



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**ESTUDIO FARMACOGENÉTICO Y DE BIODISPONIBILIDAD COMPARATIVA PARA LA
EVALUACIÓN DEL EFECTO DE POLIMORFISMOS DE CITOCROMOS RELEVANTES EN
LA FARMACOCINÉTICA EN VOLUNTARIOS SANOS MEXICANOS**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Doctor en Ciencias
en Investigación Clínica Experimental en Salud
(Farmacología Clínica)

PRESENTA
M. en C. Carlos Alejandro Díaz Tufinio

COMITÉ TUTOR
Dra. Vanessa González Covarrubias
Instituto Nacional de Medicina Genómica
Dr. José Antonio Palma Aguirre
Axis Clinicals Latina
Dra. Aurora de la Peña Díaz
Instituto Nacional de Cardiología / UNAM



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.

Dedicatoria

A la Mtra. Cinthya Fernández, mi colega, cómplice y compañera de vida loca, que por retos personales, profesionales y académicos no para. Muchas gracias por ayudarme a componer el avión en pleno vuelo, y por ser siempre ese puerto seguro en tiempos buenos, pero sobre todo en momentos nublados, complejos y determinantes.

A mi familia, por el gran ejemplo personal y académico que son todos, y porque en las buenas y en las malas, nos encontramos juntos para afrontar la realidad. A Pili, por demostrar por casi 100 años que las ganas de vivir es lo que más importa en esta vida y nos ayuda a seguir adelante.

A los amigos de todas las esferas de mi desarrollo humano, porque con sus charlas, discusiones, apoyo y compañía, se nutre mi alma y mi personalidad con cada uno de ustedes.

A mis alumnos y colegas, así como a los que creen y confían en mí, ya que me permiten seguir desarrollando mi potencial personal, profesional y académico para ser cada día una mejor y más refinada versión de mí mismo.

Reafirmo cada vez más que la multidisciplinariedad y la flexibilidad es esencial para el desarrollo integral de un ser humano, y tengo la gran fortuna de poder hacerlo y ser una persona plena. Así que finalmente agradezco a la vida, por permitirme completar este pequeño – gran – paso académico y reto personal, ya que esto me permitirá seguir contribuyendo a la ciencia y a la sociedad desde múltiples perspectivas... *New challenge accepted!*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada (CVU No. 439303) para completar los estudios de Doctorado en Ciencias en Investigación Clínica Experimental en Salud (Farmacología Clínica) del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud (PMDCMOS) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al personal técnico y administrativo de *Axis Clinicals Latina* (Unidad Clínica y Analítica) por su trabajo, apoyo y colaboración en la conducción y análisis de las concentraciones plasmáticas de fluoxetina en el desarrollo del estudio de bioequivalencia.

Al laboratorio de Farmacogenómica del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), especialmente a la M. en C. Dulce Karina Rico Amador y a la Biol. Cintia K. Guzmán Cruz, por su apoyo durante la fase de análisis farmacogenómico de este proyecto.

A la Dra. Maricarmen Jiménez Martínez y a la Lic. Aleithia Manzanarez Villegas por el apoyo administrativo durante mi paso por el PMDCMOS.

A mis sinodales y jurado de examen, Dra. Patricia Medina Segura, Dra. Silvia Ruiz-Velasco Acosta, Dr. Juan Luis Chávez Pacheco, Dr. Ismael Lares Asseff, por su revisión y valiosos comentarios para pulir este trabajo.

A mi comité tutorial, Dra. Vanessa González Covarrubias, Dra. Aurora de la Peña Díaz y Dr. José Antonio Palma Aguirre, por su confianza, guía, comentarios, y por contribuir con su experiencia y conocimiento a mi proyecto y a mi formación doctoral a lo largo de estos arduos y complejos años.

¡A todos ustedes, infinitas gracias!

Resumen

La identificación de variantes genéticas para personalizar la terapia farmacológica es una propuesta médica cada vez más tangible, con al menos 365 productos farmacéuticos que incluyen indicaciones en el etiquetado para sugerir ajustes de dosis y/o prevenir reacciones adversas, y 124 fármacos con recomendaciones regulatorias respecto de su manejo terapéutico, seguridad, respuesta y farmacocinética, según la FDA. El objetivo del presente proyecto fue evaluar el impacto de variantes genéticas en la farmacocinética del medicamento clorhidrato de fluoxetina en el marco de un estudio de bioequivalencia. Dicho estudio clínico se realizó con 24 voluntarios sanos, con los cuales se determinó bioequivalencia entre dos formulaciones de fluoxetina. A partir de una muestra de sangre de estos voluntarios, se extrajo ADN, se genotipificaron mediante microarreglos y seleccionaron 54 variantes en 12 genes relacionados con farmacocinética (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*), farmacodinamia y eficacia (*ABCB1*, *SLC6A4*, *TPH1*, *COMT*).

Se desarrollaron modelos de asociación de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC, $t_{m\acute{a}x}$, $t_{1/2}$, Cl y TMR con las variantes farmacogenéticas, incluyendo covariantes demográficas. Resultaron significativas 34 variantes en 10 genes, de las cuales 29 variantes fueron de 7 citocromos, siendo las de mayor efecto *CYP2B6* (rs4802101) en $C_{m\acute{a}x}$, *CYP2C9* (rs2256871) en $t_{m\acute{a}x}$, *CYP3A4* (rs67666821) en Cl y *CYP2D6* (rs28371703, rs1065852, rs28371706) en ABC_{0-t} , $t_{1/2}$ y Cl.

Tras la remoción de los datos farmacocinéticos de un sujeto identificado con genotipo de metabolizador lento (haplotipo *CYP2D6*10* de función del citocromo disminuida) confirmado fenotípicamente, se disminuyó entre 4.2% y hasta 13.7% la variabilidad intersujeto en los parámetros farmacocinéticos de ABC. Esto sugiere que se podría controlar la variabilidad en estos ensayos clínicos si se analizan variantes farmacogenéticas *a priori* en estudios farmacológicos.

Este estudio controlado y aleatorizado que incluye un componente farmacogenético proporciona una evidencia de la utilidad de la exploración de variantes genéticas en la farmacocinética del antidepresivo fluoxetina. La incorporación de análisis farmacogenéticos en estudios clínicos controlados y aleatorizados de bioequivalencia permitirá explorar más variantes genéticas con impacto en la farmacocinética, que podrán resultar de interés por su posible impacto en la seguridad y eficacia de los fármacos.

Palabras clave: *Bioequivalencia, Farmacocinética, Farmacogenética, Fluoxetina.*

Abstract

Identification of genetic variants to personalize drug therapy is a proposition that is becoming increasingly tangible, with at least 365 pharmaceutical products including labeling indications to suggest dosage adjustments and/or prevent adverse reactions, and 124 regulatory recommendations on drugs regarding its therapeutic management, safety, response, or pharmacokinetics, according to the FDA. The objective of this project was to evaluate the impact of relevant genetic variants on the pharmacokinetics of the drug fluoxetine hydrochloride based on a clinical bioequivalence study. The clinical study was conducted with 24 healthy volunteers, with whom bioequivalence between two fluoxetine formulations was concluded. DNA was extracted from blood samples of the volunteers, genotyped using microarrays and selected 54 variants from 12 genes related to pharmacokinetics (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*), pharmacodynamics, and efficacy (*ABCB1*, *SLC6A4*, *TPH1*, *COMT*).

Association models of pharmacokinetic parameters C_{max} , AUC, t_{max} , $t_{1/2}$, Cl and MRT with pharmacogenetic variants were developed, including demographic covariates. Thirty-four variants in 10 genes were significant, of which 29 variants were found in 7 cytochromes, being the most relevant *CYP2B6* (rs4802101) in C_{max} , *CYP2C9* (rs2256871) in t_{max} , *CYP3A4* (rs67666821) in Cl, and *CYP2D6* (rs28371703, rs1065852, rs28371706) in AUC_{0-t} , $t_{1/2}$, and Cl.

After the identification of the PK data of one subject with slow metabolizer genotype (*CYP2D6**10 haplotype with decreased cytochrome function), confirmed phenotypically, the between-subject variability in AUC pharmacokinetic parameters was decreased between 4.2% and up to 13.7%. This suggests that variability could be controlled by analyzing pharmacogenetic variants *a priori* in pharmacological studies.

This randomized controlled study including a pharmacogenetic component provides evidence of the usefulness of exploring genetic variants in the pharmacokinetics of the antidepressant fluoxetine. The incorporation of pharmacogenetics analysis in controlled and randomized bioequivalence clinical studies will make it possible to explore more genetic variants with an impact on pharmacokinetics, which may be of interest due to their possible impact on the safety and efficacy of drugs.

Keywords: *Bioequivalence, Pharmacokinetics, Pharmacogenetics, Fluoxetine.*

| Contenido | Página |
|---|---------------|
| Dedicatoria..... | 2 |
| Agradecimientos | 3 |
| Resumen | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Lista de figuras | 8 |
| Lista de tablas | 9 |
| Abreviaturas..... | 10 |
| 1. Introducción | 12 |
| 1.a. Estudios de bioequivalencia | 12 |
| 1.b. Variabilidad farmacocinética intrasujeto e intersujeto..... | 14 |
| 1.c. Clorhidrato de fluoxetina: Farmacocinética y farmacodinamia | 15 |
| 1.d. Farmacogenética | 19 |
| 2. Justificación e hipótesis | 22 |
| 3. Objetivos..... | 24 |
| 4. Materiales y métodos | 25 |
| 4.a. Estudio de bioequivalencia y conducción clínica..... | 25 |
| 4.b. Determinación de fluoxetina en plasma..... | 27 |
| 4.c. Análisis farmacocinético y estadístico | 28 |
| 4.d. Estudio farmacogenético | 29 |
| 5. Resultados | 31 |
| 5.a. Estudio clínico para la determinación de bioequivalencia | 31 |
| 5.b. Determinación de fluoxetina en plasma..... | 32 |
| 5.c. Análisis farmacocinético y estadístico de bioequivalencia | 34 |
| 5.d. Análisis farmacogenético..... | 39 |
| 5.d.i. Estrategia de genes candidatos..... | 41 |
| 5.d.ii. Asociación de variantes genéticas con parámetros farmacocinéticos | 44 |
| 6. Discusiones | 56 |
| 6.a. Estudio clínico y bioanalítico de bioequivalencia de fluoxetina | 57 |
| 6.b. Análisis farmacocinético y estadístico de bioequivalencia | 57 |
| 6.c. Estudio farmacogenético | 58 |
| 7. Conclusiones y perspectivas | 64 |

| | |
|---|-----|
| 8. Referencias | 67 |
| 9. Anexos | 75 |
| 9.a. Carta de conducción del estudio clínico en apego a las Buenas Prácticas Clínicas (BPC)75 | |
| 9.b. Aprobaciones del protocolo clínico por los comités de ética e investigación..... | 76 |
| 9.c. Autorización del protocolo clínico por COFEPRIS | 78 |
| 9.d. Consentimiento informado de participación en el estudio | 80 |
| 9.e. Perfiles farmacocinéticos individuales de fluoxetina en escala natural y logarítmica | 85 |
| 9.f. Asociación de variantes genéticas con la variable $C_{m\acute{a}x}$ (Salida de datos crudos de PLINK) | 109 |
| 9.g. Análisis retrospectivo de estudios clínicos de bioequivalencia | 113 |
| 9.g.i. Resultados | 114 |
| 9.g.ii. Discusiones..... | 117 |
| 9.h. Compendio de coeficientes de variación intrasujeto (ISV) ponderados de los parámetros farmacocinéticos por principio activo | 119 |
| 9.i. Compendio de coeficientes de variación intrasujeto (ISV) de los parámetros farmacocinéticos por principio activo, derivados de estudios de bioequivalencia individuales | 124 |
| 9.j. Presentación en congreso <i>PGRN Hub (2018)</i> | 127 |
| 9.k. Artículo “Pharmacogenetic variants associated with fluoxetine pharmacokinetics from a bioequivalence study in healthy subjects” publicado en el <i>Journal of Personalized Medicine</i> (2023) | 128 |
| 9.l. Artículo “Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population” aceptado y en proceso editorial en el <i>Clinical Pharmacology in Drug Development Journal</i> (Octubre 2023)..... | 145 |

Lista de figuras

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Ruta metabólica del fármaco clorhidrato de fluoxetina (PharmGKB, 2021)..... | 16 |
| Figura 2. Perfiles farmacocinéticos individuales (concentración plasmática de fluoxetina contra tiempo) de los medicamentos de prueba (A) y referencia (B). | 35 |
| Figura 3. Perfil farmacocinético promedio de fluoxetina para cada medicamento, prueba (azul) y referencia (rojo). | 36 |
| Figura 4. Parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ (A) y ABC_{0-t} (B) graficados para cada sujeto..... | 38 |
| Figura 5. Calidad de ADN de cada sujeto mediante electroforesis en gel de agarosa..... | 40 |
| Figura 6. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs1135840 del gen <i>CYP2D6</i> | 47 |
| Figura 7. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs1065852 del gen <i>CYP2D6</i> | 47 |
| Figura 8. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs28371703 del gen <i>CYP2D6</i> | 48 |
| Figura 9. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs28371706 del gen <i>CYP2D6</i> | 48 |
| Figura 10. Concentración plasmática promedio de fluoxetina contra tiempo, estratificada por genotipos de <i>CYP2D6</i> (A-C) y <i>CYP2C19</i> (D)..... | 50 |
| Figura 11. Efecto de interacción de 2 y 3 variantes en <i>CYP3A4</i> , <i>CYP2D6</i> y <i>CYP1A2</i> en $C_{m\acute{a}x}$ | 54 |
| Figura 12. Efecto de interacción de 3 variantes en <i>CYP2C19</i> , <i>CYP2B6</i> y <i>CYP1A2</i> en el ABC_{0-t} | 54 |
| Figura 13. Efecto de interacción de 3 variantes en <i>CYP2D6</i> y <i>CYP2C8</i> en Cl. | 54 |
| Figura 14. Características de las formulaciones de los estudios de bioequivalencia analizados. | 115 |
| Figura 15. Variabilidad intersujeto contra intrasujeto del parámetro farmacocinético $C_{m\acute{a}x}$ | 116 |

