel de Significancia
$\alpha$	Dianor	$P < 0.05$
$t_{\frac{1}{2}} \alpha$	Dianor	$P < 0.05$
$C_{p\text{máx}}$	Net = Lact	$P < 0.05$
$ABC^{\infty}$	Net = Lact	$P < 0.05$

\* Unicamente se reportan los parámetros farmacocinéticos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en el sexo femenino el comportamiento farmacocinético de la formulación control fué semejante al presentado por el producto comercial y diferente a la formulación de NET: COLEST: LACT. Se esperaba que esto mismo sucediera en el sexo masculino y sin embargo no fué así, por lo cual habría que ampliar este estudio para determinar si la presencia de la lactosa en la formulación está propiciando estas diferencias en el sexo masculino. Okerholm y Colab. (132) observaron en un estudio de biodisponibilidad de NET en voluntarios sanos que los niveles plasmáticos de NET fueron mayores en las mujeres que en los hombres, lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo, sin embargo esto ocurrió únicamente después de la formulación de NET: LACT.

El hecho de que en este trabajo se haya obtenido una liberación sostenida después de administrar la formulación de NET: COLEST: LACT y no así con la de NET: LACT, nos sugiere que es el colesterol presente en la formulación quien está propiciando esta diferencia.

El valor del ABC% que se obtuvo después de la administración de la formulación con colesterol fué un 86% para el sexo femenino, y en un 46% para el masculino, mayor con respecto al producto comercial. Esto nos sugiere que con la formulación experimental, la biodisponibilidad de NET fué mejorada, lo que pudiera deberse a que NET se absorbió por otra vía diferente a la gastrointestinal, como la linfática, o bien que fué evitado el efecto de primer paso. Nutall, I.D. y Colab. (112, 113) reportan que la biodisponibilidad de NET de una formulación preparada en base a NET y polietilenglicol, se vió incrementada con respecto a un producto de referencia, sugiriendo los mismos postulados que se mencionan en líneas anteriores.

Si bien se logró un sistema de liberación diferente con la formulación experimental (NET: COLEST: LACT), la liberación sostenida de NET solo se logró por unas cuantas horas, por lo que este preparado, también tendrá que administrarse diariamente para asegurar una alta eficiencia de anticoncepción. Por lo que la ventaja que presenta esta "nueva" formulación no sólo es la cinética de liberación, sino también que fué posible minimizar la sobredosis ( $C_{p\text{máx}} \text{ NET: COLEST: LACT} < C_{p\text{máx}} \text{ Dianor}^{(R)}$ ) y la biodisponibilidad de NET se vió incrementada. ( $\text{ABC\% NET: COLEST: LACT} > \text{ABC\% Dianor}^{(R)}$ ).

Esto nos concedería la oportunidad de ofrecer una alternativa del control de la fertilidad, con ventajas sobre las formulaciones orales actualmente disponibles.

## VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA.

## VI. CONCLUSIONES

Al efectuar la prueba de contenido químico, se encontró - que las tres formulaciones farmacéuticas empleadas en el estudio de bioequivalencia se encontraban dentro de los límites especificados por la U.S.P. XXI ( $100 \pm 10\%$ ); ya que el contenido de NET en cada una de ellas fué mayor al 95%, la variación de peso de - las cápsulas vacías y llenas así como de las tabletas no fué superior al 2% y el error obtenido con respecto al peso promedio - por cápsula de la mezcla de NET: LACT o NET: COLEST: LACT no fué mayor al 1%.

El método analítico utilizado para la cuantificación de - NET en suero fué lineal y reproducible en el rango de concentraciones de 0.078 a 5 ng/ml. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó una dilución del anticuerpo de 1:64,000; 5,000 cpm de 6,7 <sup>3</sup>H-NET como cuentas totales; un período de temperatura de incubación de 18 hrs a 4°C para la formación del complejo antígeno-anticuerpo y una extracción previa de las muestras con éter etílico.

Al utilizar estas condiciones, las variaciones de la unión máxima ( $B_0$ ), la unión no específica (UNE), la dosis al 50% (D50%), la pendiente ( $m$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ), no fueron mayores a  $\pm 2$  desviaciones estándar.

La inclusión de las muestras de control de calidad en el RIA permitieron determinar que el método analítico fué repetible y - confiable ya que al determinar la variación intra e interanálisis de las mismas, los coeficientes de variación fueron menores al - 9% asimismo las fluctuaciones no fueron mayores a  $\pm 2$  desviaciones estándar.

Al analizar los datos de la concentración sérica contra - tiempo se encontró que la Noretindrona se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos.

El perfil sérico de la formulación control no mostró diferencias con respecto al producto comercial, salvo con lo concerniente al  $C_{p\text{máx}}$  en el sexo masculino, el cual fué mayor para Dianor que para NET: LACT.

En ambos sexos la formulación de NET: COLEST presentó  $C_{p\text{máx}}$  menores a las observadas para el Dianor, cuyos valores estuvieron muy por encima del índice terapéutico (0.5 - 1 ng/ml).

En el sexo femenino se obtuvo un valor promedio mayor del ABC% después de la administración de la formulación con colesterol, que la obtenida con el Dianor.

Se encontraron niveles séricos de NET a concentraciones superiores a 1 ng/ml durante períodos más prolongados de tiempo, después de la administración de la formulación de NET: COLEST: LACT que cuando se dió el producto comercial, (Dianor<sup>(R)</sup>).

Estos resultados sugieren que la formulación con colesterol presenta un patrón de liberación sostenida.

Al efectuar los análisis estadísticos se encontró que el producto comercial Dianor y la formulación experimental NET: COLEST: LACT, son bioinequivalentes en una población femenina. No se observaron grandes diferencias entre sexos a excepción del  $C_{p\text{máx}}$  y ABC después de la administración de NET: LACT y en la constante de velocidad de distribución ( $\alpha$ ) y  $t_{1/2\alpha}$  después de que se administró el Dianor<sup>(R)</sup>.

## PERSPECTIVA

La formulación experimental (NET: COLEST: LACT) administrada por vía oral presentó un patrón de liberación sostenida. Esta propiedad permite proponer una nueva forma farmacéutica para los anticonceptivos orales del tipo combinado (estrógeno con progestina) de tal manera que se pueda reducir la dosis administrada - sin comprometer la efectividad, pero aumentando la seguridad para las usuarias que emplean este tipo de método para el control de la fertilidad.

VII. APENDICES

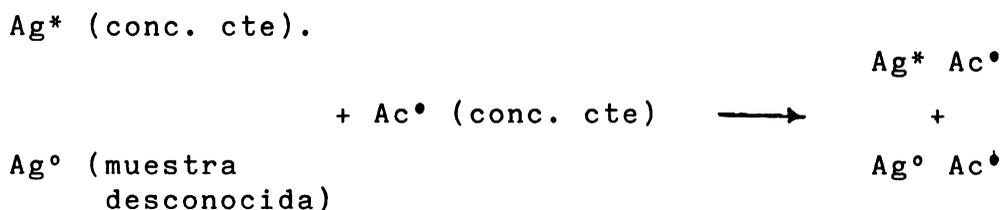
## APENDICE 1

DESCRIPCION DE LOS PARAMETROS EMPLEADOS EN EL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS  
PARA LA CUANTIFICACION DE NORETINDRONA EN SUERO.

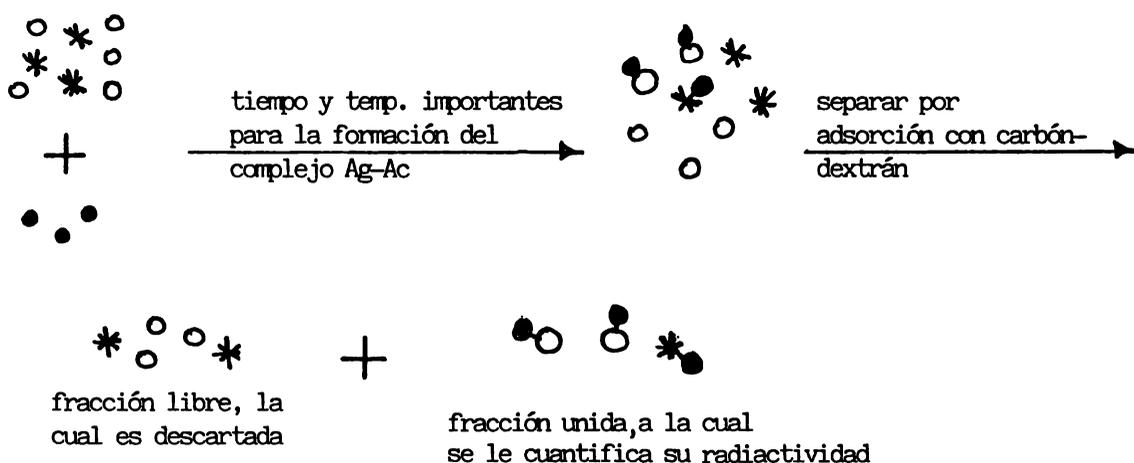
En el inciso 3.4.4 de la Parte Experimental se describe el fundamento del radioinmunoanálisis (RIA). Cuando una muestra biológica, la cual contiene una cantidad desconocida de hormona no radiactiva (antígeno frío, no radiactivo o no marcado) se incuba en presencia de una cantidad conocida de hormona radiactiva (antígeno radiactivo o marcado) y una cantidad constante del anticuerpo específico; compete con el antígeno marcado por un número limitado de sitios de unión del anticuerpo. Por lo que los requerimientos del RIA son:

- Anticuerpo específico (Ac°)
- \* Antígeno radiactivo o marcado (Ag\*)
- ° Antígeno no radiactivo o no marcado (Ag°)  
(estándares, muestras biológicas a ser cuantificadas).

La reacción básica del RIA es:



y su fundamento es:



Cuando la proporción del  $Ag^{\circ}$  es menor con respecto a la del  $Ag^*$ , entonces la cantidad de radiactividad detectada es mayor - (pues  $Ag^*$  desplaza a  $Ag^{\circ}$ ) y esto nos indica que nuestra muestra biológica contiene concentraciones pequeñas del  $Ag^{\circ}$ , y viceversa si la proporción del  $Ag^{\circ}$  es mayor, entonces se cuantifica menos radiactividad, pues éste desplaza al  $Ag^*$  y se presenta una formación mayor del complejo  $Ag^{\circ} - Ac^{\circ}$ .

Dentro del mismo ensayo donde se analizan las muestras biológicas desconocidas, se incluyen tres parámetros, los cuales nos sirven de referencia para determinar si el  $Ag^*$  y el  $Ac^{\circ}$  se encuentran en las proporciones adecuadas. Estos son:

Cuentas totales. (CT). Es la cantidad de radiactividad total que se tiene en el sistema, éstas son incluidas hasta el final del ensayo, es decir no se incuban ni en la presencia de  $Ag^{\circ}$  ni del  $Ac^{\circ}$ .

Porcentaje de unión no específica. (%UNE). El  $Ag^*$  se incubaba en buffer en ausencia de  $Ac^{\circ}$  y  $Ag^{\circ}$ . Teóricamente al no existir  $Ac^{\circ}$ , el  $Ag^*$  permanece como fracción libre y todo es absorbido por el dextrán y por lo tanto no se cuantificaría nada de radiactividad. La cantidad de radiactividad que permanece en el sobrenadante se le conoce como UNE y es la unión no específica del  $Ag^*$  (principalmente unión a las paredes de vidrio del tubo). Esta no debe ser mayor al 2%.

La radiactividad es cuantificada en un espectrofotómetro para emisiones beta, los resultados se obtienen en cpm (cuentas por minuto), éstas se deben convertir en porcentaje de unión y luego a LOGIT para poder realizar la interpretación de los datos.

Cálculos:

$$\%Bo = \frac{x \text{ cpm } Bo - x \text{ cpm } UNE}{x \text{ cpm } CT - x \text{ cpm } UNE} \times 100$$

$$\% UNE = \frac{x \text{ cpm } UNE}{x \text{ com } CT} \times 100$$

$$\% y \text{ (por ciento de unión de la muestra problema } Y) = \frac{x \text{ cpm } Y - x \text{ cpm } UNE}{x \text{ cpm } CT - x \text{ com } UNE} \times 100$$

$$LOGIT Y = \ln \frac{Y}{100-Y}$$

$$\text{donde } Y = \frac{100 (\% Y - \%UNE)}{\% Bo - \%UNE}$$

Una vez que se han convertido los valores a LOGIT, se grafica la curva patrón de LOGIT contra Log de la dosis, obteniendo una curva patrón como la que se muestra en la gráfica No. 3. De ésta se obtiene un parámetro más, al interpolar el valor de LOGIT = 0, se obtiene una concentración conocida como Dosis al 50% (D50 %), ésta es la cantidad de Ac\* necesaria para unir el 50% de la

radiactividad presente. Entre más pequeño sea este valor, más -  
sensible es el método.

Cuando se tiene la curva dosis-respuesta (LOGIT contra Log  
dosis) es posible interpolar los valores de LOGIT de las muestras  
problema y estimar la concentración de las mismas.

Cálculo del % de Recuperaciones.

En el método de extracción (inciso 2.5 c) de la sección de  
metodología), se incluye la adición de 1000 cpm del Ag\* con la fi-  
nalidad de conocer la cantidad de muestra que se tiene después de  
la extracción con éter. Cuando ésta es menor del 80% se debe me-  
jorar el método de extracción, cuando está entre el 80% y 89% los  
valores deben ser corregidos y cuando es mayor al 90% los valores  
pueden ser reportados como tal (sin corrección).

Cálculos para determinar el % de Recuperación y la corrección de  
los valores.