Lista de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Grupos de trabajo internacionales en el tema de guías prácticas de farmacogenética. . | 20 |
| Tabla 2. Condiciones cromatográficas del método bioanalítico para la determinación de fluoxetina en plasma..... | 27 |
| Tabla 3. Datos demográficos de los voluntarios incluidos en el estudio clínico, segmentados por género..... | 31 |
| Tabla 4. Parámetros de validación del método bioanalítico para la determinación de fluoxetina en plasma..... | 33 |
| Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos individuales de fluoxetina. | 36 |
| Tabla 6. Fuentes de variación del estudio (secuencia, periodo y formulación) de los parámetros farmacocinéticos transformados logarítmicamente. | 38 |
| Tabla 7. Bioequivalencia de fluoxetina con los datos de los sujetos que concluyeron el estudio clínico ($n=24$)..... | 39 |
| Tabla 8. Información de genes y SNVs en estudio..... | 42 |
| Tabla 9. Frecuencias del alelo menos común de los genes estudiados..... | 43 |
| Tabla 10. Matriz de correlación de las variables demográficas..... | 44 |
| Tabla 11. SNVs con efecto significativo en las variables farmacocinéticas..... | 46 |
| Tabla 12. Variables demográficas y variantes genéticas como efectos predictores (independientes) de las variables farmacocinéticas (dependientes). | 51 |
| Tabla 13. Bioequivalencia de fluoxetina posterior a la remoción de los datos farmacocinéticos del sujeto con fenotipo de metabolizador lento ($n=23$). | 55 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| $ABC_{0-\infty}$ | Área bajo la curva desde el tiempo 0 estimado al infinito |
| ABC_{0-t} | Área bajo la curva desde el tiempo 0 hasta el último tiempo de muestreo t |
| ACL | <i>Axis Clinicals Latina</i> |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| BCS | Sistema de clasificación biofarmacéutica |
| BPC | Buenas prácticas clínicas |
| Cl | Depuración (aclaramiento) |
| $C_{m\acute{a}x}$ | Concentración máxima |
| CNV | Variaciones de número de copias (<i>Copy Number Variant</i>) |
| COFEPRIS | Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios |
| COMT | Catecol <i>O</i> -metiltransferasa |
| CPIC | Consortio de implementación de farmacogenética clínica (<i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>) |
| CYP | Citocromo P |
| EMA | Agencia europea de medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>) |
| FDA | Administración de medicamentos y alimentos (<i>Food and Drug Administration</i>) |
| GSA | Arreglo de tamizaje global (<i>Global Screening Array</i>) |
| IC | Intervalo de confianza |
| INMEGEN | Instituto Nacional de Medicina Genómica |
| k_{el} | Constante de eliminación |
| \ln | Logaritmo natural |
| \log | Logaritmo |
| m | Pendiente de la regresión lineal |
| MAO | Monoaminoxidasa |
| MDR | Reducción de dimensionalidad multifactorial (<i>Multifactor Dimensionality Reduction</i>) |
| NOM | Norma oficial mexicana |
| P-gp | Glicoproteína P |
| PGRN | Red de investigación en farmacogenómica (<i>Pharmacogenomics Research Network</i>) |

| | |
|-------------------|---|
| PNO | Procedimiento normalizado de operación |
| <i>p-value</i> | Valor de probabilidad <i>p</i> |
| rs | ID de referencia de la variante de un solo nucleótido (<i>Reference single nucleotide variant ID</i>) |
| SNV | Variante de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Variant</i>) |
| SSRI | Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i>) |
| $t_{1/2}$ | Tiempo de vida media |
| $t_{m\acute{a}x}$ | Tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima |
| TMR | Tiempo medio de residencia |
| UGT | UDP-glucuroniltransferasa |
| UV | Ultravioleta |
| Vd | Volumen de distribución |

1. Introducción

1.a. Estudios de bioequivalencia

La investigación clínica estudia la seguridad y eficacia de medicamentos, dispositivos médicos y de diagnóstico, a través de estudios diseñados con objetivos y criterios estadísticos claramente definidos. El desarrollo de medicamentos involucra cuatro fases clínicas: la fase I estudia la farmacocinética y evidencias preliminares de la eficacia en un entorno controlado y aleatorizado (*RCT: Randomized Controlled Trial*), habitualmente con sujetos sanos; la fase II confirma en una cohorte limitada de pacientes la validez terapéutica con el establecimiento de una dosis efectiva, así como la obtención de indicios de su seguridad; la fase III evalúa la eficacia terapéutica incrementando la cantidad de pacientes estudiados; mientras que la fase IV valora el uso del producto en una experiencia de post-comercialización en el mercado real para validar su seguridad y eficacia (ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1997).

Una vez probada la seguridad y eficacia del producto farmacéutico, este puede ser comercializado de manera exclusiva bajo la protección de una patente por 20 años. Al expirar esta última, el principio activo puede ser vendido en productos formulados por otras empresas farmacéuticas, conocidos como medicamentos genéricos, evaluados a través de estudios de bioequivalencia. El objetivo de los estudios de bioequivalencia es comparar la biodisponibilidad entre dos formulaciones distintas, requisito para registro de una formulación genérica intercambiable en el país. En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) regula estos estudios a través de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 (COFEPRIS, 2013). El diseño de estos estudios de intercambiabilidad ya sea cruzados, paralelos o replicados, depende de la variabilidad intra- o intersujeto de la molécula a estudiar, así como de sus características farmacológicas tales como el tiempo de vida media y su régimen de dosificación. La regulación mexicana establece que al menos 12 sujetos deben ser evaluados farmacocinética y estadísticamente con fines de bioequivalencia.

La biodisponibilidad es el concepto farmacológico de la velocidad y la cantidad con la que el principio activo llega a la circulación sistémica, y posteriormente a los tejidos donde ejercerá su acción terapéutica. La biodisponibilidad depende de la farmacocinética, que es la serie de fenómenos biológicos que un principio activo sufre en el organismo. En formulaciones por vía

oral, dichos procesos describen desde la liberación del principio activo a partir del medicamento administrado, el cual se diseña farmacéuticamente para entregar una dosis que genere el efecto en el tiempo deseado. Ya que el principio activo se encuentra disponible en el tracto gastrointestinal para su absorción, su distribución en la circulación sanguínea sistémica dará paso al metabolismo y excreción (eliminación) del fármaco.

Para la caracterización farmacocinética en un estudio clínico de biodisponibilidad comparativa o bioequivalencia, los tiempos de muestreo sanguíneo de los voluntarios se planean con el fin de poder tener cobertura de las concentraciones plasmáticas en las etapas de absorción, metabolismo y eliminación, recomendando como mínimo 11 puntos de muestreo sanguíneo para cubrir al menos el 80% de la curva farmacocinética para asegurar la validez de los análisis farmacocinéticos y bioestadísticos en el estudio. De manera general, se toma al menos una muestra anterior a la primera dosis ($t = 0$ h), entre 3 y 4 puntos antes de $t_{máx}$, 3 a 5 tiempos de muestreo alrededor de la $t_{máx}$ del medicamento, y al menos 4 puntos para la fase de eliminación, cubriendo como mínimo 4 vidas medias, según lo descrito por la normatividad mexicana previa (NOM-177-SSA1-1998) para estudios de bioequivalencia.

Los procesos bioquímicos mediados enzimáticamente a través de los cuales se altera la estructura química del fármaco son conocidos como metabolismo. A pesar de que el hígado es el principal tejido metabolizador, el metabolismo de xenobióticos ocurre a diferentes niveles en varios órganos, como en riñón, intestino delgado, pulmón, cerebro y corazón, tanto a través de enzimas de la familia de los citocromos P450 (CYP450), como a través de otros mecanismos enzimáticos, como las UDP-glucuroniltransferasas (UGT), sulfotransferasas, carboxiesterasas u otras oxidasas (Basit *et al.*, 2020).

Los citocromos más importantes son CYP3A4, CYP2D6 y CYP2C9, ya que llevan a cabo el 50%, 20% y 15% del total del metabolismo de los CYP450 respectivamente (Lazalde Ramos, 2012). Sin embargo, hay algunos otros CYP de relevancia clínica, como el CYP2C19, CYP2E1, CYP2A6 y CYP1A2. Todos los anteriores se han demostrado como altamente variables a nivel genotipo y/o fenotipo. Varios de estos cambios en estos y otros CYP ya se encuentran clasificados, detallados y se ha determinado el efecto de este cambio en su actividad enzimática *in vivo* y/o *in vitro* (Sim & Gaedigk, 2016).

El planteamiento de los ensayos clínicos se hace más complejo, en dimensión y logística, cuando se estudian principios activos de alta variabilidad farmacológica (farmacocinética y/o farmacodinamia). También la conducción de estudios con fármacos con ventana terapéutica estrecha es retadora, ya que sus concentraciones máximas toleradas se podrían alcanzar con las dosis terapéuticas normalmente administradas, como es el caso de medicamentos inmunosupresores, antineoplásicos y anticoagulantes, entre otros importantes grupos terapéuticos (Regmi & Bharat, 2012). Para estos estudios con fármacos altamente variables en su farmacocinética o poco tolerados es deseable un diseño clínico experimental donde se pueda controlar la variabilidad biológica en una población de estudio homogénea (González-Vacarezza *et al.*, 2012). Para ello, las variantes genéticas podrían contribuir, por lo que su estudio es relevante para considerarlas como elemento en el diseño de estudios de biodisponibilidad comparativa.

1.b. Variabilidad farmacocinética intrasujeto e intersujeto

En el diseño de estudios de bioequivalencia, la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos es un dato indispensable para el cálculo del tamaño de muestra. La variabilidad farmacocinética intrasujeto define la varianza en los parámetros farmacocinéticos determinantes de la bioequivalencia ($C_{máx}$ y ABC) de un medicamento en un mismo sujeto ante exposiciones repetidas, mientras que la variabilidad intersujeto es la cuantificación entre diferentes sujetos. Este último valor tiende a ser mayor que el primero, debido a diferencias fisiológicas y genéticas de los sujetos. A mayor variabilidad farmacocinética, mayor tamaño de muestra es necesario para alcanzar la certeza estadística en la prueba de bioequivalencia.

Se han explorado enzimas metabólicas y transportadores a través de estudios clínicos, para determinar su relación con fármacos conocidos por ser altamente variables en su eficacia clínica y seguridad, como los antidepresivos. En algunos estudios, se han asociado estas diferencias clínicas a su variabilidad farmacocinética, que implican variaciones importantes entre sujetos en las concentraciones biodisponibles en sangre. Se ha encontrado que fármacos con altas variabilidades farmacocinéticas intrasujeto están asociados con metabolismo mayoritario por *CYP3A4*, mientras que existe evidencia de asociación de alta variabilidad intersujeto para los fármacos metabolizados por *CYP2D6* (Sugihara *et al.*, 2015), como es el caso de los antidepresivos.

Aunado a los datos de alta variabilidad, algunos fármacos antidepresivos resultan ser medicamentos con ventanas terapéuticas estrechas.

1.c. Clorhidrato de fluoxetina: Farmacocinética y farmacodinamia

Los antidepresivos son medicamentos psicoactivos empleados para tratar trastornos depresivos, ansiedad, ataques de pánico, desórdenes de conducta alimentaria y alteraciones del control de impulsos. A pesar de que se usan de manera extensiva a nivel mundial, es importante monitorear su seguridad, incluyendo eventos adversos, y eficacia terapéutica en los pacientes (Joas *et al.*, 2021). Actualmente existen en el mercado cuatro diferentes clases de antidepresivos: inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO), compuestos tricíclicos, antidepresivos atípicos, y los de segunda generación. En esta última se encuentran los inhibidores de la recaptura de neurotransmisores como noradrenalina, dopamina o serotonina (Blier, 2001). Entre los eventos adversos más comunes de esta clase terapéutica se encuentran los efectos gastrointestinales y sobre el sistema nervioso central, *i.e.*, insomnio, cefalea y disfunción sexual.

El clorhidrato de fluoxetina es un antidepresivo del tipo de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI). Está indicado para el tratamiento de la depresión, la depresión con ansiedad asociada, depresión en niños y adolescentes, así como para el tratamiento de obsesiones y compulsiones en pacientes con trastorno obsesivo compulsivo (TOC) y con bulimia nerviosa. Además, está indicado para el tratamiento del trastorno disfórico premenstrual y para trastorno de pánico con o sin agorafobia (Company, 2006; PLM, 2016). La dosis recomendada de clorhidrato de fluoxetina es de 20 mg y la dosis máxima al día es de 60 mg. Las dosis por arriba de 80 mg/día no han sido evaluadas en forma sistemática. En todas las indicaciones, la dosis recomendada puede aumentarse o disminuirse.

La fluoxetina se absorbe bien después de su administración oral con una biodisponibilidad alrededor de 90%. El efecto de los alimentos sobre la absorción de fluoxetina es clínicamente insignificante, retrasando su absorción sin disminuirla. Alcanza su concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) en plasma entre 6 y 8 horas, es altamente lipofílica y se une a proteínas plasmáticas en alrededor del 94.5%. Se distribuye ampliamente, con un volumen de distribución de 1000 a 7200 L (20-42 L/Kg). Se alcanzan concentraciones estables en plasma después de su administración por entre 3 y 4

semanas (“Approved Labeling Enclosure. PROZAC® FLUOXETINE HYDROCHLORIDE,” n.d.). Las concentraciones estables en plasma después de su administración por tiempo prolongado son similares a las concentraciones observadas a las 4 o 5 semanas (DrugBank, 2021; Micromedex, 2016).

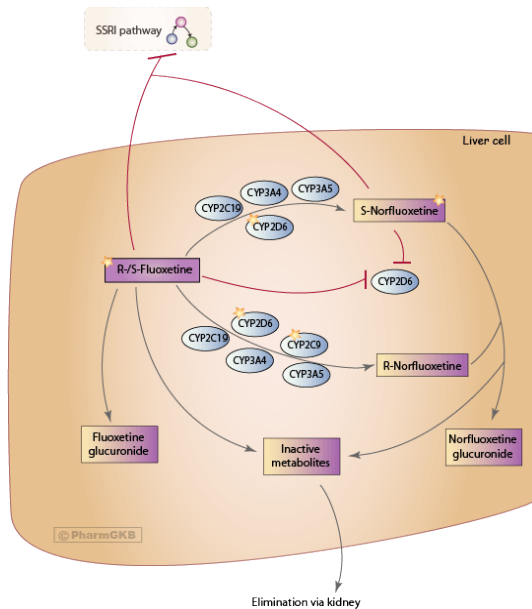


Figura 1. Ruta metabólica del fármaco clorhidrato de fluoxetina (PharmGKB, 2021).

La fluoxetina es metabolizada a norfluoxetina en el hígado por los citocromos CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, y CYP3A5 (Fig. 1). De manera estereoselectiva, se biotransforma por los CYP2D6, CYP2C9, y CYP2C19 (Deodhar, Rihani, Darakjian, Turgeon, & Michaud, 2021; Liu et al., 2002). El metabolito norfluoxetina es farmacológicamente activo, con potencia similar al compuesto padre (Company, 2006; Micromedex, 2016; Sangkuhl, 2012). Estudios poblacionales han demostrado que la exposición a fluoxetina cuantificada a través del área bajo la curva (ABC) no sigue una distribución normal, identificándose dos

subpoblaciones diferentes, metabolizadores lentos y metabolizadores normales (Moraes *et al.*, 1999). Sus parámetros farmacocinéticos son distintos entre las dos subpoblaciones, lo cual se infiere que está relacionado con el metabolismo del fármaco: los metabolizadores normales con respecto a la actividad de *CYP2C19* presentaron menores niveles máximos de fluoxetina después de una dosis de 40 mg y mayores niveles de norfluoxetina que los metabolizadores lentos, con las variantes *CYP2C19*2* o *CYP2C19*3*. No hubo cambio en la vida media de eliminación de norfluoxetina entre los subgrupos (Kandasamy *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 1999; Najib *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2010).

Adicionalmente, variantes genéticas en los citocromos *CYP2D6* y *CYP2C9* alteran las concentraciones plasmáticas del fármaco o el metabolito, repercutiendo en la respuesta terapéutica, con hasta un 40% de pacientes no respondedores a la terapia habitual con fluoxetina (Blazquez, Mas, Plana, Lafuente, & Lazaro, 2012; Gassó et al., 2014).

La principal vía de eliminación de fluoxetina es la renal (60%), y sólo de un 2.5 a 5% de la dosis oral es recuperada como fármaco sin cambios, mientras que el 10% es excretado como norfluoxetina libre. Los metabolitos conjugados, glucurónido de fluoxetina y glucurónido de norfluoxetina representan entre 5 a 10% de la dosis, excretándose un 12% en heces (DrugBank, 2021; Micromedex, 2016). La vida media de eliminación de fluoxetina es de 4 a 6 días y la de su metabolito activo es de 4 a 16 días (DrugBank, 2021; Micromedex, 2016; PLM, 2016). Sin embargo, en metabolizadores rápidos (extensivos) el tiempo de vida media fue de 30.9 h, con $t_{\text{máx}}$ entre 5.5 y 6.3 horas. Adicionalmente, por ser un sustrato de alta afinidad a CYP2D6 e inhibidor por mecanismo competitivo, la exposición crónica a fluoxetina pueden extender la vida media plasmática del fármaco y metabolitos por inhibición de su propio metabolismo hasta 8 y 19.3 días, respectivamente (Alfaro, Lam, Simpson, & Ereshefsky, 2000; Deodhar *et al.*, 2021; van Harten, 1993).

El mecanismo de inhibición de su propio metabolismo explica la larga vida media y altas concentraciones plasmáticas persistentes de fluoxetina sin unión a proteínas plasmáticas en dosis repetidas. La inhibición de CYP2D6 por fluoxetina se ha asociado con alteraciones farmacocinéticas cuando se administran concomitantemente otros medicamentos, generando interacciones medicamentosas. Los citocromos CYP2C19, CYP2C9 y CYP3A4 son relevantes en el metabolismo pacientes con exposición crónica a fluoxetina, por la inhibición del CYP2D6 por el fármaco inalterado y su metabolito, y se ha reportado que fluoxetina también inhibe a estos citocromos adicionales (Deodhar *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2002).

Respecto a su farmacodinamia, la fluoxetina incrementa las concentraciones de serotonina debido a que es un potente inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina en la membrana neuronal. Los SSRI tienen menos efectos sedativos, anticolinérgicos y cardiovasculares que los antidepresivos tricíclicos, como la imipramina. Además, fluoxetina ha demostrado producir poco efecto en el sistema noradrenérgico, por tener poca afinidad a los receptores muscarínicos, histamínicos H1, dopaminérgicos, serotoninérgicos 5HT1 o 5HT2, o noradrenérgicos alfa-1 o alfa-2 y GABA (Moraes *et al.*, 1999). Se han asociado diversas variantes genéticas al efecto de los SSRI, tanto en su respuesta terapéutica como en eventos adversos, entre ellos en los genes codificantes

de los receptores y enzimas *ABCB1*, *SLC6A4*, *HTR1A*, *HTR2A*, *HTR3B*, *TPH*, *BDNF*, y la subunidad beta 3 de la proteína G (Hicks *et al.*, 2015). A continuación, se describen algunos de estos:

- *ABCB1 (MDR1)*: Gen de resistencia a múltiples fármacos. Codifica una glicoproteína P transportadora de la barrera hematoencefálica con un papel importante en el control del paso de sustancias hacia el cerebro, cuyo impacto en la farmacocinética está directamente relacionado con la farmacodinamia y posterior respuesta (Cacabelos, 2015). Sus variantes genéticas se han asociado con respuestas variables a antidepresivos, como paroxetina (Kato *et al.*, 2008; Zheng, Fu, Chen, Wang, & Zhu, 2021).
- *SLC6A4*: Gen codificante para el transportador de serotonina (*5HTT* o *SERT*), también denominado *Solute carrier family 6 member 4*. Este gen se ha asociado con respuesta a antidepresivos de tipo SSRI, como sertralina o fluvoxamina, aunque con evidencia clínica baja o nula (nivel 3 o 4, ver *sección 1.c*) (Niitsu, Fabbri, Bentini, & Serretti, 2013; PharmGKB, 2021d).
- *TPH1*: Gen codificante para la enzima triptófano hidroxilasa 1, la cual es la enzima limitante en la biosíntesis de serotonina y blanco de los SSRI. A pesar de que su mecanismo es aún poco comprendido, algunas de sus variantes genéticas se les ha relacionado con el trastorno depresivo y respuesta a antidepresivos, como citalopram, en población asiática (Ham *et al.*, 2007; H.-C. Wang *et al.*, 2011).
- *COMT*: Gen codificante de la enzima catecol *O*-metiltransferasa, relacionada con el efecto de los SSRI en pacientes con depresión. La variante funcional Val^{108/158}Met altera la función enzimática, generando una distribución trimodal de la actividad de COMT en eritrocitos, linfocitos y hepatocitos. No obstante, hay resultados inconsistentes de COMT, ya que una actividad elevada de la enzima genera un decremento de neurotransmisores de catecolamina, lo cual estimula la mayor respuesta de los SSRI, presentándose un efecto paradójico (Ji *et al.*, 2012)
- *MAOA* y *MAOB*: Las enzimas mitocondriales de la familia de la monoaminoxidasa son blancos importantes de los antidepresivos, siendo una inhibición irreversible la que causa el efecto en esta clase de medicamentos psicoactivos (Finberg & Rabey, 2016),

interfiriendo con la degradación de aminas biógenas. Se ha encontrado una asociación género-dependiente de un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) con la acción terapéutica de fluoxetina, variante genética que también podría estar relacionada con la patogénesis de trastorno depresivo mayor en pacientes chinos (Yu *et al.*, 2005).

1.d. Farmacogenética

Los efectos de los medicamentos a nivel terapéutico, toxicológico y de eventos adversos empezaron a ser relacionados con variantes genéticas a partir de la década de 1950 (Alfirevic & Pirmohamed, 2017; Pirmohamed, 2001; Roses, 2000). Existen diversos consorcios y esfuerzos internacionales que han contribuido con el ámbito de la farmacogenómica, organizando la información y describiendo genes *accionables* o con efectos relacionados con farmacocinética, farmacodinamia o seguridad de algún medicamento específico (*tabla 1*).

El Consorcio de Implementación de Farmacogenética Clínica (CPIC, por sus siglas en inglés) ha analizado el conocimiento clínico de variantes genéticas asociadas a fármacos a través de un sistema de anotación clínica (PharmGKB, 2021c). Se ha ponderado el nivel de evidencia como a continuación se describe (PharmGKB, 2021a; Relling & Klein, 2011):

- *Nivel 1*: Evidencia alta, obtenida de resultados consistentes de estudios con diseño y conducción adecuada.
 - o *Nivel 1A*: Guía de CPIC o de sociedad médica.
 - o *Nivel 1B*: Resultados replicados en más de una cohorte con significancia estadística y tamaño del efecto grande.
- *Nivel 2*: Evidencia moderada, suficiente para determinar un efecto clínico, pero su poder está limitado por número, calidad o consistencia de los estudios individuales, lo cual imposibilita su generalización en la práctica rutinaria.
 - o *Nivel 2A*: Nivel 2B en un gen clínicamente relevante.
 - o *Nivel 2B*: Resultado replicado en varios estudios, pero no en todos los casos ha sido significativo o se ha obtenido un efecto pequeño.

- *Nivel 3: Evidencia baja.* Evidencia a partir de un único estudio o en caso de tener múltiples evidencias, no hay una asociación clara.
- *Nivel 4: Evidencia sin soporte.* Solo resultados aislados y/o estudios *in vitro* que sugieren la utilidad clínica del farmacogén.

Para algunas variantes en genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos, ya sean fármacos, drogas o compuestos tóxicos, se han clasificado a los individuos de acuerdo con un índice metabólico, el cual discrimina a las personas de acuerdo con su capacidad metabólica de los CYP (Lazalde Ramos, 2012). Los metabolizadores lentos o pobres son quienes no tienen la funcionalidad enzimática, debido a una ausencia o defecto en la copia del gen. Los metabolizadores intermedios tienen una copia del gen funcional y una defectuosa, o dos alelos parcialmente defectuosos. Los rápidos o extensivos cuentan con dos copias activas del gen. Finalmente, los ultrarrápidos usualmente tienen más de dos copias activas del gen (Tamási & Falus, 2012). De acuerdo con esta clasificación, los metabolizadores lentos podrían presentar eventos adversos o toxicidad ante la dosis habitual de un tratamiento, mientras que los metabolizadores ultrarrápidos podrían no presentar efecto biológico (G. Wang *et al.*, 2009), y por ende, fracaso terapéutico con la misma dosis.

Tabla 1. Grupos de trabajo internacionales en el tema de guías prácticas de farmacogenética.

| | Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) | Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) | Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety (CPNDS) | French National Network of Pharmacogenetics (RNPgX) |
|--------------------------------|--|--|--|--|
| País de origen | EUA | Holanda | Canadá | Francia |
| Recomendaciones / Guías | 106 / 24 guías | 60 | 13 | 8 |
| Enfoque general | Base genética y mecanística de la respuesta a fármacos para mejorar seguridad y eficacia | | | |
| Detalles | Método Delphi con comités de expertos | Enfoque en farmacocinética de principios activos | Involucramiento con pacientes y otros tomadores de decisiones | Comité de expertos por invitación |

(Abdullah-Koolmees, van Keulen, Nijenhuis, & Deneer, 2021)

Estos esfuerzos por organizar y categorizar la información farmacogenómica han derivado en regulaciones en materia de medicamentos. A la fecha, la FDA tiene listados 365 productos farmacéuticos con recomendaciones de incluir en su etiqueta información relacionada con la farmacogenética del medicamento, con un total de 541 variantes genéticas humanas/biomarcadores asociados (FDA, 2023). Dicha información en el etiquetado incluye alertas sobre dosis y administración, contraindicaciones, interacciones medicamentosas, reacciones adversas a medicamentos, uso en poblaciones especiales, e información farmacogenética adicional obtenida de estudios farmacológicos.