De acuerdo con la descripción del método de extracción se-  
gún el inciso 3.4.9 b) de la parte experimental:

0.6 ml	-	1000 cpm
0.1 ml	-	a

a = 166.66 cpm

0.6 ml = volumen en que se resuspende la muestra después de su ex-  
tracción y evaporación o sequedad.

1000 cpm = CT de las recuperaciones (valor calculado).

0.1 ml = alícuota para determinar el % Recuperaciones.

a = cpm que debe haber en la alicuota de 0.1 ml.

166.66 cpm - 100%

6 cpm - % Recup.

b cpm = cantidad de la radiactividad registrada de la muestra X.

% Recup. X = % de Recuperación de la muestra X.

x ng/ml - % Recuperación de x.

x<sup>1</sup> ng/ml - 100 % Recuperación.

x ng/ml = Concentración obtenida de la muestra x al interpolar la gráfica de LOGIT contra Log de la dosis.

x<sup>1</sup> ng/ml = Concentración corregida de la muestra x.

PROTOCOLO EMPLEADO PARA LA CUANTIFICACION DE NET EN SUERO, UTILIZANDO EL METODO DE RADIOINMUNOANALISIS.

a) Requerimientos

- $^3\text{H-NET} \approx 1000$  cpm (para determinar el % recuperación).
- $^3\text{H-NET} \approx 5000$  cpm (para el ensayo)
- Ac: dilución 1:64,000 (preparado el día del ensayo)
- NET: en concentraciones finales de 5-0.078 ng/ml (para la curva dosis-respuesta)
- Solución de carbón-dextrán (preparado el día del ensayo)
- Solución amortiguadora PBS + gelatina pH 7.2
- Eter
- Muestras séricas

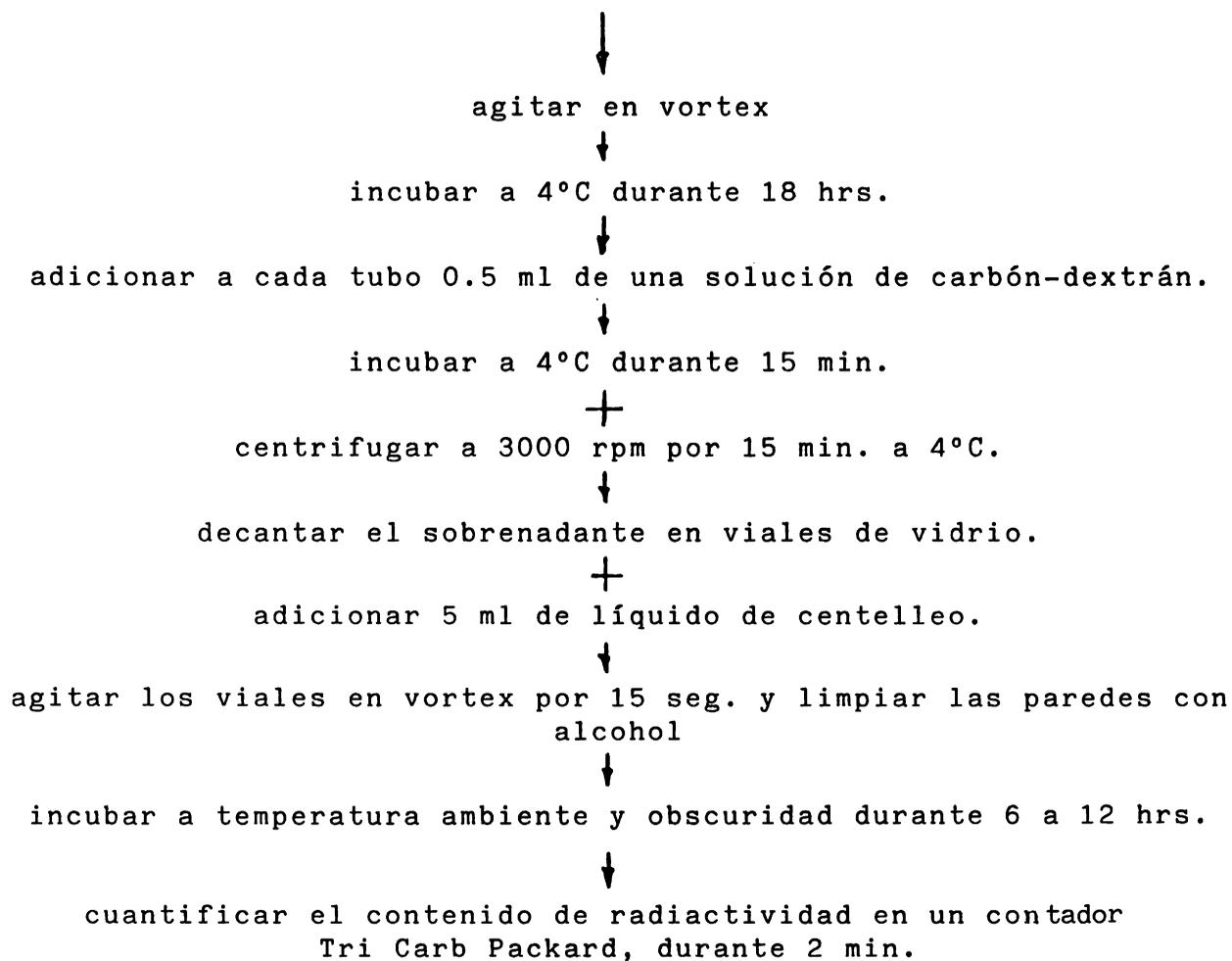
b) Extracción de las muestras

0.1 ml de muestra  
+  
0.3 ml de solución PBS + gelatina pH 7.2  
+  
0.1 ml  $^3\text{H-NET} \approx 1000$  cpm  
↓  
incubar a 40°C durante 30 min.  
↓  
agitar en vortex  
+  
5 ml de eter  
↓  
agitar en vortex durante 1 min.  
↓  
dejar separar las fases por 10 min.  
↓  
congelar en hielo seco/acetona y decantar en otro tubo  
↓  
evaporar a sequedad a 37°C en un baño de temperatura regulada

↓  
resuspender la muestra en 0.6 ml de solución PBS + gelatina pH 7.2  
↓  
incubar a 60°C durante 10 min.  
↓  
agitar en vortex por 1 min.  
↓  
tomar una alicuota de 0.2 ml para el ensayo y  
otra de 0.1 ml para determinar el % de recuperación.

c) Ensayo.

	ml estand. ó ml muestra	ml soln. amort. PBS + gel pH 7.2	ml Ac 1:64000	ml <sup>3</sup> H-NET ≈ 5000 cpm
CT	-	-	-	0.1
Bo	-	0.4	0.1	0.1
UNE	-	0.5	-	0.1
Estándar	0.2	0.2	0.1	0.1
Muestra	0.2	0.2	0.1	0.1



d) Determinación del % de Recuperaciones.

0.1 ml de muestra extraída con eter y resuspendida con solución  
PBS + gelatina pH 7.2



transferir esta alicuota a un vial de vidrio

+

5 ml de líquido de centelleo



agitar durante 15 seg. y limpiar las paredes del vial con alcohol



incubar a temperatura ambiente y oscuridad continua por 6 - 12 h.



cuantificar el contenido de radiactividad de un espectrofotómetro  
para emisiones beta..

APENDICE 2

FORMULAS EMPLEADAS PARA EL CALCULO DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS Y ANALISIS ESTADISTICO UTILIZADO.

1) Método para calcular Ko.

La constante de velocidad de liberación (Ko), fué calculada de acuerdo con Zerbe y Colab. (182) y Robinson y Colab. (189).

$$k_o = \frac{(C_{pt}) (\beta) (V_{ss})}{1 - e^{-\beta t}}$$

donde:

C<sub>pt</sub> = concentración en el tiempo en el que el fármaco ha terminado de liberarse constantemente.

$\beta$  = Constante de velocidad de eliminación

V<sub>ss</sub> = Volumen de distribución en el estado estacionario.

t = Tiempo en el cual el fármaco ya no presenta una liberación constante.

$$V_{ss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} V_1$$

donde:

k<sub>12</sub> = Constante de velocidad del compartimiento central al periférico.

k<sub>21</sub> = Constante de velocidad del compartimiento periférico al central.

V<sub>1</sub> = Volumen de distribución en el compartimiento central

$$k_{21} = \frac{A \beta k_a + B \alpha k_a + C \alpha \beta}{A (k_a - \alpha) + B (k_a - \beta)}$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{el}$$

$$k_{el} = \frac{\alpha \beta}{k_{21}}$$

$$V_1 = \frac{ka \quad FD}{A (ka - \alpha) + B (ka - \beta)}$$

donde:

A = Intercepto al eje Y cuando se aplica el método de los residuos para calcular  $\alpha$

B = Intercepto al eje Y cuando se aplica el método de mínimos cuadrados para calcular  $\beta$

C = Intercepto al eje Y cuando se aplica el método de los residuos para calcular ka

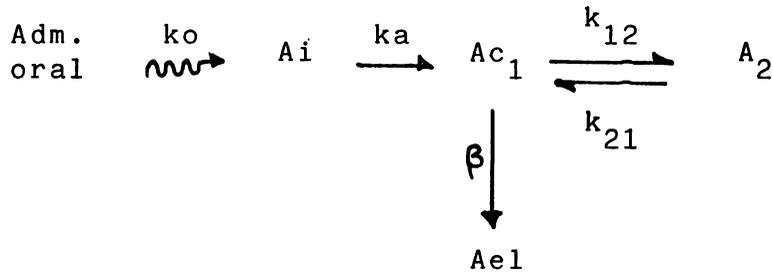
$\alpha$  = Constante de velocidad de distribución

$\beta$  = Constante de velocidad de eliminación

ka = Constante de velocidad de absorción

F = Fracción de la dosis D absorbida. Como en este trabajo no se tiene el valor de referencia de una administración intravenosa, se utilizó el valor reportado por los trabajos de Back y Colab. (89, 101, 105) quien reporta una biodisponibilidad de NET del 64%, después de la administración de 0.35 mg por vía oral.

Representación del modelo abierto de dos compartimientos, administración oral para un fármaco que presenta una liberación sostenida, según Robinson y Colab. (189).



$A_i$  = Sitio de absorción de la formulación oral

$A_{c1}$  = Fármaco en el compartimiento central ó 1

$A_2$  = Fármaco en el compartimiento periférico ó 2

$A_{el}$  = Fármaco eliminado.

$$C_p = \frac{K_o k_{21}}{\alpha} + \frac{k_a FD}{V_1} \left[ \frac{(k_{21} - \alpha)}{(k_a - \alpha)(\beta - \alpha)} \cdot e^{-\alpha t} + \frac{(k_{21} - \beta)}{(k_a - \beta)(\alpha - \beta)} \cdot e^{-\beta t} + \frac{(k_{21} - k_a)}{(\alpha - k_a)(\beta - k_a)} \cdot e^{-k_a t} \right]$$

## 2. Método utilizado para elegir el modelo farmacocinético.

La selección del modelo farmacocinético se llevó a cabo aplicando el criterio de información de Akaike (AIC):

$$AIC = N \ln SC + 2P$$

donde:

N = Número de datos.

T = Número de parámetros.

SC = Suma de cuadrados.

$$SC = \sum (C_{obs} - C_{est})^2$$

donde:

C<sub>obs</sub> = Concentración en suero observada.

C<sub>est</sub> = Concentración en suero estimada.

El modelo que presentaba el menor valor de AIC era el seleccionado.

### 3. Métodos empleados para las pruebas estadísticas

- a) Para determinar los límites de confianza al 95% se empleó la siguiente fórmula:

$$Y \pm t_{0.05, n-1} (s/\sqrt{n})$$

donde:

Y = Media muestral

$t_{0.05, n-1}$  = valor de t de tablas a una probabilidad  $P = 0.05$   
y grados de libertad  $gl = n - 1$

n = Número de datos

s = Desviación estándar

- b) Para contrastar los parámetros farmacocinéticos entre sexos de una misma formulación se utilizó la prueba de t de Student:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

donde:

$\bar{x}$  = Media muestral

s = Desviación estándar

n = Número de datos

$gl = n_1 + n_2 - 2$

- c) Para contrastar los parámetros farmacocinéticos entre formulaciones del mismo sexo, se realizó el análisis de varianza correspondiente a un diseño de bloqueo al azar (187) y la prueba de rangos múltiples de Newman-Keuls, también conocida como prueba de Student - Newman-Keuls (SNK) (188).

Prueba de SNK

$$S.E. = \sqrt{\frac{CM \text{ error}}{n}}$$

$$q = \frac{\bar{x}_B - \bar{x}_A}{S.E.}$$

n = Número de datos en cada grupo.

CM = Media de los cuadrados

Si el valor de q calculado es igual o mayor que el valor crítico de  $q_{\alpha, \gamma, p}$  entonces se rechaza la hipótesis nula  $H_0: \mu_A = \mu_B$

### APENDICE 3

TABLAS DE DATOS Y GRAFICAS INDIVIDUALES DE CONCENTRACION SERICA A LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA DOSIS ORAL UNICA (0.35mg) DE TRES FORMAS FARMACEUTICAS DE NOR-RETINDRONA: PRODUCTO COMERCIAL (DIANOR<sup>®</sup>), FORMULACION CONTROL - (NET: LACT) Y FORMULACION EXPERIMENTAL (NET: COLEST: LACT) A 10 - VOLUNTARIOS CLINICAMENTE SANOS (5 DEL SEXO FEMENINO Y 5 DEL MASCULLINO.