2. Justificación e hipótesis

La generación de información cuantitativa y confirmatoria sobre la diversidad genética de las enzimas metabolizadoras, como la familia del citocromo P450, en población mexicana permitirá tener avances en la terapéutica farmacológica personalizada, así como en la reducción de eventos adversos y de toxicidad, ante las dosis convencionalmente administradas. Existen ejemplos de estudios farmacológicos ligados a genética, como el de la hidralazina en combinación con valproato de magnesio (Garcés-Eisele *et al.*, 2014). Mediante reposicionamiento terapéutico de los dos principios activos (Candelaria *et al.*, 2007), este fue el primer caso de éxito con el que fue posible establecer presentaciones farmacéuticas distintas para acetiladores rápidos y lentos (Alpharma, 2016), por lo cual se recomienda la genotipificación de la *N*-acetiltransferasa (*NAT2*) en pacientes para determinar la dosis a recibir de este tratamiento.

A pesar de estar ya descritas algunas variantes genéticas para los CYP (Sim & Gaedigk, 2016) y de que hay registros con evidencias de variabilidad metabólica inter-étnica en estudios con sujetos mexicanos (Palma-Aguirre, González-Llaven, Flores-Murrieta, & Castañeda-Hernández, 1997), la relevancia científica de este proyecto responde a la necesidad de contribuir con estudios cuantitativos detallando el efecto de variantes genéticas en la farmacocinética de sujetos sanos y pacientes mexicanos, lo cual también se ha estudiado en otros países (González-Vacarezza *et al.*, 2012). Algunos estudios alrededor de esta temática en México (Carrasco Portugal, 2008) se han enfocado en el establecimiento de las frecuencias alélicas de variantes genéticas (Dorado *et al.*, 2011; Reyes-Hernandez *et al.*, 2008; Sosa-Macías *et al.*, 2006). También se han investigado el éxito terapéutico y ajustes de dosis de fármacos con alta variabilidad farmacológica o de estrecho margen terapéutico, como simvastatina o abacavir; inmunosupresores, como tacrolimus (Jacobo-Cabral *et al.*, 2015) y tamoxifeno; anticoagulantes, como warfarina; y antineoplásicos, como aquellos con la tiopurina metiltransferasa como blanco biológico (GBCGroup, 2015).

Con este proyecto se contribuye con un análisis y cuantificación del impacto del genotipo en la farmacocinética, para sustentar su utilidad posterior en el planteamiento y conducción de estudios de bioequivalencia en México. Específicamente, se aporta información a reportes donde se describen tasas de metabolismo distintas para fluoxetina, como son individuos en subgrupos

de metabolizadores pobres, intermedios, rápidos y ultra-rápidos (Blazquez *et al.*, 2012; Sagahón-Azúa *et al.*, 2021). Adicionalmente, se ha planteado en la literatura médica que los tratamientos psiquiátricos puedan ser ajustados de acuerdo con el genotipo (de Leon, 2006), dado un porcentaje de entre 30 y 40% de pacientes que no alcanzan la eficacia esperada del tratamiento con fluoxetina (Gassó *et al.*, 2014), por lo que este estudio aporta conocimiento farmacocinético y farmacogenético relevante.

En el estudio de bioequivalencia realizado para este proyecto, la hipótesis fue que ambos medicamentos en investigación (fluoxetina de prueba y la referencia PROZAC® 20) son bioequivalentes, ya que no hubo diferencias significativas al comparar estadísticamente los parámetros farmacocinéticos para evaluar su biodisponibilidad ($C_{máx}$ y ABC). Adicionalmente, sobre el genotipo se hipotetizó que variantes genéticas en genes como *CYP3A4*, *CYP2D6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, entre otros, influyen en la variabilidad intrasujeto de los parámetros farmacocinéticos $C_{máx}$ y ABC en sujetos sanos. Por lo tanto, el control del genotipo en los estudios de biodisponibilidad comparativa reducirá la variabilidad biológica y, por ende, el tamaño de muestra requerido, además de que permitirá una mejor caracterización de la farmacocinética de los sujetos mexicanos participantes en estudios de bioequivalencia.

3. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar el impacto de variantes relevantes en la farmacocinética de medicamentos, en el marco de los estudios de biodisponibilidad comparativa (bioequivalencia).

Objetivos específicos:

- Determinar la bioequivalencia de clorhidrato de fluoxetina cápsulas con 20 mg entre el medicamento de prueba y de referencia PROZAC® 20 en sujetos sanos.
- Genotipificar 54 variantes de 12 genes relacionados con la farmacocinética de fluoxetina en 24 sujetos mexicanos.
- Desarrollar modelos estadísticos para identificar posibles asociaciones entre variantes genéticas y los parámetros farmacocinéticos $C_{máx}$, ABC y de eliminación para evaluar su efecto en la farmacocinética de fluoxetina.
- Estimar el efecto cuantitativo de las variantes farmacogenéticas en la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos en el estudio clínico de bioequivalencia con clorhidrato de fluoxetina mediante modelos de regresión múltiple.

4. Materiales y métodos

El protocolo del estudio clínico con fines de bioequivalencia fue aprobado por los comités de ética institucional y de ética en investigación del tercero autorizado *Axis Clinicals Latina (ACL)* en agosto del 2016 (*Anexo 9.b*). Posteriormente, el área de Protocolos Clínicos de la Comisión de Autorización Sanitaria (CAS) de COFEPRIS revisó y autorizó el protocolo el día 27 de septiembre de 2016, con el folio 163300410B0384/2016 (*Anexo 9.c*).

El protocolo de bioequivalencia, aprobado por comités de ética, investigación y COFEPRIS con código ACL16-PC019, se evaluó por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) para el trabajo con muestras para la fase farmacogenética, el cual fue aprobado el 30 de marzo de 2017 (*Anexo 9.b*). El procesamiento de la información genética se realizó bajo consentimiento informado de los voluntarios y con las consideraciones bioéticas necesarias para el manejo de ADN (*Anexo 9.d*).

En apego a la normatividad en materia de intercambiabilidad y bioequivalencia, las muestras biológicas no fueron utilizadas con fines de clonación ni para la obtención de líneas celulares permanentes ni inmortales, tal como se establece en el dictamen aprobatorio de COFEPRIS. La genotipificación de los voluntarios se realizó en el marco de este protocolo para analizar las variantes genéticas en enzimas relacionadas con el metabolismo y efecto de fármacos. La determinación de perfiles genéticos individuales para obtener datos sobre predisposición a enfermedades está fuera del alcance de este proyecto.

4.a. Estudio de bioequivalencia y conducción clínica

Se realizó un estudio clínico experimental para comparar la biodisponibilidad entre dos formulaciones orales de clorhidrato de fluoxetina en cápsulas con 20 mg, planeado en 26 sujetos voluntarios sanos, adultos, de ambos géneros, para determinar bioequivalencia basado en la NOM-177-SSA1-2013. El estudio fue abierto para la Unidad Clínica, cegado para la Unidad Analítica, de dosis única, por vía oral con deglución, bajo condiciones de ayuno, cruzado (2 x 2), con dos tratamientos, dos periodos, dos secuencias, con asignación al azar de las secuencias. El periodo de lavado fue de 8 semanas entre cada dosis para asegurar la eliminación del producto, lo cual cubrió al menos 9 vidas medias de lavado, por una vida media reportada para fluoxetina entre 4 y 6 días.

El tamaño de muestra se calculó en apego a la normatividad mexicana correspondiente para estudios de bioequivalencia (NOM-177-SSA1-2013). Se obtuvieron datos para la estimación del coeficiente de variación intrasujeto del parámetro farmacocinético $C_{m\acute{a}x}$ en 17.98% para clorhidrato de fluoxetina, derivado de una experiencia favorable de bioequivalencia con tabletas con 20 mg en 30 voluntarios sanos (EMA, 2005). Dicho valor calculado se encontró congruente con los resultados de variabilidad obtenidos en otros estudios, con coeficientes de variación intrasujeto de 17.83% para $C_{m\acute{a}x}$ y 17.85% para ABC_{0-t} (Moraes *et al.*, 1999), y de 17.14% y 17.7% para ambos parámetros farmacocinéticos mencionados (Jovanović *et al.*, 2006).

La estimación fue realizada con el programa bear, BE/BA for R (H. Y. Lee & Lee, 2016), del entorno R, que utiliza las siguientes ecuaciones (Julious, 2004):

$$1 - \beta = \text{Probt}(-t_{1-\alpha, n-2}, n-2, \tau_2) - \text{Probt}(t_{1-\alpha, n-2}, n-2, \tau_1)$$

Donde:

$$\tau_1 = \frac{\sqrt{n}(\log(\mu_T/\mu_R) - \log(0.80))}{\sqrt{2\sigma_w^2}} \quad \text{y} \quad \tau_2 = \frac{\sqrt{n}(\log(\mu_T/\mu_R) - \log(1.25))}{\sqrt{2\sigma_w^2}}$$

μ_T/μ_R : Cociente de las medias geométricas del producto de prueba/referencia.

Probt: Es la probabilidad de la distribución t de una cola para $1-\alpha$, $n-2$ grados de libertad.

α : Error alfa de 0.05.

β : Error beta de al menos 0.10 (Potencia = 90%).

σ_w^2 : Coeficiente de variación intrasujeto para el parámetro farmacocinético más variable ($C_{m\acute{a}x}$: 17.98%).

(80% - 125%) = Corresponde a una diferencia por detectar de 20% transformada logarítmicamente.

95% = Cociente esperado entre productos (prueba/referencia).

Se consideró un error tipo II de 0.10, asociado a una potencia estadística de mínimo 90%, mayor a la mínima aceptable de 80% para que en caso de que la formulación no resultara bioequivalente, tener la certeza de que dicho resultado no se deba a un deficiente número de voluntarios por una subestimación de la variabilidad intrasujeto. El cálculo resultó en un tamaño de muestra de al menos 22 sujetos, los cuales serían suficientes para satisfacer las condiciones de error y diferencia por detectar para la variabilidad intrasujeto del $C_{m\acute{a}x}$. Se justificaron 4 voluntarios excedentes por posibles abandonos por decisiones personales, criterios de eliminación, manifestación de eventos adversos después de la administración de clorhidrato de fluoxetina y/o

por el largo tiempo de lavado del estudio (8 semanas). Por lo tanto, el tamaño de muestra total planeado fue de 26 (22+4) voluntarios sanos.

Los sujetos de investigación se aleatorizaron a cada secuencia de tratamientos, para que en cada periodo se les administrara el tratamiento de prueba o de referencia. La secuencia 1 fue Referencia → Prueba, y la secuencia 2 Prueba → Referencia. Los tiempos de muestreo sanguíneo de los voluntarios para este estudio con clorhidrato de fluoxetina se realizaron para cada periodo a las 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0, 24.0, 48.0 y 72.0 horas después de la administración del medicamento.

Durante la conducción clínica del estudio, el área de procesamiento de las muestras biológicas permaneció cegado durante la inspección física de las mismas de acuerdo con los procedimientos normalizados de operación de la unidad clínica de ACL. Las muestras de sangre, colectadas en tubos con heparina sódica, se centrifugaron inmediatamente a 3,500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma, a una temperatura entre 2 y 15°C. El plasma se pipeteó a tubos criogénicos etiquetados para la determinación de fluoxetina.

Para el estudio farmacogenético, a partir de sangre se separó el paquete de glóbulos blancos en un criotubo para la extracción de ADN. Este proceso se repitió con 3 a 4 tiempos de muestreo sanguíneo en caso de poca concentración del material genético o de mala calidad.

4.b. Determinación de fluoxetina en plasma

Las concentraciones plasmáticas de fluoxetina fueron determinadas por un método bioanalítico desarrollado y validado en la unidad bioanalítica del tercero autorizado ACL. Se realizó por extracción líquido-líquido y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas/masas (LC-MS/MS), con una columna fase reversa, con las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas del método bioanalítico para la determinación de fluoxetina en plasma.

| | |
|-----------------------------------|---|
| Fase móvil: | Acetonitrilo-formiato de amonio 2 mM pH 3.5 ± 0.3 (90:10 v/v) |
| Velocidad de flujo: | 0.5 mL/min |
| Columna cromatográfica: | Gemini, C18, 50 x 4.6 mm, 5 µm |
| Volumen de inyección: | 10 µL |
| Tiempo de corrida: | 3.0 minutos |
| Temperatura del automuestreador: | 10°C |
| Temperatura del horno de columna: | 35°C |

| | |
|-----------------------|---|
| Fuente de ionización: | Turbo ion spray en modo positivo (ESI ⁺), donde los iones se monitorearon por monitoreo de reacción múltiple (<i>Multiple Reaction Monitoring, MRM</i>) |
|-----------------------|---|

4.c. Análisis farmacocinético y estadístico

Se decodificaron las secuencias de administración y formulación administrada en cada periodo para cada sujeto (Secuencia 1: Referencia-Prueba, Secuencia 2: Prueba-Referencia). Se calcularon los tiempos reales de la toma de la muestra sanguínea para los voluntarios de acuerdo con los desfases reportados al muestreo planeado. Con la base de datos de concentraciones plasmáticas del principio activo contra tiempo real de la toma de muestra para cada sujeto, se calcularon los parámetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$, $t_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, así como los parámetros de eliminación tiempo de vida media ($t_{1/2}$), constante de eliminación (K_{el}) y volumen de distribución (Vd), con el software Phoenix[®] WinNonlin[®] versión 8.1 (Certara, 2017).

El análisis estadístico de bioequivalencia se realizó mediante la prueba t doble unilateral de Schuirmann para los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y ABC , aplicando el criterio de aceptación de 80.0-125.0%. Se calcularon intervalos de confianza al 90% para el cociente entre los promedios de los productos de prueba y de referencia, de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013. Se realizó un análisis para identificar valores atípicos (extremos) con base en la estimación de los residuales estudentizados intrasujeto utilizando el programa bear, BE/BA for R, (H. Y. Lee & Lee, 2016) de la plataforma R. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un modelo general lineal (GLM) convencional para un estudio cruzado de bioequivalencia, para evaluar los efectos de periodo, secuencia y formulación, según el modelo a continuación (Chow & Liu, 2008):

$$Y_{ijk} = \mu + G_k + S_{jk} + P_j + F_{(j,k)} + e_{ijk}$$

donde:

μ = Media general.

G_k = Efecto fijo de la k-ésima secuencia

S_{jk} = Efecto aleatorio del i-ésimo sujeto en la k-ésima secuencia, donde $i = 1, 2, \dots, n_k$ y $k = 1, 2, \dots, K$

P_j = Efecto fijo del j-ésimo periodo, donde $j = 1, 2, \dots, J$; y $\sum_j P_j = 0$

$F_{(j,k)}$ = Efecto fijo directo de la formulación en la k-ésima secuencia, la cual es administrada en el j-ésimo periodo y $\sum F_{(j,k)} = 0$

e_{ijk} = Error aleatorio (variabilidad intrasujeto) en la observación Y_{ijk}

4.d. Estudio farmacogenético

La fase farmacogenética del estudio se realizó en el laboratorio de Farmacogenómica del INMEGEN. Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre con el *Puregene Blood Kit* de QIAGEN, de acuerdo con las indicaciones del proveedor (QIAGEN, 2022). Se verificó la calidad y cantidad de material genético extraído mediante espectrofotometría, usando NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific), y con electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La genotipificación de 669,672 variantes se realizó con el microarreglo Infinium® Global Screening Array (GSA) 24 v1.0, personalizado con más de 22,000 variantes genéticas de relevancia clínica relacionados con la respuesta a fármacos (Illumina, 2015). De estas, más de 1,000 variantes están indizadas en la base de datos PharmGKB (PharmGKB, 2022c), con anotación clínica en eficacia, toxicidad y farmacocinética de principios activos (absorción, metabolismo y excreción). Adicionalmente, algunos marcadores farmacogenéticos están reportados en otras bases de datos clínicas y se estudiaron en los voluntarios sanos participantes en el estudio de bioequivalencia de fluoxetina. Se realizó un análisis exploratorio de los datos con el programa GenomeStudio 2.0 del proveedor Illumina (Illumina, 2023), con el cual se realizó el control de calidad, normalización y discriminación alélica de las variantes de los 24 voluntarios que concluyeron el estudio.

Los parámetros farmacocinéticos de fluoxetina calculados para cada sujeto fueron empleados como variable fenotípica continua para el análisis de asociación fenotipo-genotipo. Los modelos se generaron a partir de archivos de texto plano con las variantes genéticas (.map y .ped), variables farmacocinéticas ($C_{máx}$, ABC_{0-t} , $t_{máx}$, $t_{1/2}$, CI y tiempo medio de residencia) y covariables demográficas (Edad, género, peso, talla e IMC) con gPLINK vs2.050.

Adicionalmente se realizó un análisis de reducción de dimensiones multifactorial (MDR) para disminuir la cantidad de variantes no significativas en las variables farmacocinéticas con el software MDR (Ritchie & Motsinger, 2005). Se realizaron también análisis de componentes principales (PCA), y análisis de árboles de clasificación y regresión (CART) con el software IBM SPSS® 25, para estudiar los coeficientes cuantitativos de cada variante en la variable farmacocinética de respuesta en diferentes modelos (Fan & Liu, 2013; IBM, 2017; Pander, Wessels, Mathijssen, Gelderblom, & Guchelaar, 2010; Perez, 2004; Ritchie & Motsinger, 2005). Finalmente,

se graficaron los perfiles farmacocinéticos promedio estratificados por las variantes genéticas más significativas con el software Phoenix[®] WinNonlin v.8.1 (Gabrielsson & Weiner, 2001).

Se depuraron y seleccionaron las variantes a analizar de las enzimas de impacto para el metabolismo del antidepresivo fluoxetina, mediante la estrategia de genes candidatos. Dicha estrategia de análisis genómico preselecciona genes conocidos de interés para analizar, con el fin de evitar la multiplicidad de pruebas de hipótesis, resultando ser de utilidad para detectar genes con efectos pequeños con una adecuada potencia estadística (Hodgson, Mufti, Uher, & McGuffin, 2012).

5. Resultados

5.a. Estudio clínico para la determinación de bioequivalencia

Ingresaron al estudio 26 sujetos sanos, y 24 voluntarios lo concluyeron, ya que dos voluntarios fueron eliminados por retiro de consentimiento en el periodo 1 del estudio. Los 24 sujetos participantes (20 masculinos y 4 femeninos) tuvieron una media de edad de 33 años, en un rango que va de 19 a 50 años. La talla promedio fue de 1.65 m, mientras que el peso promedio fue de 64.8 kg y el IMC promedio de 23.8 kg/m². Segmentados por género (*Tabla 3*), no se encontró una diferencia significativa en la edad entre sujetos masculinos y femeninos ($p = 0.308$), aunque las diferencias en el peso, talla e IMC sí resultan significativas entre géneros ($p < 0.000$).

Tabla 3. Datos demográficos de los voluntarios incluidos en el estudio clínico, segmentados por género.

| Sujetos femeninos | | | | |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------|--------------------------|
| No. Vol. | Edad (años) | Peso (kg) | Talla (m) | IMC (kg/m ²) |
| 01 | 46 | 46.9 | 1.49 | 21.1 |
| 07 | 43 | 53.3 | 1.46 | 25.0 |
| 18 | 20 | 53.6 | 1.63 | 20.2 |
| 23 | 19 | 51.2 | 1.48 | 23.4 |
| Promedio | 32.00 | 51.25 | 1.52 | 22.43 |
| Desv. Estándar | 14.49 | 3.09 | 0.08 | 2.18 |
| Mínimo | 19.00 | 46.90 | 1.46 | 20.20 |
| Máximo | 46.00 | 53.60 | 1.63 | 25.00 |
| CV % | 45.29 | 6.03 | 5.13 | 9.73 |
| Sujetos masculinos | | | | |
| No. Vol. | Edad (años) | Peso (kg) | Talla (m) | IMC (kg/m ²) |
| 02 | 49 | 86.2 | 1.83 | 25.7 |
| 03 | 19 | 59.9 | 1.66 | 21.7 |
| 04 | 49 | 71.0 | 1.68 | 25.1 |
| 05 | 21 | 54.6 | 1.70 | 18.9 |
| 08 | 49 | 66.2 | 1.67 | 23.8 |
| 09 | 41 | 76.4 | 1.70 | 26.4 |
| 10 | 50 | 65.7 | 1.65 | 24.1 |
| 11 | 25 | 61.7 | 1.66 | 22.4 |
| 12 | 21 | 68.2 | 1.71 | 23.3 |
| 13 | 36 | 61.5 | 1.57 | 25.0 |
| 14 | 26 | 58.8 | 1.58 | 23.6 |
| 15 | 23 | 59.5 | 1.65 | 21.9 |
| 16 | 46 | 68.8 | 1.61 | 26.6 |
| 17 | 38 | 71.1 | 1.65 | 26.1 |

| | | | | |
|-----------------------|--------------|--------------|-------------|--------------|
| 19 | 29 | 67.7 | 1.62 | 25.8 |
| 20 | 30 | 67.4 | 1.65 | 24.8 |
| 22 | 33 | 71.7 | 1.75 | 23.4 |
| 24 | 26 | 66.7 | 1.77 | 21.3 |
| 25 | 24 | 72.4 | 1.69 | 25.4 |
| 26 | 28 | 75.1 | 1.68 | 26.6 |
| Promedio | 33.15 | 67.53 | 1.67 | 24.10 |
| Desv. Estándar | 10.76 | 7.24 | 0.06 | 2.07 |
| Mínimo | 19.00 | 54.60 | 1.57 | 18.90 |
| Máximo | 50.00 | 86.20 | 1.83 | 26.60 |
| CV % | 32.46 | 10.72 | 3.67 | 8.57 |

Se presentaron 6 reacciones adversas al medicamento (RAM) en 5 voluntarios, de las cuales 5 se relacionaron con la administración del medicamento de referencia y una con el medicamento de prueba. Las RAM fueron de severidad leve y moderada a criterio médico: 4 con probable relación con el medicamento por haberse presentado alrededor del valor reportado de $t_{m\acute{a}x}$ entre las 6-8 h (mareo, cefalea, odinofagia y faringitis en los sujetos 7, 10, 13 y 19), una con dudosa relación con el medicamento (dolor lumbar en el sujeto 1), la cual se presentó en el egreso del periodo 1, y una fue determinada como no evaluable-inclasificable (cefalea en el sujeto 7), presentada en el ingreso del periodo 2.

5.b. Determinación de fluoxetina en plasma

Para realizar la evaluación de bioequivalencia, las concentraciones plasmáticas de fluoxetina fueron determinadas mediante un método bioanalítico validado con un protocolo en apego a las Buenas Prácticas de Laboratorio y a lo requerido por la NOM-177-SSA1-2013. Las curvas de calibración fueron analizadas con un rango de concentración de 0.200 a 49.169 ng/mL, y las muestras de control a concentraciones de 0.598, 20.467 y 37.513 ng/mL. Se empleó paroxetina como estándar interno (EI). Los parámetros de validación se resumen en la *tabla 4*, confirmando que se cumple con los criterios de validación establecidos en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 4. Parámetros de validación del método bioanalítico para la determinación de fluoxetina en plasma.

| Parámetro de validación | Criterio de la NOM-177-SSA1-2013 | Resultado de la validación del estudio |
|--|--|--|
| Efecto de acarreo | % acarreo en TR del analito < 20% % acarreo en TR del EI < 5% | 0.4% para el TR de fluoxetina 0.0% para el TR de EI |
| Linealidad del método | Coefficiente de correlación (r) \geq 0.98 | 0.99984 |
| Repetibilidad | CV \leq 15% | CV: 0.7% - 2.4% |
| Exactitud intra-día | DA \leq 15% | DA: 0.5% - 4.4% |
| Repetibilidad del LIC (0.201 ng/mL) | CV \leq 20% DA \leq 20% | CV: 3.2% DA: 6.4% |
| Efecto de dilución 1:2 | CV \leq 15% | CV: 1.5% DA: 10.3% |
| Efecto de dilución 1:4 | DA \leq 15% | CV: 0.9% DA: 10.2% |
| Reproducibilidad (analista 1) | CV \leq 15% | CV: 4.6% - 5.9% |
| Exactitud inter-día | DA \leq 15% | DA: 0.4% - 2.7% |
| Reproducibilidad del LIC (0.201 ng/mL) | CV \leq 20% DA \leq 20% | CV: 4.4% DA: 0.2% |
| Reproducibilidad (analista 2) | CV \leq 15% | CV: 2.2% - 3.6% |
| Exactitud inter-día | DA \leq 15% | DA: 1.6% - 7.3% |
| Reproducibilidad del LIC (0.201 ng/mL) | CV \leq 20% DA \leq 20% | CV: 8.0% DA: 8.2% |
| Selectividad | No deben presentarse interferencias en el tiempo de retención del analito de interés, ni en el del estándar interno. | Los componentes endógenos de la matriz biológica y los fármacos evaluados por ser posibles medicamentos concomitantes (ácido salicílico, metamizol, ketorolaco, paracetamol y ondansetrón) no interfieren en el análisis de fluoxetina ni del EI |
| Recobro fluoxetina | Recobro constante en todo el intervalo CV \leq 15% | CV: 3.6% |
| Recobro paroxetina | | CV: 6.4% |
| Estabilidad a temperatura ambiente | CV \leq 15% DA \leq 15% | Estable durante 18.00 h CV: 1.6% - 1.9% DA: 0.1% - 4.1% |
| Estabilidad en el automuestreador | | Estable durante 42.37 h CV: 0.9% - 3.2% DA: 2.8% - 6.6% |
| Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación | | Estable durante cinco ciclos CV: 0.3% - 2.1% DA: 0.3% - 4.4% |
| Estabilidad de la muestra procesada evaporada en refrigeración | | Estable durante 47.00 h CV: 0.8% - 3.7% DA: 1.6% - 4.9% |
| Estabilidad en sangre total humana | | Fluoxetina y EI estables por 2.33 h CV: 2.2 - 2.7% Estabilidad: 99.8% |
| Efecto de reinyección | CV \leq 15% DA \leq 15% | 23.82 h CV: 1.1% - 4.0% DA: 1.6% - 5.1% |

| Parámetro de validación | Criterio de la NOM-177-SSA1-2013 | Resultado de la validación del estudio |
|--|---|--|
| Efecto de matriz | CV < 15% | MC baja CV: 7.0% MC alta CV: 5.6% |
| Hemólisis | CV ≤ 15% DA ≤ 15% | CV: 0.8% - 3.1% DA: 2.2% - 8.8% |
| Estabilidad de la solución stock a corto plazo | DA ≤ 10% | Fluoxetina y El estables por 20.92 h DA: 0.0% |
| Estabilidad de la solución trabajo a corto plazo | | Fluoxetina y El estables por 19.50 h DA: 0.2% - 1.2% |
| Estabilidad de la solución stock a largo plazo | | Fluoxetina y El estables por 9 días DA: 1.6% - 3.0% |
| Estabilidad a largo plazo | CV ≤ 15% DA ≤ 15% respecto a las condiciones originales | Estable por 9 días CV: 1.4% - 5.2% DA: 3.8% - 4.4% |

CV: coeficiente de variación, El: estándar interno, DA: desviación absoluta, LIC: límite inferior de cuantificación, MC: muestra control, TR: tiempo de retención.