TABLA 15 VOLUNTARIO 1- LYE

TIEMPO (hrs)	SEXO: FEMENINO						VOLUNT: 1-LYE		
	DIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET:COLEST:LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	COBS	CEST	% DESV	COBS	CEST	% DESV	COBS	CEST	% DESV
0.5	1.31	1.2688	-3.15	0.95	0.40	.57	0.88	0.88	0
1	3.8	3.8445	1.17	1.216	1.973	62.3	1.27	1.27	0
1.5	4.7	4.6	-2.12	3.81	3.5	-8.13	2.008	2.008	0
2	5.85	4.70	-16.81	2.88	3.3	14.58	2.33	2.33	0
4	2.78	3.0245	8.88	1.99	1.979	-0.55	2.81	2.65	-5.6
8	1.72	1.45	-16.7	1.27	1.260	-0.73	2.72	2.60	-4.41
12		1.05	3.96	0.81	0.964	19.05	1.175	1.175	0
24	0.95	0.91	-2.15	0.55	0.530	-3.6	1.027	1.05	2.23
36		0.647	-1.96	0.865	0.42	48	0.90	0.5059	-1.1
48							0.80	0.63	-21
60							0.75	0.44	-41
72							0.95	0.32	-66

C. OBS = concentración observada

C. EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

% DESV = diferencia porcentual de C. obs menos C. est.

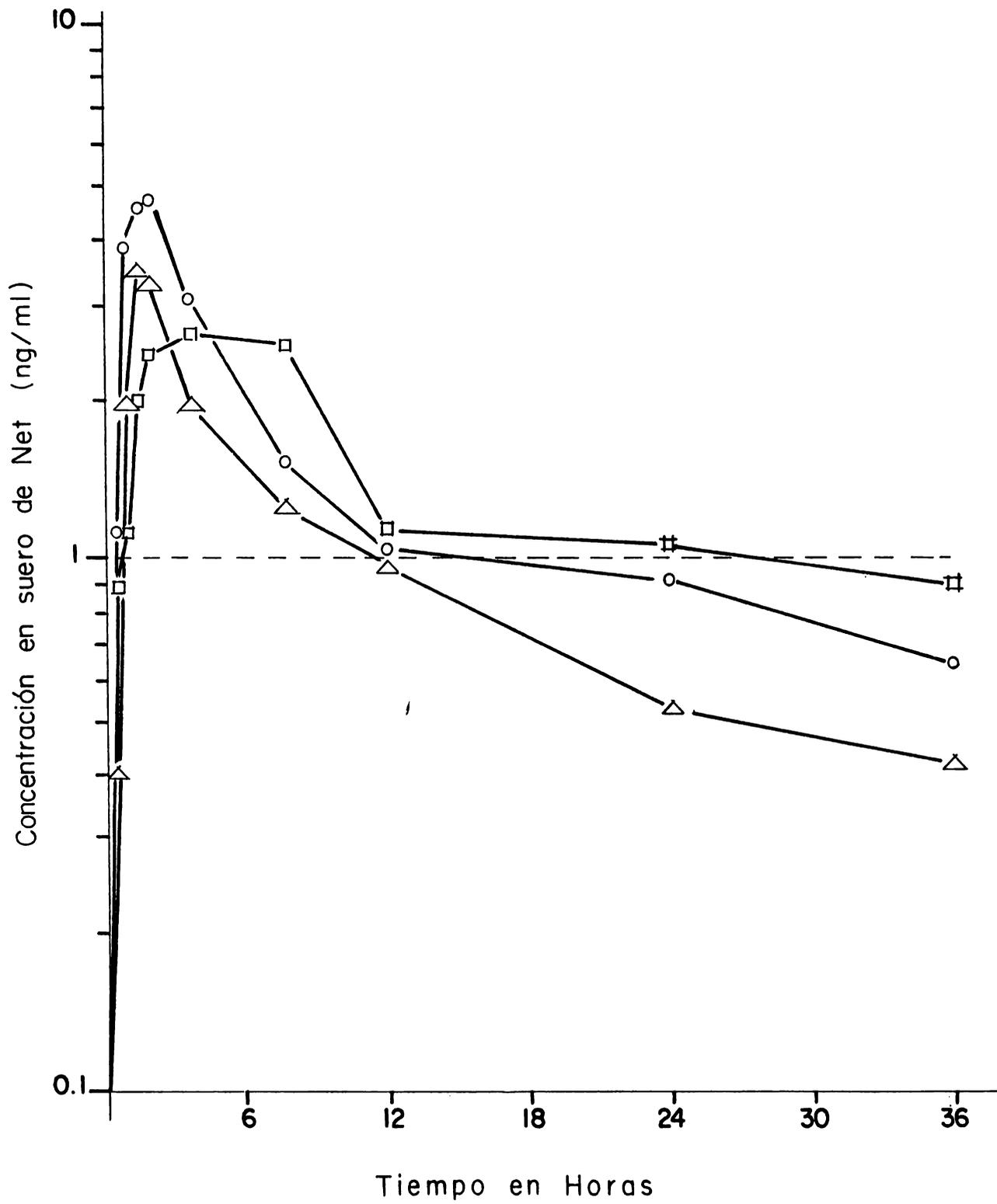


Figura 14. Voluntario I-LYE ; Sexo femenino

Dianor<sup>®</sup>                   ○  
 Net: Lact                   △  
 Net: colest: Lact       □

TABLA 16 VOLUNTARIO 2- Me

TIEMPO (hrs)	SEXO: FEMENINO			VOLUNT: 2-MC			NET: COLEST: LACT		
	BIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			CONC. PLASMATICA		
	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV
0.5	0.98	0.975	-0.01	0.83	0.85	2.4	0.48	0.48	0
1	1.49	1.75	17.4	4.8	2.0	-56	0.99	0.99	0
1.5	2.48	2.50	-6.71	2.24	3.0	33.9	1.25	1.25	0
2	1.61	2.30	42.8	2.01	2.8	39.3	1.33	1.33	0
4	1.305	1.31	0.38	1.31	1.30	-0.76	1.28	1.28	0
8	0.847	0.85	0.35	0.73	0.71	-2.74	1.005	1.05	0
12	0.605	0.59	-2.47	0.68	0.64	-5.8	0.46	0.6835	48.6
24	0.457	0.46	5.26	0.41	0.47	14.6	0.48	0.5144	7.17
36	0.365	0.35	-4.10	0.385	0.35	-9.09	0.51	0.38	-25
48							0.38	0.295	-22
60							0.407	0.23	-43
72							0.310	0.18	-41.9

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

% DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

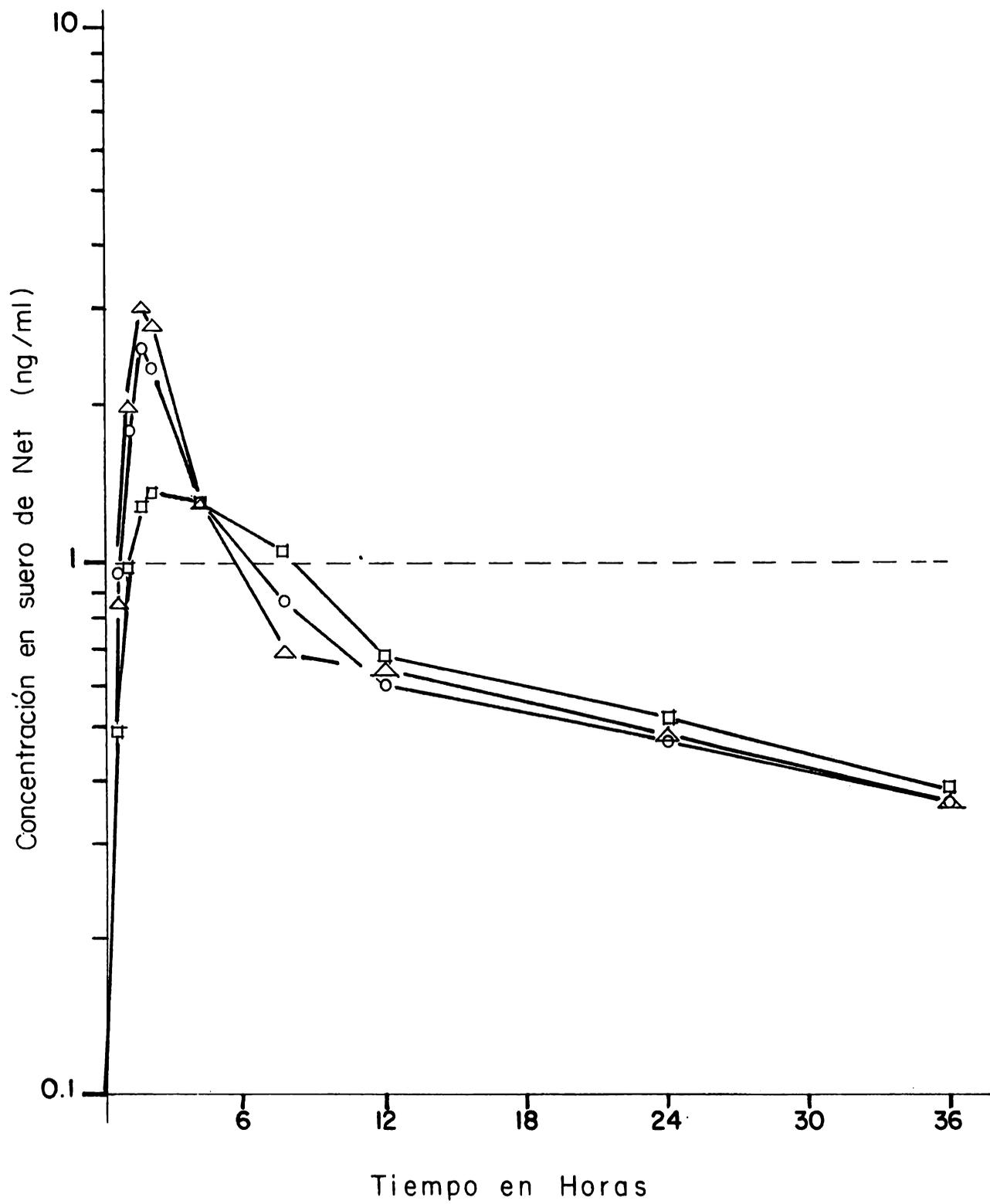


Figura 15 Voluntario 2-MC ; Sexo femenino

Dianor<sup>®</sup> ○  
 Net: Lact △  
 Net: colest: Lact □

TABLA 17 VOLUNTARIO 3- MAL

TIEMPO (hrs)	SEXO: FEMENINO						VOLUNT: 3-MAL		
	DIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NESTADOLESTALACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	OBS	CEST	% DESV	OBS	CEST	% DESV	OBS	CEST	% DESV
0.5	1.48	1.5680	5.24	3.08	2.05	33	0.76	0.76	0
1.0	2.24	2.5425	13.52	2.5	2.95	18	1.11	1.11	0
1.5	3.20	2.9016	-9.33	2.7	2.65	15	1.17	1.17	0
2	2.85	2.8458	-4.09	2.24	2.24	0	1.59	1.28	-19
4	2.78	2.9416	-1.71	1.35	1.35	0	1.28	1.2799	0.01
8	1.015	1.01473	-0.03	0.63	0.60	-4.76	0.67	1.00	49
12	0.2	-	-	0.48	0.45	-6.2	0.53	0.5684	7.25
24	0.51	-	-	0.345	0.36	4.34	0.57	0.35	-36
36	-	-	-	0.286	0.28	-2	0.50	0.28	-44
48	-	-	-	-	-	-	0.54	0.5967	-6.16
60	-	-	-	-	-	-	0.41	0.4530	7.18
72	-	-	-	-	-	-	0.45	0.4797	-2.1