5.c. Análisis farmacocinético y estadístico de bioequivalencia

En la *figura 2* se muestra el resumen de los perfiles farmacocinéticos individuales para las formulaciones (prueba y referencia), mientras que los perfiles farmacocinéticos individuales se incluyen en el *anexo 9.e*. El perfil farmacocinético promedio para cada formulación se muestra en la *figura 3*.

En el análisis farmacocinético de fluoxetina (*Tabla 5*), los promedios de $t_{m\acute{a}x}$ fueron de 4.42 h y 4.25 h ($p = 0.75$), mientras que la $C_{m\acute{a}x}$ promedio fue de 16.25 ng/mL y 15.92 ng/mL ($p = 0.63$), para los tratamientos de prueba y de referencia. Por otro lado, los promedios de ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ fueron 411.64 h*ng/mL y 556.06 h*ng/mL, para el tratamiento de prueba, y de 398.19 h*ng/mL y 542.43 h*ng/mL para el tratamiento de referencia ($p = 0.64$, $p = 0.56$). El tiempo de vida media se calculó en 30.71 h y 31.32 h ($p = 0.42$) para los medicamentos de prueba y de referencia, mientras que se estimó un volumen de distribución (Vd) de 1858.28 L y 1947.61 L ($p = 0.26$), con una depuración (Cl) de 47.32 L/h y 49.21 L/h ($p = 0.34$) ($K_{el} * Vd$) para cada tratamiento analizado en el presente estudio farmacocinético.

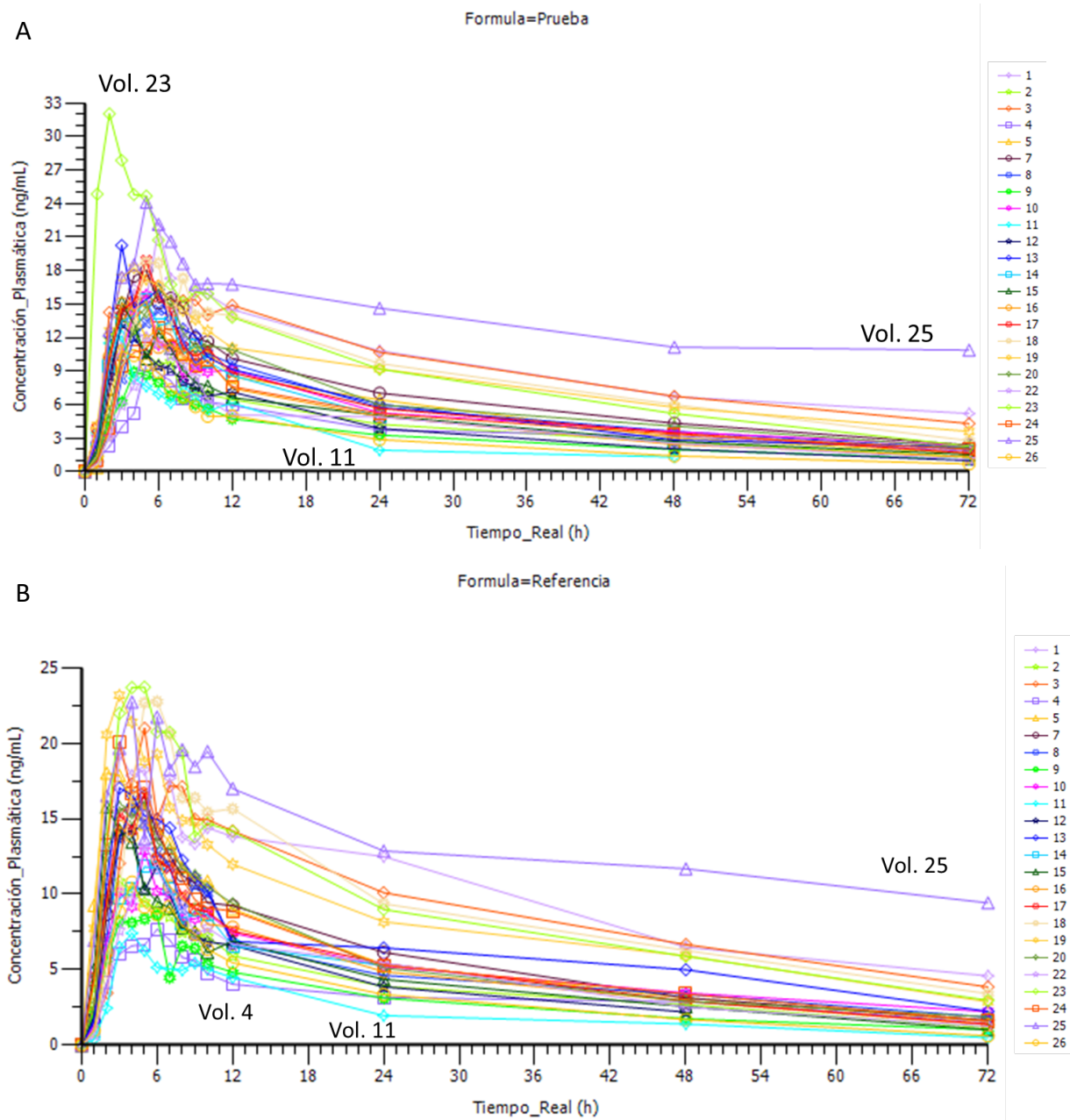


Figura 2. Perfiles farmacocinéticos individuales (concentración plasmática de fluoxetina contra tiempo) de los medicamentos de prueba (A) y referencia (B).

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos individuales de fluoxetina.

| Sujeto | Secuencia | Prueba | | | | | | | | Referencia | | | | | | | |
|-------------------------|-----------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|--------------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|---------------|
| | | C _{máx} | ABC _{0-t} | ABC _{0-∞} | t _{máx} | t _{1/2} | Vd | K _{el} | Cl | C _{máx} | ABC _{0-t} | ABC _{0-∞} | t _{máx} | t _{1/2} | Vd | K _{el} | Cl |
| 1 | 1 | 21.77 | 665.36 | 944.61 | 6.00 | 37.24 | 1137.47 | 0.02 | 21.17 | 19.24 | 678.45 | 915.85 | 3.00 | 35.89 | 1130.71 | 0.02 | 21.84 |
| 2 | 2 | 13.83 | 295.70 | 344.96 | 3.00 | 26.45 | 2212.10 | 0.03 | 57.98 | 10.85 | 274.78 | 316.33 | 3.00 | 24.91 | 2272.49 | 0.03 | 63.23 |
| 3 | 2 | 17.58 | 656.51 | 882.20 | 5.00 | 36.45 | 1192.09 | 0.02 | 22.67 | 20.99 | 628.97 | 809.15 | 5.00 | 32.38 | 1154.66 | 0.02 | 24.72 |
| 4 | 1 | 9.60 | 268.31 | 361.57 | 5.00 | 35.35 | 2820.70 | 0.02 | 55.31 | 7.68 | 230.55 | 329.15 | 6.00 | 44.26 | 3880.10 | 0.02 | 60.76 |
| 5 | 2 | 14.54 | 370.91 | 429.55 | 4.00 | 24.79 | 1665.08 | 0.03 | 46.56 | 18.03 | 396.11 | 457.89 | 2.00 | 27.19 | 1713.46 | 0.03 | 43.68 |
| 7 | 1 | 18.02 | 461.90 | 562.35 | 5.00 | 29.39 | 1507.97 | 0.02 | 35.57 | 16.44 | 389.05 | 449.17 | 5.00 | 25.29 | 1624.38 | 0.03 | 44.53 |
| 8 | 2 | 14.46 | 385.01 | 475.17 | 6.00 | 31.39 | 1905.91 | 0.02 | 42.09 | 15.68 | 345.59 | 437.44 | 4.00 | 34.23 | 2257.83 | 0.02 | 45.72 |
| 9 | 1 | 8.92 | 217.37 | 265.38 | 4.00 | 30.42 | 3307.49 | 0.02 | 75.36 | 8.63 | 210.89 | 255.81 | 6.00 | 30.14 | 3399.63 | 0.02 | 78.18 |
| 10 | 2 | 15.84 | 371.93 | 506.00 | 5.00 | 40.32 | 2299.01 | 0.02 | 39.53 | 12.85 | 345.33 | 470.59 | 5.00 | 39.05 | 2394.62 | 0.02 | 42.50 |
| 11 | 1 | 12.14 | 171.86 | 200.73 | 3.00 | 15.42 | 2216.11 | 0.04 | 99.64 | 7.42 | 157.33 | 171.14 | 4.00 | 19.25 | 3246.42 | 0.04 | 116.87 |
| 12 | 2 | 13.24 | 269.72 | 304.14 | 3.00 | 24.32 | 2307.71 | 0.03 | 65.76 | 14.23 | 239.53 | 310.17 | 4.00 | 22.37 | 2080.95 | 0.03 | 64.48 |
| 13 | 1 | 20.25 | 401.55 | 485.71 | 3.00 | 26.91 | 1598.54 | 0.03 | 41.18 | 17.03 | 440.02 | 538.13 | 3.00 | 30.46 | 1632.96 | 0.02 | 37.17 |
| 14 | 2 | 15.37 | 296.70 | 370.13 | 5.00 | 19.93 | 1553.58 | 0.03 | 54.04 | 11.81 | 168.42 | 341.88 | 5.00 | 22.76 | 1921.08 | 0.03 | 58.50 |
| 15 | 2 | 15.13 | 322.48 | 383.78 | 3.00 | 28.03 | 2107.47 | 0.02 | 52.11 | 15.79 | 301.81 | 335.49 | 2.00 | 23.03 | 1980.33 | 0.03 | 59.61 |
| 16 | 1 | 15.25 | 330.89 | 377.82 | 5.00 | 24.99 | 1908.07 | 0.03 | 52.93 | 16.05 | 338.47 | 386.55 | 5.00 | 24.58 | 1834.77 | 0.03 | 51.74 |
| 17 | 2 | 18.90 | 396.98 | 458.70 | 5.00 | 25.80 | 1623.06 | 0.03 | 43.60 | 16.69 | 353.78 | 403.83 | 5.00 | 24.87 | 1776.95 | 0.03 | 49.53 |
| 18 | 1 | 18.76 | 577.69 | 686.16 | 5.00 | 27.17 | 1142.58 | 0.03 | 29.15 | 22.77 | 624.48 | 762.94 | 6.00 | 28.19 | 1066.01 | 0.02 | 26.21 |
| 19 | 2 | 18.24 | 572.51 | 755.65 | 4.00 | 35.36 | 1350.17 | 0.02 | 26.47 | 23.17 | 583.59 | 699.92 | 3.00 | 28.05 | 1156.22 | 0.02 | 28.57 |
| 20 | 1 | 16.30 | 422.68 | 501.94 | 6.00 | 25.80 | 1482.84 | 0.03 | 39.85 | 16.15 | 377.00 | 466.07 | 5.00 | 33.07 | 2047.32 | 0.02 | 42.91 |
| 22 | 1 | 12.03 | 276.39 | 310.08 | 5.00 | 21.85 | 2032.89 | 0.03 | 64.50 | 13.21 | 304.94 | 345.39 | 5.00 | 22.54 | 1883.10 | 0.03 | 57.91 |
| 23 | 1 | 32.05 | 640.75 | 716.66 | 2.00 | 23.10 | 930.04 | 0.03 | 27.91 | 23.71 | 621.29 | 741.34 | 5.00 | 28.02 | 1090.50 | 0.02 | 26.98 |
| 24 | 2 | 12.80 | 345.82 | 445.73 | 6.00 | 34.77 | 2250.53 | 0.02 | 44.87 | 20.05 | 390.12 | 448.28 | 3.00 | 25.09 | 1614.66 | 0.03 | 44.61 |
| 25 | 1 | 24.13 | 957.96 | 2351.79 | 5.00 | 88.86 | 1090.16 | 0.01 | 8.50 | 22.73 | 930.62 | 2383.39 | 4.00 | 106.88 | 1293.86 | 0.01 | 8.39 |
| 26 | 2 | 10.79 | 202.34 | 224.70 | 3.00 | 23.03 | 2957.14 | 0.03 | 89.01 | 10.79 | 225.33 | 242.51 | 4.00 | 19.24 | 2289.59 | 0.04 | 82.47 |
| Media | | 16.25 | 411.64 | 556.06 | 4.42 | 30.71 | 1858.28 | 0.03 | 47.32 | 15.92 | 398.19 | 542.43 | 4.25 | 31.32 | 1947.61 | 0.03 | 49.21 |
| Media Geométrica | | 15.59 | 377.86 | 473.26 | 4.25 | 28.90 | 1761.90 | 0.02 | 42.26 | 15.12 | 360.06 | 457.47 | 4.07 | 29.02 | 1830.29 | 0.02 | 43.72 |
| Des. Est. | | 5.02 | 184.05 | 429.46 | 1.18 | 13.78 | 619.84 | 0.01 | 21.32 | 4.89 | 189.55 | 436.65 | 1.19 | 17.21 | 732.91 | 0.01 | 22.98 |
| Err. Est. | | 1.02 | 37.57 | 87.66 | 0.24 | 2.81 | 126.52 | 0.00 | 4.35 | 1.00 | 38.69 | 89.13 | 0.24 | 3.51 | 149.61 | 0.00 | 4.69 |
| Mínimo | | 8.92 | 171.86 | 200.73 | 2.00 | 15.42 | 930.04 | 0.01 | 8.50 | 7.42 | 157.33 | 171.14 | 2.00 | 19.24 | 1066.01 | 0.01 | 8.39 |
| Mediana | | 15.31 | 371.42 | 452.21 | 5.00 | 27.04 | 1785.49 | 0.03 | 44.24 | 16.10 | 349.68 | 442.86 | 4.50 | 27.60 | 1858.93 | 0.03 | 45.17 |
| Máximo | | 32.05 | 957.96 | 2351.79 | 6.00 | 88.86 | 3307.49 | 0.04 | 99.64 | 23.71 | 930.62 | 2383.39 | 6.00 | 106.88 | 3880.10 | 0.04 | 116.87 |
| CV (%) | | 30.90 | 44.70 | 77.20 | 26.60 | 44.90 | 33.40 | 28.30 | 45.10 | 30.70 | 47.60 | 80.50 | 28.00 | 55.00 | 37.60 | 26.10 | 46.70 |

*C_{máx} en ng/mL, ABC_{0-t} y ABC_{0-∞} en h*ng/mL, t_{máx} y t_{1/2} en h, Vd en L, K_{el} en 1/h y Cl en L/h.

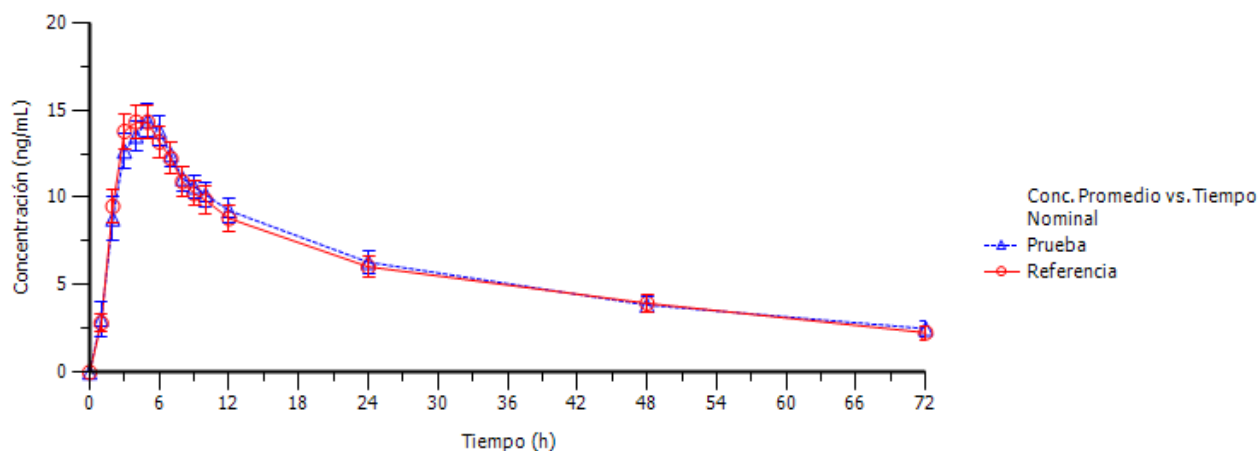
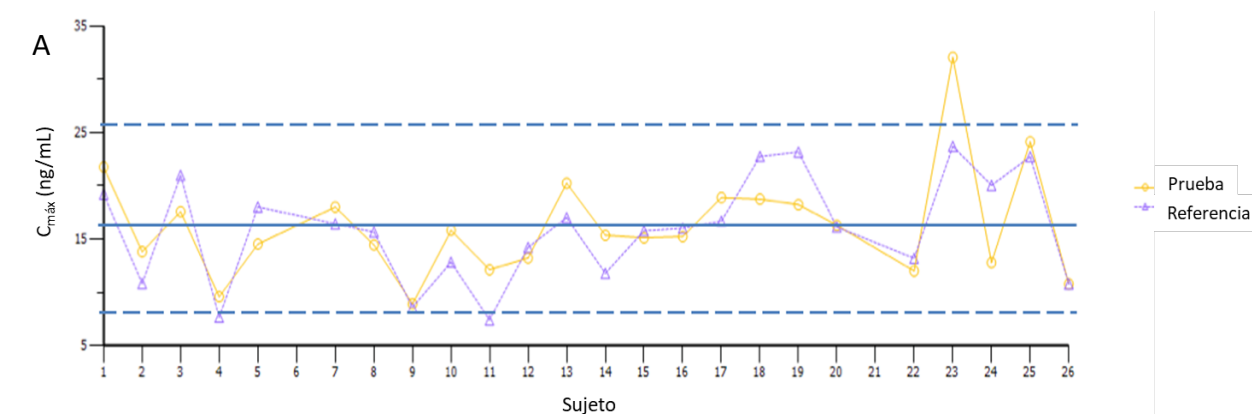


Figura 3. Perfil farmacocinético promedio de fluoxetina para cada medicamento, prueba (azul) y referencia (rojo).

Se determinó la normalidad de los datos transformados logarítmicamente, confirmándose mediante histogramas de frecuencias de la diferencia, cociente y logaritmo de cocientes de los tratamientos de prueba contra referencia para los tres parámetros farmacocinéticos. Adicionalmente, se identificaron los voluntarios que presentaron valores extremos del principio activo, de acuerdo con el criterio de ± 2 residuales intrasujeto estudentizados para los parámetros farmacocinéticos analizados (voluntarios 7, 11, 14 y 24). La prueba estadística de bioequivalencia fue realizada con los datos farmacocinéticos de los 24 voluntarios que concluyeron el estudio y dichos voluntarios resultan de interés para el análisis farmacogenético por haber presentado valores extremos en la muestra de sujetos de este estudio.

Respecto a la variabilidad intersujeto, se identificaron 4 voluntarios de interés por tener valores de $C_{m\acute{a}x}$ cerca o por arriba de ± 2 desviaciones estándar (voluntarios 4, 9, 11 y 23), así como dos sujetos en los parámetros de ABC (voluntario 11 y 25) (*Fig. 4*), lo cual también se puede destacar en los perfiles farmacocinéticos individuales (*Fig. 2 / Anexo 9.e*). En resumen, fenotípicamente resultaron de especial interés los sujetos 4, 7, 9, 11, 14, 23, 24 y 25 dadas sus características de alta variabilidad intra- y/o intersujeto, siendo el 30% de los 24 sujetos que concluyeron el estudio clínico de bioequivalencia.

Con respecto al ANOVA de los datos farmacocinéticos transformados logarítmicamente de fluoxetina (*Tabla 6*), no se identificó significancia estadística de los factores de variabilidad periodo, secuencia y tratamiento para los parámetros farmacocinéticos en este estudio. Por lo tanto, se considera válido el diseño del estudio clínico y la prueba de bioequivalencia (*Tabla 7*).



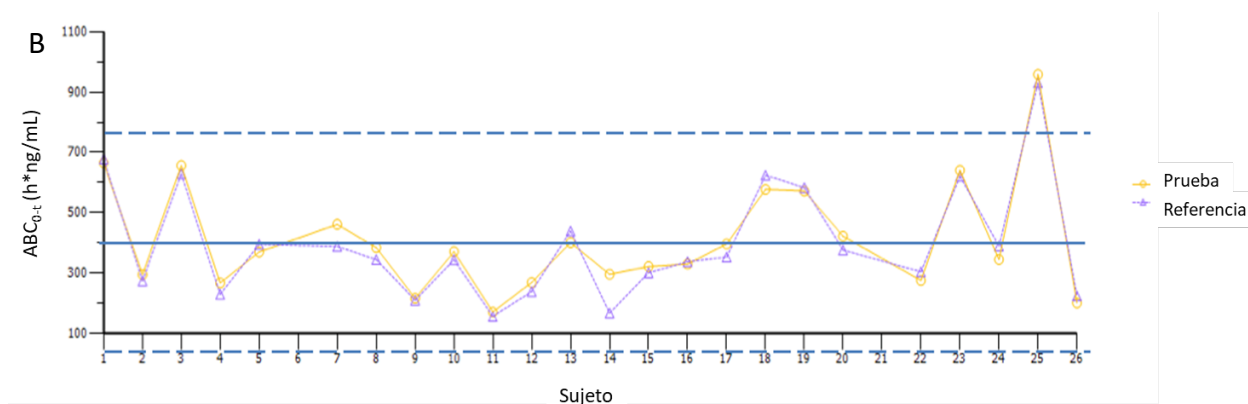


Figura 4. Parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ (A) y ABC_{0-t} (B) graficados para cada sujeto.

Tabla 6. Fuentes de variación del estudio (secuencia, periodo y formulación) de los parámetros farmacocinéticos transformados logarítmicamente.

| Ln $C_{m\acute{a}x}$ | | | | | | Diferencia estadística (Criterio: $p < 0.05$) |
|----------------------|------|-------------------|----------------|------------|---------|--|
| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrado Medio | Valor de F | Valor p | |
| Secuencia | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.04 | 0.84 | No significativa |
| Sujeto (Secuencia) | 22 | 4.07 | 0.18 | | | |
| Periodo | 1 | 0.05 | 0.05 | 2.64 | 0.12 | No significativa |
| Tratamiento | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.55 | 0.47 | No significativa |
| Residual | 22 | 0.45 | 0.02 | | | |
| Ln ABC_{0-t} | | | | | | Diferencia estadística (Criterio: $p < 0.05$) |
| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrado Medio | Valor de F | Valor p | |
| Secuencia | 1 | 0.23 | 0.23 | 0.61 | 0.44 | No significativa |
| Sujeto (Secuencia) | 22 | 8.33 | 0.38 | | | |
| Periodo | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.62 | 0.44 | No significativa |
| Tratamiento | 1 | 0.03 | 0.03 | 2.79 | 0.11 | No significativa |
| Residual | 22 | 0.22 | 0.01 | | | |
| Ln $ABC_{0-\infty}$ | | | | | | Diferencia estadística (Criterio: $p < 0.05$) |
| Fuente de variación | G.L. | Suma de cuadrados | Cuadrado Medio | Valor de F | Valor p | |
| Secuencia | 1 | 0.38 | 0.38 | 0.67 | 0.42 | No significativa |
| Sujeto (Secuencia) | 22 | 12.51 | 0.57 | | | |
| Periodo | 1 | 0.00 | 0.00 | 0.62 | 0.44 | No significativa |
| Tratamiento | 1 | 0.01 | 0.01 | 3.39 | 0.08 | No significativa |
| Residual | 22 | 0.09 | 0.00 | | | |

La *tabla 7* muestra los resultados de la bioequivalencia para fluoxetina. Se reporta la media geométrica de los parámetros farmacocinéticos para cada tratamiento (prueba y referencia), el cociente prueba/referencia, el intervalo de confianza, el coeficiente de variación intrasujeto y la potencia estadística del análisis.

Tabla 7. Bioequivalencia de fluoxetina con los datos de los sujetos que concluyeron el estudio clínico ($n=24$).

| Parámetro | Media Geométrica | | Cociente (P/R %) | Intervalo de Confianza (90%) | | | CV (%) Intra - sujeto | CV (%) Inter - sujeto | Potencia estadística (%) | ¿Cumple con el criterio 80-125%? |
|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------------------|---|--------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------------------|
| | Prueba (P) | Referencia (R) | | | | | | | | |
| $C_{máx}$ | 15.59 | 15.12 | 103.10 | 96.05 | - | 110.67 | 14.4% | 29.27% | 100.0% | Sí |
| ABC_{0-t} | 377.85 | 360.05 | 104.94 | 99.87 | - | 110.28 | 10.0% | 44.97% | 100.0% | Sí |
| $ABC_{0-\infty}$ | 473.25 | 457.47 | 103.45 | 100.23 | - | 106.77 | 6.4% | 57.12% | 100.0% | Sí |

Se observó que las medias geométricas de los tres parámetros farmacocinéticos analizados $C_{máx}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ fueron mayores entre 3.1% y 4.9% para el tratamiento de prueba en comparación con el tratamiento de referencia, por lo que los cocientes prueba / referencia de las medias geométricas resultan mayores a 100.0%. Por otra parte, los coeficientes de variación intrasujeto de los parámetros fueron estimados para $C_{máx}$ en 14.4%, 10.0% para ABC_{0-t} y 6.4% para $ABC_{0-\infty}$.