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de CEST menos C OBS

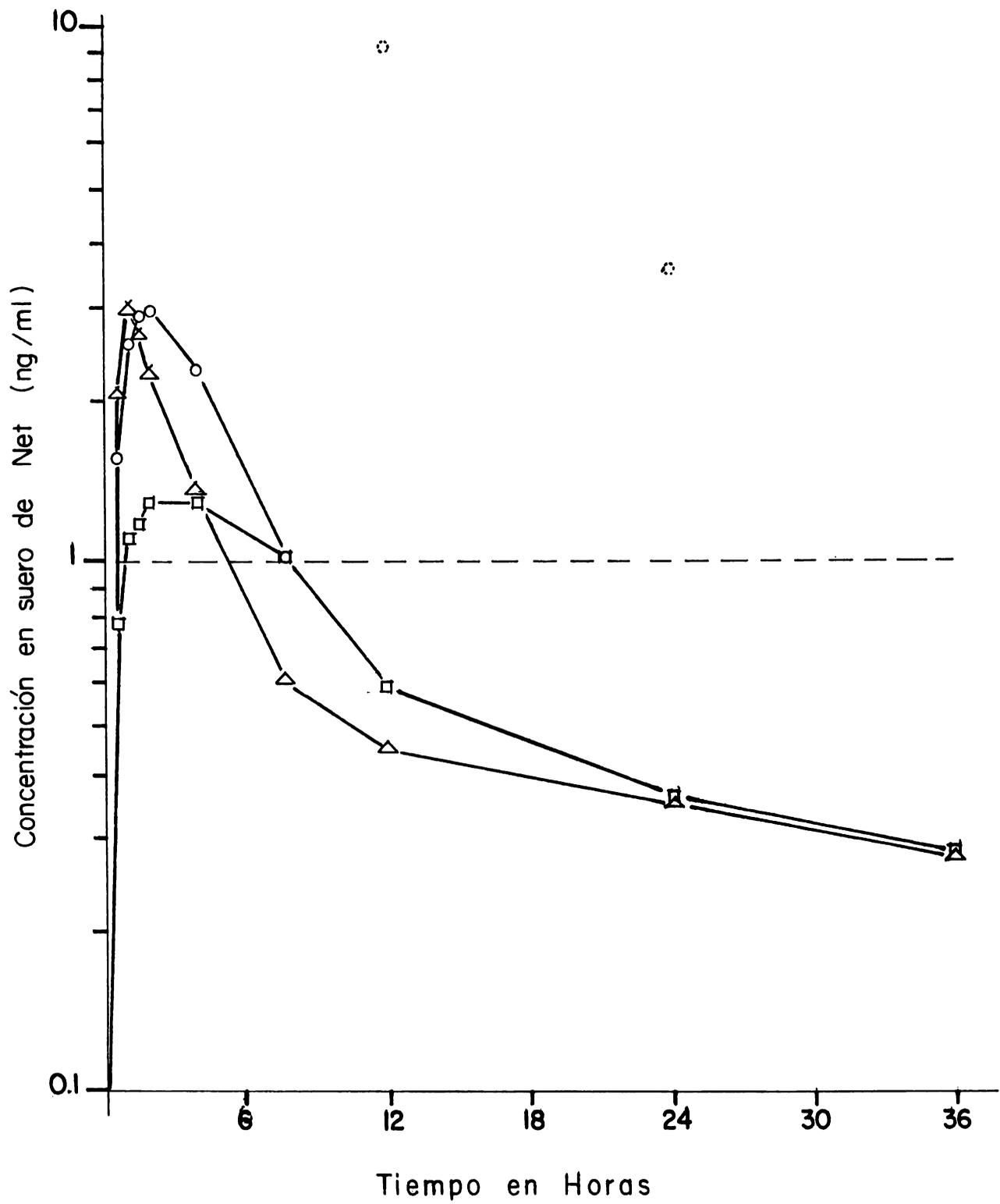


Figura 16 Voluntario 3-MaL ; Sexo femenino

Dianor<sup>®</sup> ○  
 Net:Lact △  
 Net:colest:Lact □

TABLA 18 VOLUNTARIA 4 - CARM

TIEMPO (Hrs)	SEXO: FEMENINO						VOLUNT: 4-CARM		
	DIANDR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: COLEST: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	COBS	CEST	% DESV	COBS	CEST	% DESV	COBS	CEST	% DESV
0.5	2.43	2.43	0	1.17	1.16	-0.85	1.47	1.47	0
1	4.59	4.10	-10.67	1.82	1.62	0	1.725	1.720	0
1.5	1.63	3.75	130	1.59	2.75	72	1.546	1.546	0
2	2.80	3.3	17.9	3.20	3	-6.2	1.92	1.725	-10.15
4	2.67	1.953	-5.79	1.65	1.91	15	1.23	1.23	0
8	0.97	0.973	0	1.15	1.28	11	1.76	1.71	-2.84
12	0.595	0.674	14	0.83	0.83	0	1.71	1.7099	-0.01
24	0.52	0.431	-17	0.55	0.56	1.8	0.81	0.81	0
36	0.48	0.37	-22	0.48	0.369	-7.7	0.74	0.62	-16
48							0.67	0.457	-31
60							0.64	0.34	-46
72							0.50	0.60	0.255

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de CEST menos COBS

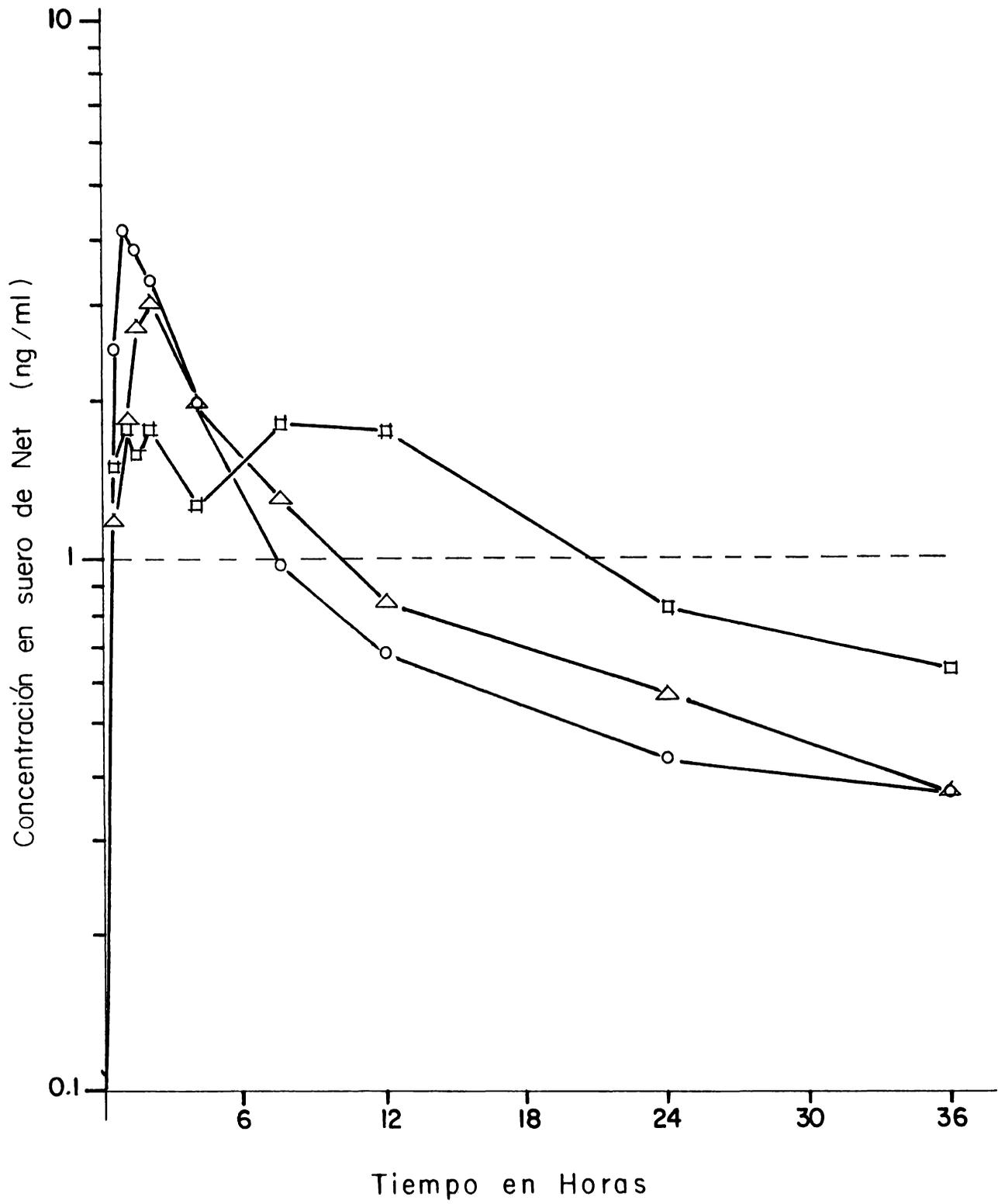


Figura 17 Voluntario 4-CARM; Sexo femenino

Dianor<sup>®</sup> ○  
 Net: Lact △  
 Net: colest: Lact □

TABLA 19 VOLUNTARIO 5 - LTF

TIEMPO (hrs)	SEXO: FEMENINO						VOLUNT: 5-LTF		
	DIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET:COLEST:LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV
0.5	0.79	0.78	-1.2	1.14	0.83	-27	0.80	0.80	0
	3.13	3.0	-4.1	1.28	1.37	16	0.66	1.10	66
1.5	2.3	2.65	15.2	1.46	1.62	10	1.322	1.322	0
2	1.92	2.05	6.7	1.62	1.80	-1.09	1.35	1.325	-2.94
4	1.17	0.85	-27	1.23	1.18	-4.06	1.02	1.05	2.94
8	0.41	0.40	-2	0.66	0.75	13	1.0764	1.0764	0
12	0.327	0.365	13	0.55	0.59	7.27	0.8029	1.00	24.5
24	0.34	0.29	-17	0.435	0.42	-2.3	0.7300	0.7676	5.43
36	0.27	0.218	-5	0.52	0.32	-38	0.94	0.55	-41
48							0.7300	0.42	-42.1
60							0.6000	0.32	-46
72							0.5300	0.25	-52

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

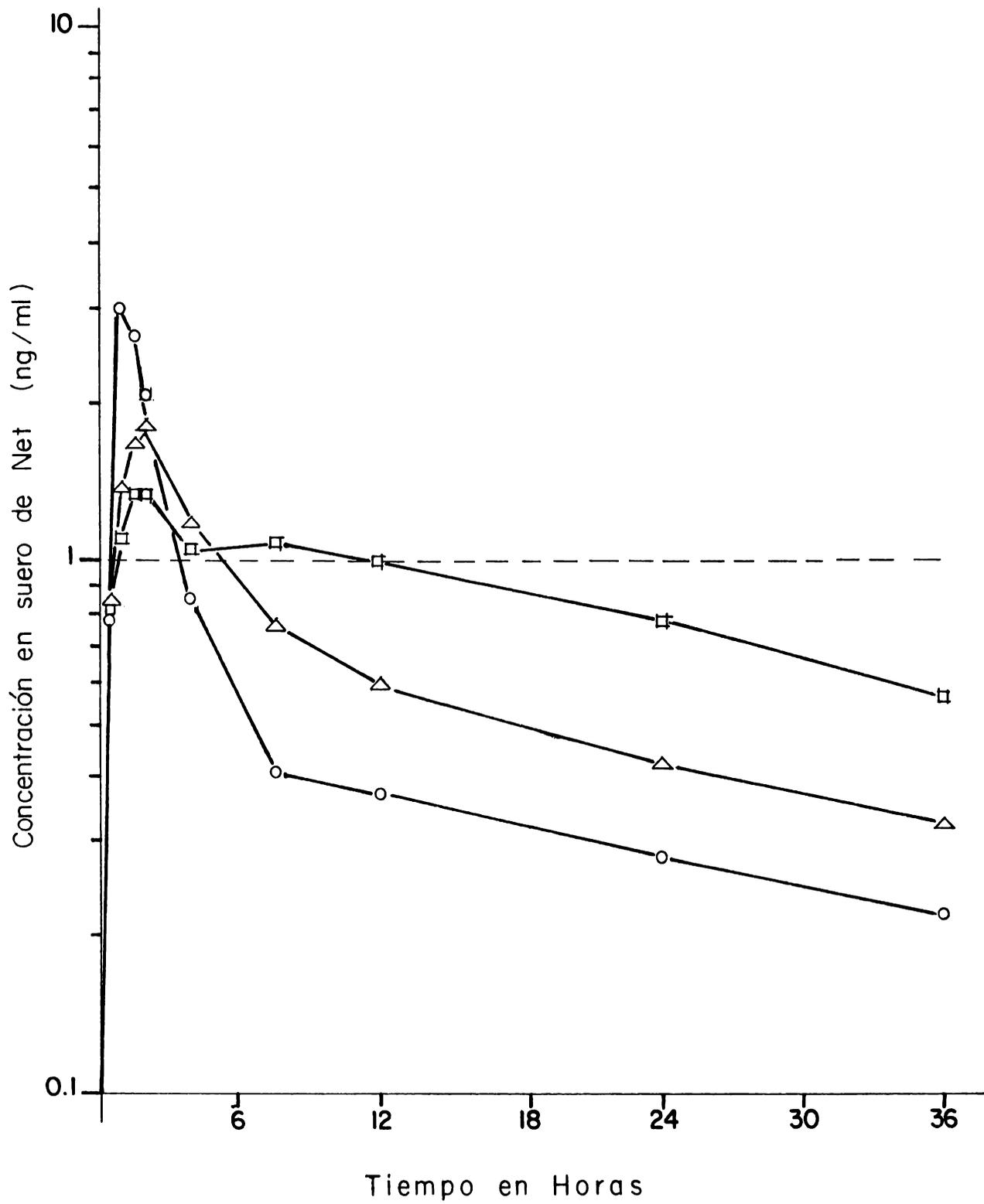


Figura 18 Voluntario 5-LTF ; Sexo femenino

Dianor® ○  
 Net: Lact △  
 Net: colest: Lact □

TABLA 20 VOLUNTARIO 6 - FDB

TIEMPO (hrs)	SEXO: MASCULINO						VOLUNT: 6-FDB		
	DIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: COLEST: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV
0.5	0.709	0.94	32	0.49	0.37	-24	0.6909	0.6909	0
	1.249	3.4959	179.9	1.53	1.1	-28	1.5404	1.5404	0
1.5	5.971	4.20	-29.6	1.36	1.50	10	1.5420	1.5420	0
2	3.597	3.80	5.6	1.197	1.40	17	1.454	1.454	0
4	1.11	1.107	-0.27	0.87	0.85	-2.3	1.528	1.528	0
8	0.570	0.40	-26	0.5124	0.335	-34	0.9606	1.30	29.3
16	0.275	0.378	37	0.27	0.28	3.70	0.6342	1.05	65.6
24	0.267	0.279	4.453	0.218	0.21	-3.6	0.4340	0.4791	10.17
	0.17	0.204	20	0.147	0.151	2.72	0.4612	0.3799	-17.63
48							0.2740	0.3018	00
60							0.916	-	-
72							0.699	-	-

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

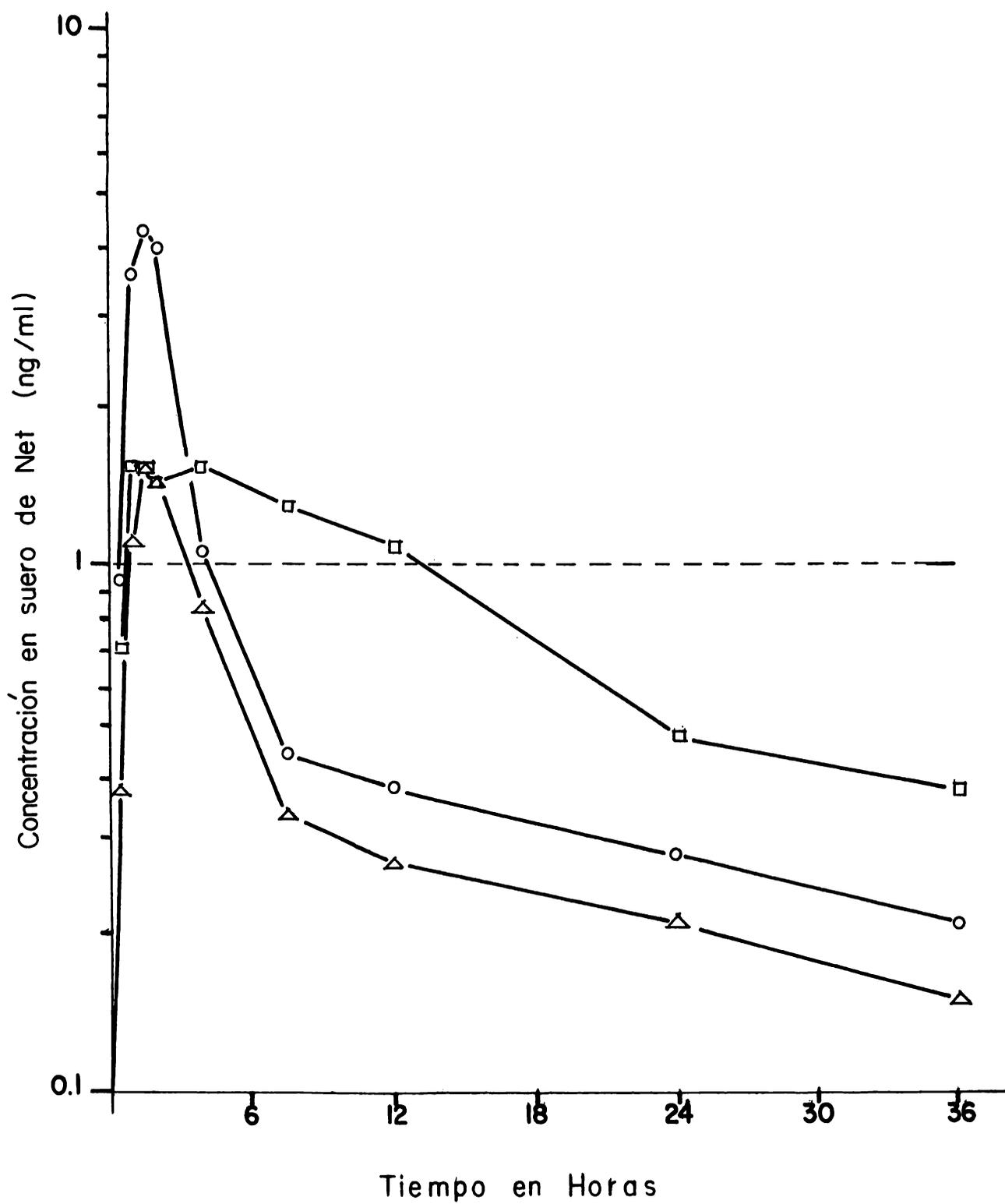


Figura 19 Voluntario 6-FDB : Sexo masculino

Dianor® ○  
 Net : Lact △  
 Net : colest : Lact □

TABLA 21 VOLUNTARIO 7 - HOM

TIEMPO (hrs)	SEXO: MASCULINO						VOLUNT: 7-HOM		
	DIAMOR CONC. PLASMÁTICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMÁTICA (ng/ml)			NET: COLEST: LACT CONC. PLASMÁTICA (ng/ml) <sup>a</sup>		
	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV
0.5	3.43	2.0	-4.1	0.44	0.4399	-0.01	0.44	0.44	0
1	3.83	3.85	0.52	1.51	1.5099	-0.01	0.5911	0.5911	0
1.5	3.063	3.5	14	1.3027	1.2478	-4.16	0.78	0.78	0
2	2.31	2.78	20	0.95	0.9722	2.34	0.832	0.832	0
4	1.136	1.05	-7	0.51	0.50	-1.9	0.959	0.959	0
8	0.649	0.61	-8.8	0.41	0.395	-3.65	0.8672	1.00	15.3
12	0.46	0.47	2.1	0.34	0.363	6.76	0.6615	0.80	20.9
24	0.356	0.37	-10	0.28	0.28	0	0.3850	0.51	34
36	0.202	0.213	5.44	0.24	0.218	-9.1	0.37	0.45	21
48							0.3270	0.36	9
60							0.400	0.29	-27
72							0.2800	0.235	-17

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

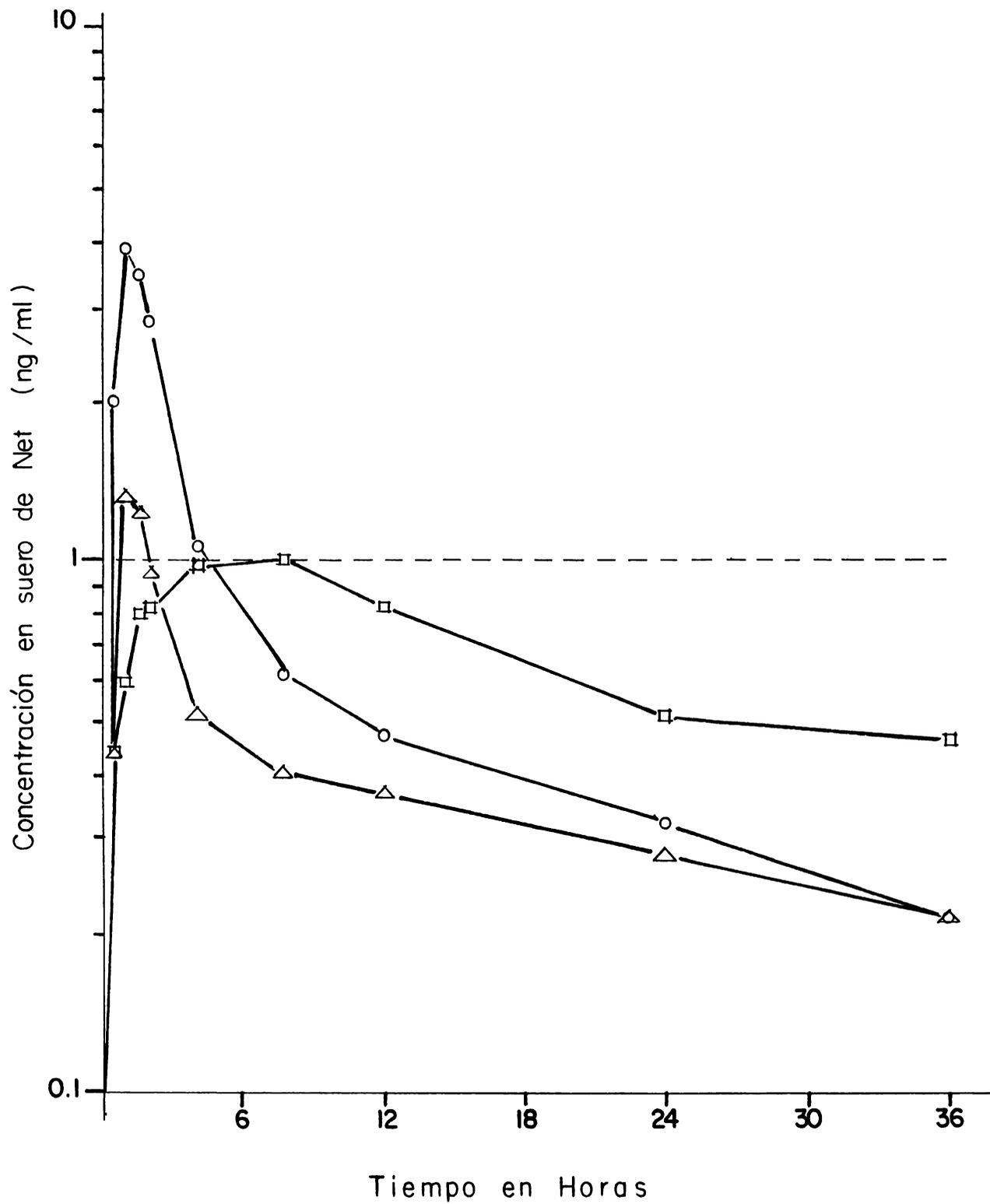


Figura 20 Voluntario 7-HDM ; Sexo masculino

Dianor® ○  
 Net:Lact △  
 Net:colest:Lact □

TABLA 22 VOLUNTARIO 8 - GER

TIEMPO (hrs)	SEXO: MASCULNO						VOLUNT: 8-GER		
	DIANOR CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)			NET: COLEST: LACT CONC. PLASMATICA (ng/ml)*		
	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV	CORS	CEST	% DESV
0.5	1.776	1.7759	-0.01	1.62	1.05	-37	2.053	1.95	-6.38
1	3.237	5.0750	-3.76	2.2	2.15	-2.3	2.22	2.02	-9
1.5	3.648	4.10	12.4	2.442	2.35	-3.68	1.84	1.90	3.26
2	2.7	3.02	11	2.094	2.1	0.28	2.04	2.0	-1.96
4	1.588	1.55	-2.39	1.219	0.98	-19	1.139	1.40	22.9
8	0.73	1.02	-1.26	0.701	0.73	-27	1.455	1.455	0
	0.875	0.82	5.14	0.462	0.54	17.4	1.375	1.375	0
24	0.75	0.683	-2.14	0.40	0.41	2.5	0.758	0.86	13.45
36	0.50	0.505	1	0.31	0.30	-3.2	0.700	0.57	-18.5
48							0.649	0.43	-33.8
72									

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

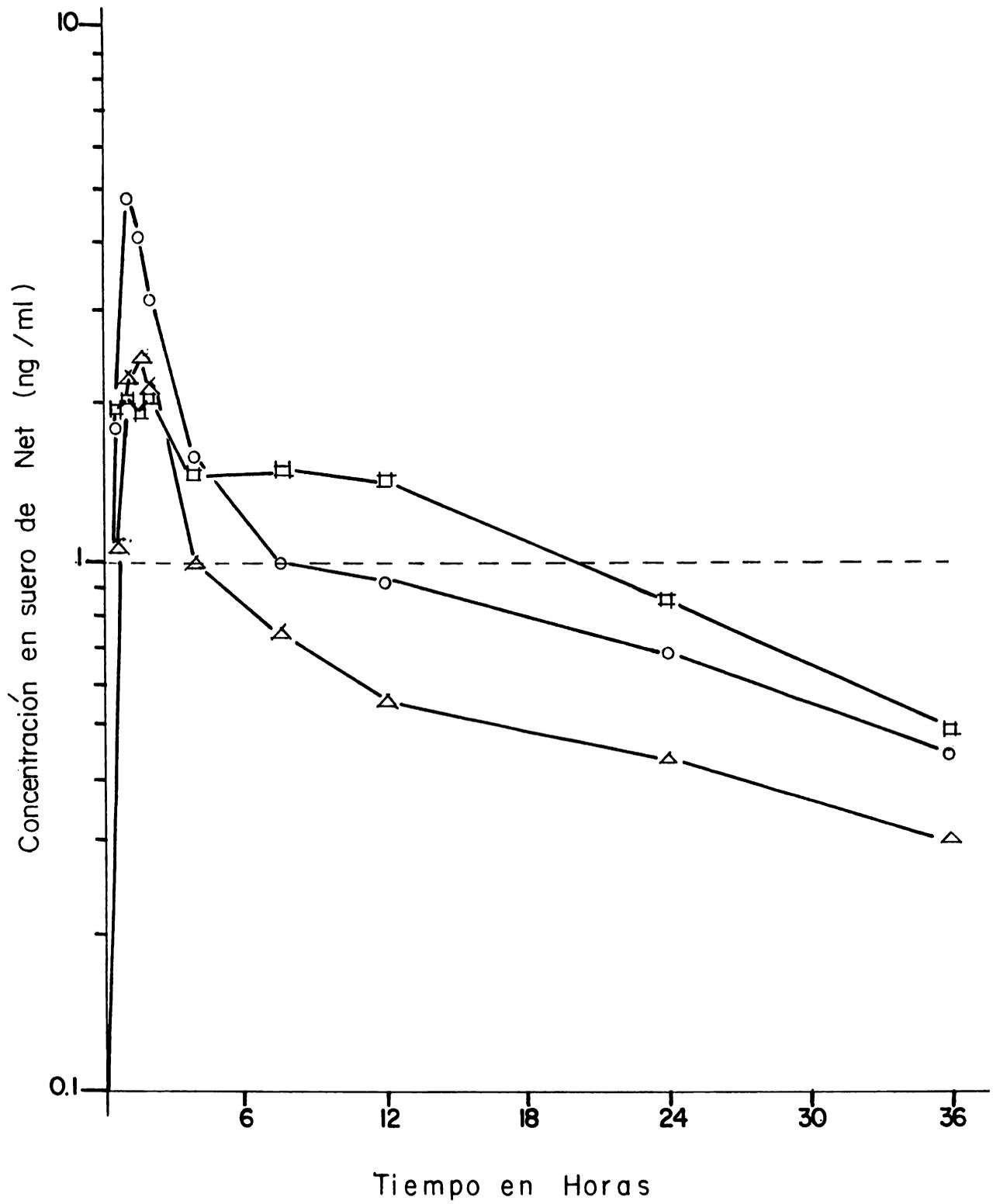


Figura 21 Voluntario 8-GER ; Sexo masculino

Dianor ○  
 Net : Lact △  
 Net : colest : Lact □

TABLA 23 VOLUNTARIO 9 - RIC

TIEMPO (hrs)	BIANCOR			NET: LACT			NEST: COLEST: LACT		
	CONC. PLASMATICA			CONC. PLASMATICA			CONC. PLASMATICA		
	C OBS	C EST	% DESV	C OBS	C EST	% DESV	C OBS	C EST	% DESV
0.5	0.5014	0.60	20	0.7912	0.60	-24	0.555	0.595	0
1	1.5064	1.849	22.77	1.0313	1.18	14.4	1.06	1.06	0
1.5	2.387	2.65	11	1.3086	1.30	-0.61	0.7161	0.90	25.6
2	3.1209	3.05	-2.26	1.0408	1.1	5.68	1.70	1.25	-25.4
4	1.177	1.3703	16.42	0.579	0.635	9.67	0.717	1.05	46.4*
8	0.611	0.67	5.6	0.259	0.57	90.6	0.400	0.70	75
12	0.446	0.486	4.29	0.509	0.515	1.18	0.299	0.40	34
24	1.3410	0.365	7.038	0.395	0.371	-3.63	0.550	0.305	-44
36	0.395	0.2742	-10.09	0.27	0.273	1.11	0.565	0.23	-58
48							0.282	0.18	-36
60							0.288	0.14	-51
72							-	-	-

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV = diferencia porcentual de C EST menos C OBS

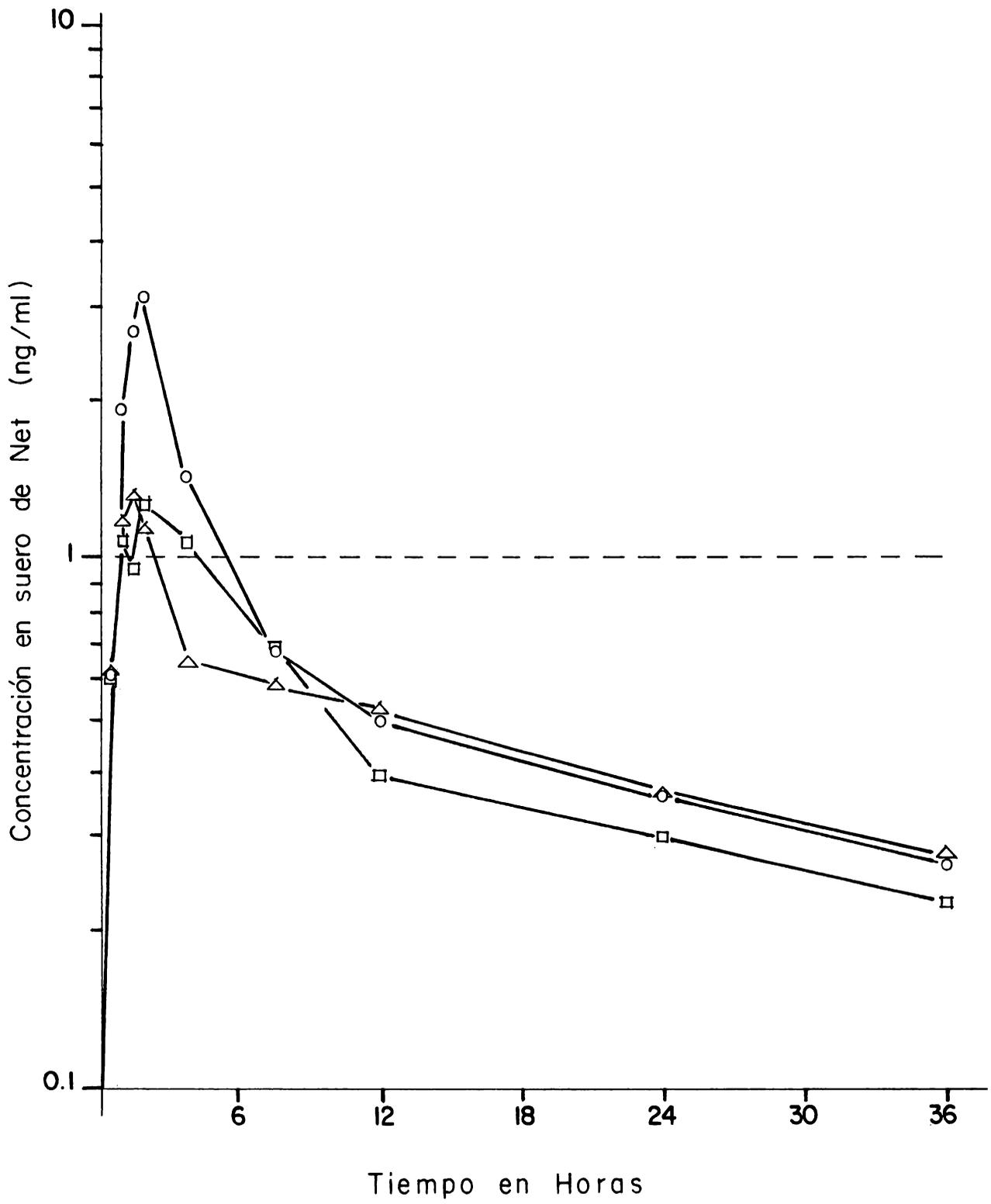


Figura 22 Voluntario 9-RIC ; Sexo masculino

Dianor® ○  
 Net: Lact △  
 Net: colest: Lact □

TABLA 24 VOLUNTARIO 10 - SAM

TIEMPO (hrs)	SEXO: MASCULINO						VOLUNT: 10-SAM		
	BIANOR CONC. PLASMÁTICA (ng/ml)			NET: LACT CONC. PLASMÁTICA (ng/ml)			NET: COLEST: LACT CONC. PLASMÁTICA (ng/ml) <sup>a</sup>		
	COBS	C EST	% DESV	COBS	C EST	% DESV	COBS	C EST	% DESV
0.5	2.8108	3.0	6.7	1.655	1.6402	-0.89	1.445	1.445	0
1	3.98	3.5	-12.06	2.248	2.2479	-0.01	3.303	2.40	-27.3
1.5	3.498	3.20	-8.51	2.748	2.7	-1.74	3.50	2.50	-28
2	2.12	1.9705	-7.06	2.32	2.5	7.75	3.444	2.40	-30
4	1.671	1.15	-31.1	1.733	1.7110	-1.27	1.663	1.663	0
8	0.997	0.7541	-13.96	1.08	0.9353	-13.4	1.355	1.355	0
12	0.477	0.6868	43.92	0.613	0.651	6.19	1.346	1.346	0
24	0.5134	0.5191	65.65	0.54	0.478	-11.48	0.647	0.80	3.6 <sup>b</sup>
36	0.2418	0.3924	62.3	0.33	0.35	6.06	0.530	0.53	0
48							0.678	0.44	.35
60							0.560	0.35	-37
72							0.506	0.285	-72

C OBS = concentración observada

C EST = concentración estimada al aplicar el método de los residuos

%DESV + diferencia porcentual de C EST menos COBS

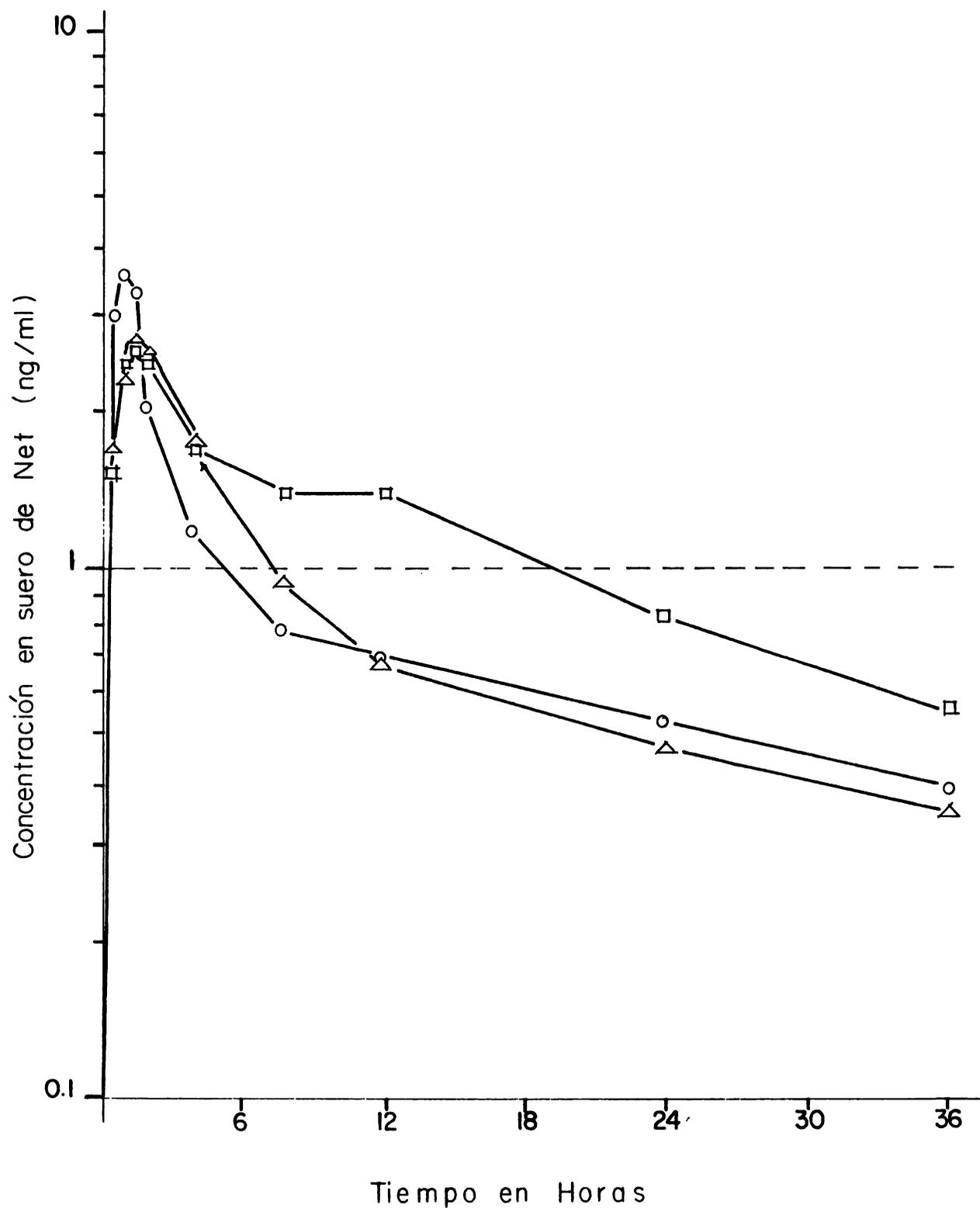


Figura 23 Voluntario 10-SAM: Sexo masculino

Dianor<sup>®</sup> ○  
 Net: Lact △  
 Net: colest: Lact □

APENDICE 4

PARAMETROS FARMACOCINETICOS INDIVIDUALES CALCULADOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION ORAL DE UNA DOSIS UNICA DE 35mg DE DIANOR , NET: LACT Y NET: COLEST: LACT A 5 VOLUNTARIOS DEL SEXO FEMENINO Y 5 DEL SEXO MASCULINO.

CONSTANTE FARMACOCINETICA	DIANOR <sup>®</sup>		NET:LACT		NET:COLEST:LACT	
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
$k_a$ hrs <sup>-1</sup>	1.239 1.886 1.247 1.680 2.036	2.25 1.483 1.904 2.47 1.589	1.677 1.73 2.264 1.034 1.03	2.40 2.96 1.93 1.515 1.563		
$k_e$ ng/hr					0.0204 0.040 0.105 0.0213 0.0313	0.0624 0.065 0.028 0.2713 0.0329
$\alpha$ hrs <sup>-1</sup>	0.4426 0.24 -- 0.34 0.406	0.535 0.472 0.6928 0.4363 0.476	0.399 0.560 0.398 0.366 0.344	0.244 0.740 0.442 0.690 0.247	0.5384 0.326 0.4589 0.538 0.485	0.6468 0.24 0.365 0.429 0.254
$\beta$ hrs <sup>-1</sup>	0.0643 0.0483 (0.4672) 0.0621 0.0494	0.0595 0.0782 0.0566 0.0547 0.0536	0.0476 0.0573 0.0494 0.0759 0.0522	0.0582 0.0489 0.0595 0.0607 0.0593	0.0644 0.0483 0.0495 0.0621 0.0613	0.0575 0.0483 0.0552 0.0539 0.0529

CONSTANTE FARMACOCINETICA	DIANOR <sup>®</sup>		NET:LACT		NET:COLEST:LACT	
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
$t_{1/2 ka}$ hrs	0.5591	0.308	0.4132	0.2887		
	0.368	0.467	0.400	0.233		
	0.505	0.364	0.3060	0.359		
	0.412	0.435	0.6728	0.4432		
	0.344	0.2805	0.670	0.457		
$t_{1/2 \alpha}$ hrs	1.647	1.295	1.737	2.840	1.2871	1.0714
	2.887	1.468	1.237	0.936	2.185	2.887
	--	1.000	1.741	1.567	1.516	1.898
	2.038	1.588	1.893	1.003	1.288	1.615
	1.707	1.456	2.014	2.803	1.427	2.720
$t_{1/2 \beta}$ hrs	10.777	11.647	14.058	11.907	10.760	12.052
	13.347	8.861	12.094	14.171	14.347	14.347
	(1.489)	12.244	14.029	12.096	14.00	12.554
	11.159	12.669	9.130	11.416	11.139	13.100
	14.028	12.729	13.393	11.686	11.306	13.326
$AUC_0$ ng ml <sup>-1</sup> hr	33.19	30.086	43.56	23.32	83.39	34.62
	41.82	30.28	40.08	22.00	43.54	45.00
	20.94	57.17	41.71	34.35	74.47	62.28
	45.501	34.58	44.145	31.51	70.57	27.00
	30.00	34.13	32.20	41.50	60.00	66.25

CONSTANTE FARMACOCINETICA	DIANOR <sup>®</sup>		NET:LACT		NET:COLEST:LACT	
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
C <sub>p</sub> máx ng/ml	4.70	4.20	3.50	1.50	2.81	1.52
	2.50	3.85	3.0	1.50	1.33	1.00
	2.94	5.07	2.95	2.35	1.28	2.02
	4.10	3.05	3.00	1.30	1.72	1.25
	3.00	3.50	1.80	2.70	1.32	2.5
t <sub>max</sub> hrs	2.0	1.5	1.5	1.5	4.0	1.5
	2.0	1.0	1.5	1.0	2.0	8.0
	2.0	1.0	1.0	1.5	2.0	1.0
	1.0	2.0	2.0	1.5	2.0	2.0
	1.0	1.0	2.0	1.5	2.0	1.5
t <sub>1/2</sub> [NET] > 1ng/ml hrs	16	4.4	10	3.8	28.2	13.5
	6.8	4.5	5.7	2.2	9	--
	--	8	5.5	4	9	20.5
	7.7	5.9	9.5	2.5	20.8	5
	3.7	5.9	5.6	7.6	13	19.5

## VIII. BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Loeb, L. Zentralb. Physiol. 23: 73-76 (1909).
2. Haberlandt, L. Munch. Med. Wochenschr. 68: 1577-1578 (1921).
3. Allen, E., Hisaw, F.L. and Gardner, W.V. In: Sex and Internal Secretion (Allen, E., Danforth, C.H. and Doisy, E.A., Eds.), pp. 452-629, Williams & Wilkins, Baltimore (1939).
4. Buternandt, A. and Westphal, U. Ber. Dtsch. Chem. Ges. 67, 1440-1442 (1934).
5. Makepeace, A.W., Weinstein, G.L. and Friedman, M.H. Am. J. Physiol. 119: 512- 516 (1937).
6. Dempsey, E.W. Am. J. Physiol. 120: 126-132 (1937).
7. Astwood, W.B. and Ievold, H.L. Am. J. Physiol. 137: 192- 198 (1939).
8. Long, J.A. and Evans, H.M. Anat. Rec. 18: 241-245 (1920).
9. Aschheim, S. and Zondek, B. Klin. Wochenschr. 6: 1322-1324 (1927).
10. Doise, E.A., Veler, C.D. and Thayer, S.A. Am. J. Physiol. 90: 329-330 (1929).
11. Marrian, G.F. Biochem, J. 24: 1021-1030 (1930).
12. Leonard, S.L., Meyer, R.K. and Hisaw, F.L. Endocrinology 15: 17-24 (1931).
13. Moore, C.R., and Price, D. Am. J. Anat. 50: 13-71 (1932).
14. Pincus, G. and Chang, M.C. Acta Physiol. Lat. Am. 3: 177-183 (1953).
15. Rock, J., García, C.R. and Pincus, G. Recent Progr. Hormone Res. 13: 323-346 (1957).
16. Anticonceptivos Orales, Aspectos Técnicos y de inocuidad. Organización Panamericana de la Salud- Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. (1982).
17. Greep, R.O. Discoveries in Pharmacology (Parnham, M.J. and Bruinvels, J. Eds). pp. 321-337, Elsevier Science Publishers, B.V. (1984).
18. Odell, W.D. and Molitch, M.E. The Pharmacology of Contraceptive Agents. pp. 413-434 (1974).

19. Griffin, James E. Manual of Clinical Endocrinology and Metabolism. pp. 131-156, McGraw Hill, Inc., U.S.A. (1984).
20. Mishell, D. Thorneyerolt, I.H., Nakamura., R.N. Nagata, Y., Stone, S.A. Am. J. Obstet. Gynecol. 114: 923-928 (1972).
21. Roland, M. Leisten, D. and Caruso, L.J. Obstet. Gynecol. 41: 595-601 (1973).
22. Haspels, A.A. Bol. Med. I.P.P.F. 6: 2, (1972).
23. Kesserv, E., Larranaga, A. and Parada, J. Contraceptions. 7: 367-379 (1973).
24. Kay, C.R. Pharmacology of Steroid Contraceptive Drugs. (Garattini, S. and Berendes, H.W. Eds.) pp 1-24. Raven Press. New York, (1977).
25. Inhoffen, H.H., Logemann, W. Hohlweg, W. and Serini, A. Chem. Ber. 71: 1024-1032 (1938).
26. Allen, W.M. and Ehrenstein, M. Science. 100: 251-252 (1944).
27. Ehrenstein, M. Chem. Rev. 42: 457-489 (1948).
28. Birch, A.J. J. Chem. Soc. I: 367-368 (1950).
29. Miramontes, L., Rosenkranz, G. and Djerassi, C. J. Am. Chem. Soc. 73: 3540-3541 (1951).
30. Djerassi C., Miramontes, L. and Rosenkranz, G. J. Am. Chem. Soc. 75: 4440-4442 (1953).
31. Djerassi, C., Miramontes, L., Rosenkrantz, G. and Sondheimer, F. J. Am. Chem. Soc. 76: 4092-4094 (1954).
32. Hertz, R., Tullner, W.W. and Raffelt, E. Endocrinology. 54: 228-230 (1954).
33. Jadryevic, D.E., Mardones, E. and Lipsehutz, A. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91: 38-39 (1956).
34. Pincus, G., Chang, M.C., Hafez, E.S.E., Zarrow, M.X. and Merrill, A. Science 124: 590-891 (1956).
35. Saunders, F.J., Colton, F.B., and Drill, V. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94: 717-720 (1957).
36. McGinty, D.A. and Djerassi, C. Annal, N.Y. Acad. Sci. 71: 500-515 (1958).

37. Tyler, W.T. Clinical Use of 19-Norethynyltestosterona. Paper presented at Annual Meeting of Pacific Coast Fertility Society (1956).
38. Greenblatt, R.B. J. Clin. Endocrinol. 16: 869-875 (1956).
39. Rock, J.; Pincus, G. and García, C.R. Science 124: 891-893 (1956).
40. Tyler, W., Olson, H.J., Wolf, L., Finkelstein, S., Thayer, T., Koplan, N., Lerin, M. and Weintraub, J. Obst. Gynecol. 18: 363-367 (1961).
41. Goldzieher, J.W., Moses, L.E., and Ellis, L.T. J. Am. Med. Assoc. 180: 359-361 (1962).
42. Pincus, G., Chang, M.C., Zarrow, M.X., Hages, E.S.E., and Merrill, A. Endocrinology 59: 695-707 (1956).
43. Rice-Wray, E., Schultz-Contreres, M., Guerrero, I. and Aranda-Rosell, A. J. Am. Med. Assoc. 180: 355-358 (1962).
44. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. 28 Ed. (James, E.F. Reynolds Ed. ) The Pharmaceutical Press, London pp 1421-1423 (1982).
45. United States Pharmacopeia XXI, Official Monographs, Noretindrona, 742 (1982).
46. Rudel, H.W. Fed. Proc. 29: 1228-1231 (1970).
47. Nygren, K.G., Johansson, E.D.B. and Wide, L. Contraception 5: 445-456 (1972).
48. Nygren, K.E. Johansson, E.D.B. and Wide, L. Contraception Jan. ISSUR (1974).
49. Nygren, K.G. and Johansson, E.D.B. Contraception 9: 257-264 (1974).
50. Larsson-Cohn, V., Johansson, E.D.B. and Gemzell, C. Acta. Endoc. 63: 216-224 (1970).
51. Larsson-Cohn, V., Johansson, E.D.B. and Gemzell, C. Acta. Endoc. 64: 38-46 (1970).
52. Landgren, B.M. and Diezfaluzy, E. Contraception 21: 87-113 (1980).
53. Larsson-Cohn, V. Raritan, New Jersey, pp. 4-8 (1973).
54. Board, J.A. Southern Medical Journal 69: 49-52 (1976).

55. Board, J.A. Am. J. Obstet. Gynec. 109: 531-535 (1971).
56. Lawson, J.P., and Brodshaw, F.R. Current Medical Research and Opinion. 1: 53-61 (1972).
57. Vessey, M.P., Mears, E., Andolsek, L. and Ogrine-Oven, M. Lancet 29: 915-922 (1972).
58. Martínez-Manautou, J., Giner-Velasquez, J., Cortes-Gallegos, V., Aznar, R., Rojas, B., Gutiérrez-Najar, A. and Rudel, H.W. Brit. Med. J. 2: 730-735 (1967).
59. Rinehart, W. Population Reports Series A. Nr. 3: 54-67 (1975).
60. Moghissi, K.S. Regulation of Human Fertility (Moghissi, K.S. and Evans, T.N., Eds). pp. 57-84 Wayne State V. Press. Det. Mich. (1976).
61. Fotherby, K. Regulation of Human Fertility (Diczfalusy, E. Ed.) pp. 283-321, Scriptor, Copenhagen (1977).
62. Jeppsson, S. and Kullander, S. Fert. Steril. 32: 307-313 (1970).
63. Larsson-Cohn, V. Acta Endocrinol. Suppl. 144: 7-46 (1970).
64. Bernstein, G.S. and Seward, P. Contraception 5: 369-388 (1972).
65. Inman, W.H.W., Vessey, M.P., Westerholm, B. and Engelund, A. Brit. Med. J. 2: 203-209 (1970).
66. Bergsjö, P., Gagerhol, M.L. and Abildgaard, U. Am. J. Obst. Gynecol. 112: 938-940 (1972).
67. Menon, I.S., Peberdy, M., Rannie, G.H., Weightman, D., Dewar, H.A. J. Gynecol. Brit. Comm. 77: 752-756 (1970).
68. Poller, L. Thomson, J.M., Thomas, W., and Wray, C. Brit. Med. J. 4: 705-707 (1971)
69. Goolden, A.W.G., Bateman, D.M. Plechachinda, R. and Sonderson, C. Lancet 1: 624 (1970).
70. Briggs, M.H. and Briggs, M. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm. 79: 946-950 (1972).
71. Goldman, J., Eckerling, B. Zukerman, Z and Mannhermers. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Comm. 78: 255-260 (1971).
72. Vermeulen, A., Daneels, R. and Thiery, M. Diabetologia 6: 519-523 (1970).

73. Duffy, T.J. and Ray, R. Contraception 3: 197-201 (1984).
74. Hazzard, W.R., Brunzell, J.D., Applebaum, D.M., Goldberg, A.P., Gagne, G., Albers, J.J., Wahl, P.W. Steroid Cotntraceptives and Human Lipoprotein Metabolis: Effects and Mechanisms. (Gerattini, S. and Berendes, H.W. Eds). pp. 251-266, Raven Press, New York (1977):
75. Graham, S. and Fraser, I.S. Contraception 26: 373-388 (1982).
76. Buchanan, R. Population Reports J. 4: 49-67 (1975).
77. Nilsson, S. and Nugren, K.G. Research in Reproduction 11: 1-2 (1979).
78. West, Ch.P. Contraception 27: 563-569 (1983).
79. Johannisson, E., Landgren, B.M. and Diczfalusy, E. Contraception 25: 13-19 (1982).
80. Vassey, M.P., Lawless, M., McPherson, K. and Ueates, D. Lancet II 22:930-934 (1983).
81. Adolsek, L., Kovacic, J., Kozuh, M. and Litt, B. Contraception 28: 505-519 (1983).
82. Ory, H.W., Conger, S.B., Naib, Z., Tyler, C.W. Jr. and Hatcher, R.A. Preliminary analysis of oral contraceptive use and risk of developing premolignant lesions of the uterine cervix. (Garattlini, S. and Berendes, H.W. Eds). pp. 21-218, Raven Press, New York (1977).
83. Berget, A. Dan. Med. Biol. 25: 172-176 (1978).
84. Stern, E., Forsythe, A.B., Youkels, L. and Coeffelt, C.C. Science 196: 1460-1462 (1977).
85. Relzmann, L.S. J. Pharm. Sci. 62: 1609-1614 (1973).
86. Reed, M.J., Fotherby, K. J. Endocrinol. 68: 16-19 (1976).
87. Hümpel, M. Contraception 26: 83-95 (1982).
88. Düsterberg, B., Hümpel, M., Speck, V. Contraception 24: 673:683 (1981).
89. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., MacIvet, M., Orme, M.L.E., Park, B.K., Rowe, P.H. and Smith, S. Clinical Pharmacology and Therapeutics 24: 439-447 (1978).
90. Watanabe, H. Saha, N.N. and Layne, D.S. Steroids 11: 97-101 (1968).
91. Sivin, I., Robertson, D.N., Stern, J., Croxatto, J.B., Díaz, S., Coutinho, E., da Silva, A.R., Alvarez, F., Faundes, A.,

- McDonald, O., Holma, P., Nielsen, N.C., Osler, M. and Nash, H.A. Studies in Family Planning. 11: 227-235 (1980).
92. Díaz, S., Pavez, M., Robertson, D.N. and Croxatto, H.B. Contraception 19: 557-573 (1979).
93. Nash, H.A., Robertson, D.N., Moo-Young, A.J. and Atkinson, J.E. Contraception 18: 367-394 (1978).
94. Odland, V., Víctor, A. and Johansson, E.D.B. Contraception 25: 457-462 (1982).
95. Maheshm V.B., Mills, T.M., Lin, T.I., Ellegood, J.O. and Braselton, W.E. Metabolism, Metabolic Clearance rate, blood metabolites and blood Half life of Norethindrone and Mestranol (Garattini, S., and Berendes, H.W. Eds). pp. 117-129, Raven Press, New York (1977).
96. Mills, T.M., Lin, T.J., Hernández-Ayup, S., Greenblatt, R.C. Ellegood, J.O. and Mahesh, V.B. Am. J. Obstet. Gynecol. 120: 764-772 (1974).
97. Braselton, W.E., Lin, T.J., Ellegood, J.P., Mills, T.M. and Mahesh, V.B. Am. J. Obstet. Gynecol. 133: 154-160 (1979).
98. Kamyab, S., Fotherby, K. and Klopper, A. J. Endocrinol. 41: 263-272 (1968).
99. Stillwell, W.G., Horning, E.C., Horning, M.G., Stillivell, R.N. and Zlatiks, A. J. Steroid. Biochem. 3: 699-706 (1972).
100. Garza-Flores, J. Comunicación personal.
101. Back, D.J., Breckenridge, A.N., Crawford, F.E., Smith, E. and Todd, K. Life Sci. 23: 1053-1056 (1978).
102. Fraser, I.S. and Jansen, B.P.S. Contraception 27: 531-551 (1983).
103. Fotherby, K. Metabolism of Synthetic Steroids by animals and man. (Briggs and Diczfalusy, Eds). pp. 119-148 WHO Stockholm (1974).
104. Smith, R.L. Biliary excretion and hepatotoxicity of contraceptive steroid. (Briggs and Diczfalusy Eds.) pp. 149-168. WHO Stockholm (1974).
105. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., Orme, M.L.E. and Rowe, P.H. Brit. J. Pharmacol. 69: 441-452 (1980).
106. Back, D.J., Bates, M.W., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E. Orme, M.L.E., Rowe, P.N., Smiles, G. and Smith, E. Contraception 18: 127-135 (1978).

107. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., MacIver, M. Orme, M.L.E., Rowe, P.H. and Smith, E. Clinical Pharmacol. and Therapeutics 24: 448-453 (1978).
108. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., Orme, M.L.E. Rowe, P.H., Smiles, G. and Smith, E. Journal of Pharmacol. and Experimental Therapeutics. 207: 55-565 (1978).
109. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., MacIver, M. Orme, M.L.E. and Rowe, P.H. Drugs 21: 46-61 (1981).
110. Avendano, S., Tatum, H.J., Rudel, H.W., and Avendano, O. Am. J. Obstet. Gynecol. 106: 122-127 (1970).
111. Fotherby, K. and Warren, R.J. Contraception 14: 261-267 (1976).
112. Nuttall, I.D., and Elstein, M. Contraception 25: 463-469 (1982).
113. Nuttall, I.D. and Elstein, M. Contraception 25: 51-57 (1982).
114. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., MacIver, M., Orme, M.L.E., Park, B.K., Rowe, P.M. and Smith, E. European Journal of Clinical Pharmacology 15: 193-197 (1979).
115. Kenyon, I.E. Br. Med. J. 1: 686-687 (1972).
116. Coulam, C.B. and Annerggers, J.F. Epilepsia 20: 519-525 (1979).
117. Rack, D.J., Bates, M., Bowden, A., Breckenridge, A.M., Hall, M.J., Jones, H., Moclver, M., Orme, M., Perucca, E., Richens, A., Rowe, P.H. and Smith, E. Contraception 22: 495-503 (1980).
118. Odlin, V., Johansson, E.D.B. Acta Endocrinology 98: 470-476 (1982).
119. Breckenridge, A.M., Back, A.J. and Orme, M. Pharmacol. Ther. 7: 470-476 (1982).
120. Von Hempel, E., Bohm, W., Carol, W. and Klinger, C. Zeitblad. Gynakol. 95: 1451-1455 (1973).
121. Janz, J. and Schmidt, D. Lancet 1: 1113-1116 (1974).
122. Barkfeldt, J.O., Odlin, V. and Victor, A. Contraception 27: 423-429 (1983).
123. Bacon, J.F., and Shenfield, G.M. British Medical Journal 1: 293-296 (1980).

124. Dossetor, J. British Medical Journal 4: 467-468 (1975).
125. Joshi, J.V., Joshi, U.M., Sankholi, G.M., Krishna, U., Mandelkar, A., Chowdhury, V., Hazari, I., Gupta, K., Sneth, U.K. and Saxena, B.N. Contraception 22: 643-652 (1980).
126. Friedman, C.I., Huncke, A.L., Kim, N.H. and Powell, I. Obstet. Gynecol. 55: 33-37 (1980).
127. Back, D.J., Breckenridge, A.M., Crawford, F.E., Cross, K.J., Orme, M.L.E., Percival, A., and Rowe, P.H. Journal of Steroid Biochemistry 13: 95-100 (1980).
128. Nygren, K.G., Lindberg, P., Martinsson, K., Bosy, W.T.K., and Hohansson, E.D.B. Contraception 9: 265-279 (1974).
129. Warren, R.J. and Fotherby, K. J. Endocrinology 62: 605-618 (1974).
130. Pasqualini, J.R., Castellet, R., Portois, M.C., Hill, J.L., and Kinel, F.A. J. Reprod. Fert. 49: 189-193 (1977).
131. Stanczyk, F.Z., Brenner, P.F., Mishell, D.R., Ortiz, A., Gentscheim, E.K. and Goebelsmann, W. Contraception 18: 615-633 (1978).
132. Okerholm, R.A., Peterson, F.E., Keeley, F.J., Smith, T.C. and Glazko, A.J. Europ. J. Clin. Pharmacol. 13: 35-39 (1978).
133. Fotherby, K., Shrimanker, K., Abdel-Rahman, H.A. Contraception 19: 39-45 (1979).
134. Prasad, K.V.S., Harasinga Rao, B.S., Sivakumar, B. and Prema, K. Contraception 20: 77-90 (1979).
135. Stanczyk, F.Z., Mroszczak, E.J., Ling, T., Runkel, R., Henzl, M. Miyakawa, I. and Goebelsmann, V. Contraception 28: 241-251 (1983).
136. Goldzieher, J.W., Dozier, T.S. De la Pena, A., Ojo, A.O., Lean, T.S. Chinnatamby, S., Basnayake, S. and Koetsawang, S. Contraception 21: 1-16 (1980).
137. Ascholf, J., Ceresa, F. and Halberg, F. Eds. Chronobiological Aspects of Endocrinology. F.K. Schattaver Verlag, Stuttgart. (1974).
138. Krieger, D.T. Editor. Endocrine Rhythms. Raven Press, New York (1979).
139. Kiriwat, O. and Fotherby, K. Contraception 27: 153-160 (1983).
140. Kuhl, H., Brenser, H.J., and Taubert, H.D., Contraception 26: 303-315 (1982).

141. Swamy, K.K. Clinical Pharmacokinetics 3: 216-240 (1978).
142. Prasad, K.V.S., Narasinga Rao, B.S., Sivakumar, B. and Preina, K. Abstract in J. Steroid Biochem. (226) 9: 860 (1978).
143. Goldzieher, J.W., Dozier, T.S. and De la Pena, A. Contraception 21: 17-27 (1980).
144. Langer, R. Pharmac. Therap. 21: 35-51 (1983).
145. Rowe, R.C. Pharmacy International 6: 14-17 (1985).
146. Joseph, A.A., Hill, J.L., Patel, J., Patel, S. and Kinel, F.A. Jorunal of Pharmaceutical Sciences 66: 490-493 (1977).
147. Kinel, F.A., Angee, I., Chang, C.C. and Rudel, H.W. Acta Endocrinol. 64: 508-511 (1970).
148. Rowe, R.C. Pharmacy International 4: 173-176 (1983).
149. Merkle, H.P. Pharmacy International 5: 88-91 (1984).
150. Kondo, A. Microcapsule Processing and Technology (Van Valkenburg, I.W., Ed.) pp: 20-30 Marcel Dekker, New York (1979).
151. Fiedrich, R.L. Ann. Aphthal. 6: 1279-1284 (1974).
152. Cowsar, D.R., Tarwater, O.R. and Tanquary, A.C. Controlled Release of fluoride from hydrogels for dental application (Andrade, J.D. Ed.) pp. 180-197. American Chemical Society, Wahington (1976).
153. Goodson, J.M., Haffajee, A. and Socransky, S. Jorunal Clin. Periodontol. 6: 83-92 (1979).
154. Preis, I. and Langer, R. J. Immunol. Methods. 25: 193-197 (1979).
155. Blackshear, P. Sci. Am. 241: 66-73 (1979).
156. Mason-García, M., Cigh, S. Comaru-Schally, A.M., Redding, T.M., Somogyvari-Vigh, A., Horvath, J. and Schally, A.V. Medical Science 82: 1547-1551 (1985).
157. Schwope, A.D., Wose, D.L. and Howes, J.F. Life Sci. 17: 1877-1886 (1975).
158. Creque, H.M., Langer, R. and Folkman, J. Diabetes 29: 37-40 (1980).
159. Yeh, K.C., Berger, E.T., Breault, G.O., Lei, B.W. and McMahon, F.G. Biopharmaceutics and Drug Disposition 3: 219-230 (1982).

160. Pongpaibul, Y., Price, J.C. and Whitworth, C.W. Drug Development and Industrial Pharmacy 10: 1597-1616 (1984).
161. Brazeau, G.A. Pharmacy International 6: 69-74 (1985).
162. Toppozada, M. Obstet. Gynecol. Surv. 32: 335-347 (1977).
163. Benagiano, G. and Primiero, F.M. Drugs 25: 570-609 (1983).
164. Beck, L.R. and Pope, V.Z. Contraception 25: 97-101 (1981).
165. Pharriss, B.B. J. Reprod. Med. 20: 155-165 (1978).
166. Chien, Y.W. J. Parent. Drug. Assoc. 34: 295-323 (1980).
167. Hawkins, D.G. and Elder, M.G. Human Fertility Control: Theory and Practice, Butterworth, Boston (1979).
168. Nash, H.A., Robertson, D.N., Moo-Young, A.J. and Atkinson, L.E. Contraception 18: 367-394 (1978).
169. Kurunmäki, H., Toivonen, J., Lähteenmäki, P. and Luukkainen, T. Contraception 31: 304-318 (1985).
170. Kumar, D., Farooq, A. and Laumas, K.R. Contraception 23: 261-267 (1981).
171. Pharriss, B.B., Place, V.A., Sendelbeck, L. and Schmidt, E. J. Reprod. Med. 17: 91-97 (1976).
172. Pitt, C.G., Jeffcoat, R., Zewidinger, R.A. and Schindler, A. J. Biomed. Mat. Res. 13: 497-507 (1979).
173. Sidman, K.R., Schwope, A.D., Steber, W.D., Rudolph, S.E. and Poulin, S.B. J. Membr. Sci. 7: 277-291 (1980).
174. Peterse, R.V., Anderson, J.H., Fang, S.M., Teijen, J., Gregonis, D.E. and Kim, S.W. Polymer. Preprints. 20: 20-23 (1979).
175. Beck, L.R., Ramos, R.A., Flowers, C.E., Lopez, G.Z., Lewis, D.H. and Cowsar, D.R. Am. Journal Obstet. Gynecol. 140: 799-806 (1981).
176. Benagiano, G., Ermini, M. and Gabelnick, H.L. in Hormonal Factors in Fertility, Infertility and Contraception (Vander-Molen, H.I., Klopper, A., Lunefeld, B.L., Neves e Castro, M., Sciarro, F. and Vermeulen, A. Eds). pp. 141-147. Excerpta Medica, Amsterdam (1982).
177. Beck, L.R., Pope, V.Z., Flowers, C.E., Cowsar, D.R., Rice, T.R., Lewis, D.H., Dunn, R.L., Moore, A.B. and Gilley, R.M. Biol. Reprod. 28: 186-195 (1983).

178. Pitt, C.G., Marks, T.A. and Sehlinder, A. Natl. Inst. Drug Abuse Res. Monogr. Ser. 28: 232-252 (1980).
179. Gupta, G.N., et. al. Contraception 30: 239-252 (1984).
180. Manual del Laboratorio de Hormonas. Instituto Nacional de la Nutrición. Salvador Zubirán. Departamento de Biología de la Reproducción. pp. 2-3, México, D.F. (1983).
181. Gibaldi, M. and Perrier, D. Pharmacokinetics and the Pharmaceutical Sciences, Marcel Dekker Inc, USA. pp. 281-292 (1975).
182. Zerbe, H., Luckow, V., Cawello, W. and Cordes, G. Pharmaceutical Research 54: 30-36 (1985).
183. Abraham, G.E. Journal of Steroid Biochemistry. 6: 261-270 (1975).
184. Tovar, N.B., Rahman, S.A., Cekan, S.Z. and Diczfalusy, E. Journal of Steroid Biochemistry. 9: 561-567 (1978).
185. Tovar, B.N., Pérez-Palacios, G. y Ulloa-Aguirre, A. Analisis de Datos y Control de Calidad en el Radioinmunoanálisis de Hormonas Esteroides. Departamento de Biología de la Reproducción. I.N.N.S.Z. México. (1982).
186. Laumas, V., Jain, A., Jha, S. et al. Contraception 23: 2-6 (1981).
187. Méndez, I. Diseños que usan Bloques. Instituto de investigaciones en matemáticas aplicadas y en sistemas pp. 1-18 México, D.F. (1980).
188. Jerrold H. Zr. Biostatistical Analysis Ed. Prentice-Hall, Inc. pp. 151-162, U.S.A. (1974).
189. Robinson, J.R., and Eriksen, S.P. Journal of Pharmaceutical Sciences 55: 1254-1263 (1986).