Los límites de los intervalos de confianza al 90% para $C_{máx}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ quedaron comprendidos dentro de lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013 vigente cuando se han transformado los datos logarítmicamente (80%-125%) para sustentar bioequivalencia. La potencia estimada fue de 100.0% para los tres parámetros farmacocinéticos, por lo que se tiene una certeza mayor a la mínima requerida en la normatividad vigente de no incurrir en un error tipo II o β , de negar la bioequivalencia real en la conclusión del estudio.

La prueba de la t doble unilateral de Schuirmann resultó en una probabilidad baja ($p < 0.05$) de incurrir en el error tipo I o α , lo cual sugiere que el riesgo para el consumidor asociado a que el producto de prueba sea bioinequivalente es menor del máximo aceptado de 0.05 para los parámetros farmacocinéticos evaluados. Por lo tanto, se puede afirmar con certeza la conclusión de bioequivalencia para el producto de prueba clorhidrato de fluoxetina cápsulas con 20 mg respecto al producto de referencia.

5.d. Análisis farmacogenético

El objetivo de esta sección del proyecto es conocer las variantes genéticas en los genes de las enzimas relevantes en los procesos farmacocinéticos de fluoxetina en los voluntarios participantes en el estudio de bioequivalencia. El análisis farmacogenético se realizó con fines de

investigación científica, ya que el dictamen de bioequivalencia se realizó de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013 vigente, que no considera información genética.

A partir de las muestras sanguíneas de 24 voluntarios participantes, se realizó la extracción, cuantificación y confirmación de integridad del ADN. Se confirmó una concentración de al menos 50 ng/ μ L de ácidos nucleicos en todas las muestras mediante espectrofotometría UV (NanoDrop ND-2000, Thermo Fisher Scientific), cuantificada en la longitud de onda de absorbancia máxima del ADN a 260 nm. Se obtuvieron cocientes $^{260}/_{280}$ de entre 1.8-1.9, y $^{260}/_{230}$ superiores a 2.0, para descartar presencia de contaminantes de tipo proteico, así como de carbohidratos, EDTA y fenoles (Matlock, 2015). Se confirmó cualitativamente la integridad de todas las muestras de material genético mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 5).

Se realizó la genotipificación con microarreglos Infinium® Global Screening Array 24 v1.0, personalizados, como se detalla en la sección de resultados. En el control de calidad de los datos de genotipificación se obtuvo buena calidad de las lecturas, según el análisis realizado en el software GenomeStudio v2.0. Las variantes de un solo nucleótido (SNV) a analizar tuvieron un *call rate* mayor a 0.99 y el *p10GC* mayor a 0.30 para todas las muestras. El parámetro *call rate* es el porcentaje de muestras de cada variante con dato confiable de genotipo, esperado habitualmente por arriba del 0.95 (Anderson *et al.*, 2010). La métrica *p10GC* representa el percentil 10 de la distribución del parámetro *GenCall* (GC) de todas las muestras para cada variante, con valores entre 0 (baja calidad de la muestra) y 1 (máxima calidad). Esta métrica evalúa la calidad y rendimiento de las muestras basado en la distancia de cada muestra respecto del centro del *cluster* para cada variante (Patel *et al.*, 2022). Se identificó de manera automática a cuatro sujetos femeninos y 20 sujetos masculinos, y en el análisis de variaciones de número de copias (CNV) se identificaron a 4 sujetos que carecen de cromosoma Y, lo cual coincide con los géneros de los voluntarios participantes.

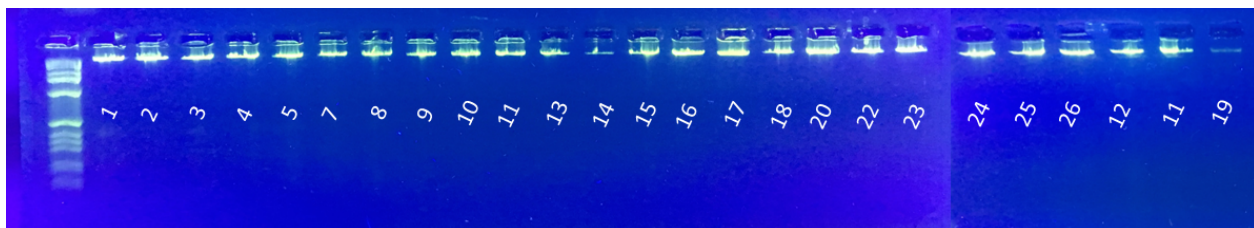


Figura 5. Calidad de ADN de cada sujeto mediante electroforesis en gel de agarosa.

5.d.i. Estrategia de genes candidatos

Para este análisis, se identificaron 423 variantes de interés en 8 citocromos (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *CYP3A5*) que participan directamente en la vía metabólica conocida de fluoxetina o de otros antidepresivos similares en estructura química, como paroxetina y duloxetina (PharmGKB, 2021b). De éstas, 169 coincidieron con variantes detectadas en el microarreglo mediante un programa desarrollado en el software R. En el análisis, 62 variantes fueron de utilidad, ya que el resto no presentaron diversidad de alelos. Tras remover variantes duplicadas, solo 39 resultaron ser variantes únicas: 5 para *CYP1A2*, 9 para *CYP2B6*, 1 para *CYP2C8*, 5 para *CYP2C9*, 6 para *CYP2C19*, 7 para *CYP2D6*, 5 para *CYP3A4* y 1 para *CYP3A5*. Fueron incluidas adicionalmente 2 variantes del gen *UGT2B10*, cuya enzima es de importancia metabólica en antidepresivos tricíclicos (Zhou, Guo, Linnenbach, Booth-Genthe, & Grimm, 2010).

Con fines exploratorios, se estudiaron variantes adicionales de farmacodinamia y de respuesta a antidepresivos de tipo SSRI en los genes *ABCB1*, *SLC6A4*, *TPH1* y *COMT* (Peters, Reus, & Hamilton, 2009; Sangkuhl, Klein, & Altman, 2009; Stäuble et al., 2022). Dichos genes están relacionados directamente con el mecanismo de acción de fluoxetina o de antidepresivos con estructura química similar, como paroxetina o duloxetina. Estos genes codifican para receptores neuronales, transportadores o enzimas metabólicas de los neurotransmisores relacionados. Se ha hipotetizado que la captura y transporte del medicamento a través de la barrera hematoencefálica impacta en la concentración del medicamento en sangre (Peters *et al.*, 2009), por lo que fue de interés en este proyecto la exploración de estas variantes farmacodinámicas y su impacto en la farmacocinética. En el microarreglo se encontraron las siguientes variantes de farmacodinamia y respuesta: *ABCB1*: 3 variantes; *SLC6A4*: 3 variantes; *TPH1*: 2 variantes; *COMT*: 7 variantes. Para *MAOA* y *MAOB*, no se encontraron variantes en el microarreglo personalizado empleado en este proyecto. Las SNVs seleccionadas para analizar se reportan en la *tabla 8*, resumiendo su información sobre la función y el nivel de evidencia de acuerdo con la base de datos PharmGKB.

Tabla 8. Información de genes y SNVs en estudio (PharmGKB, 2021; SNPedia; 2020).

| Gen | SNV | Haplotipo asociado | Variante genética | No. de variantes anotadas | No. de anotaciones clínicas | Nivel de evidencia (CPIC)* | Clasificación | Molécula relacionada | Función |
|---------|------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------|----------------|
| CYP1A2 | rs2069514 | CYP1A2*1C | 3860G>A | 17 | 2 | 3 | N/A | Antipsicótico | Eficacia |
| CYP1A2 | rs2069526 | CYP1A2*1K | 739T>G | 7 | 1 | 3 | Intrónica | Escitalopram | Toxicidad |
| CYP2B6 | rs4802101 | | 750T>C | 3 | 1 | 3 | Flanco 5' | Ciclofosfamida | Toxicidad |
| CYP2C19 | rs11188072 | | | 8 | 2 | 3 | N/A | Escitalopram | Dosis |
| CYP2C8 | rs11572080 | CYP2C8*3 | | 58 | 14 | 3 | Sin sentido | Rosiglitazona | -- |
| CYP2C9 | rs28371686 | CYP2C9*5 | 42619C>G | 23 | 5 | 1A | Cambio de sentido | Fenitoina | Metabolismo |
| CYP2D6 | rs1080985 | CYP2D6*2A | 1496C>G | 3 | 2 | 3 | Flanco 3' | Tioridazina | Eficacia |
| CYP2D6 | rs1135840 | | 4180G>C | 828 | 82 | 3 | Sin sentido | Fluoxetina | -- |
| CYP2D6 | rs16947 | | 2851C>T | 643 | 77 | 3 | Sin sentido | Fluoxetina | -- |
| CYP2D6 | rs72549358 | | | 2 | 1 | 4 | Intrónica | Tamoxifen | -- |
| CYP3A4 | rs2687116 | | C>A | 2 | 0 | N/A | Intrónica | -- | -- |
| ABCB1 | rs1045642 | | G>A | 580 | 100 | 3 | Sin sentido | SSRI | Eficacia |
| ABCB1 | rs1128503 | | 1236T>C | 216 | 38 | 3 | Sinónima | Metadona | Metabolismo/PK |
| ABCB1 | rs2032582 | | 2677T>G/A | 315 | 49 | 3 | Sin sentido | Fluoxetina | Eficacia |
| SLC6A4 | rs1042173 | | A > C | 2 | 2 | 3 | 3' UTR | Ondansetron | Eficacia |
| SLC6A4 | rs2066713 | | G > A | 1 | 1 | 3 | Intrónica | Etanol | Toxicidad |
| SLC6A4 | rs25532 | | | 12 | 3 | -- | N/A | -- | -- |
| TPH1 | rs1799913 | | G > T | 1 | 0 | N/A | Intrónica | Litio | Eficacia |
| UGT2B10 | rs2942857 | | A > C | 4 | 1 | 3 | Intrónica | Cotina | Metabolismo/PK |
| UGT2B10 | rs61750900 | UGT2B19*2 | G > A | 6 | 1 | 3 | Intrónica | Nicotina | Metabolismo/PK |

* Nivel de evidencia según CPIC, detallado en la sección 1.d.

(Cariaso & Lennon, 2012; PharmGKB, 2022c)

Las frecuencias alélicas del alelo menor o alternativo (MAF) se reportan en la *tabla 9* a partir de información de la base de datos pública ALFA dbSNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/ (Phan, Yin, Zhang, Qiang, & Shekman, 2020)), con información de los proyectos 1000genomes y gnomAD (Chen et al., 2022; Fairley, Lowy-Gallego, Perry, & Flicek, 2020). Para los 24 sujetos mexicanos estudiados, la MAF fue similar a los datos reportados para poblaciones africana, asiática del este y del sur, europea y latina/americanos mezclados (Wilson, Tiao, & Atkinson, 2021) en 15 variantes de los genes estudiados (*Tabla 9*). Por otro lado, excluyendo las variantes con MAF de 0% en nuestro estudio, las variantes en la muestra en mexicanos que presentaron una diferencia de más del 10% con respecto al promedio de las poblaciones reportadas en la *Tabla 9* fueron:

- *ABCB1* rs2032582 → Frecuencia alélica en muestra de estudio fue 43% mayor al promedio de las poblaciones seleccionadas.

- *CYP1A2* rs2069514 → Frecuencia alélica en muestra de estudio fue 20% mayor al promedio de las poblaciones seleccionadas, aunque similar a la población latina/americanos mezclados.
- *CYP2B6* rs4802101 → Frecuencia alélica en muestra de estudio fue 16% menor al promedio de las poblaciones seleccionadas.
- *CYP2D6* rs1080985 → Frecuencia alélica en muestra de estudio fue 13% mayor al promedio de las poblaciones seleccionadas, aunque similar a la población latina/americanos mezclados.

Tabla 9. Frecuencias del alelo menos común de los genes estudiados de las poblaciones disponibles (ALL), etnia africana americana (AFR), asiáticos del este (EAS) y del sur (SAS), europeos (EUR) y latinos/americanos mezclados (AMR). Obtenidas de ALFA dbSNP (Phan *et al.*, 2020).

| Gen | rs | Alelo | ALL | AFR | EAS | SAS | EUR | AMR | MXN* |
|--------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>CYP1A2</i> | rs2069526 | G | 0.071 | 0.123 | 0.084 | 0.069 | 0.024 | 0.025 | 0.063 |
| <i>CYP1A2</i> | rs2069514 | A | 0.209 | 0.313 | 0.281 | 0.080 | 0.020 | 0.362 | 0.413 |
| <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | T | 0.246 | 0.057 | 0.340 | 0.252 | 0.414 | 0.221 | 0.083 |
| <i>CYP2C19</i> | rs11188072 | T | 0.156 | 0.246 | 0.015 | 0.136 | 0.224 | 0.120 | 0.083 |
| <i>CYP2C8</i> | rs11572080 | T | 0.046 | 0.008 | 0.001 | 0.030 | 0.118 | 0.091 | 0.065 |
| <i>CYP2C9</i> | rs28371686 | G | 0.005 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.021 |
| <i>CYP2D6</i> | rs72549358 | T | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.001 | 0.021 |
| <i>CYP2D6</i> | rs1080985° | C | 0.162 | 0.051 | 0.103 | 0.240 | 0.241 | 0.239 | 0.292 |
| <i>CYP2D6</i> | rs16947° | A | 0.368 | 0.568 | 0.135 | 0.357 | 0.338 | 0.332 | 0.326 |
| <i>CYP2D6</i> | rs1135840° | C | 0.404 | 0.322 | 0.292 | 0.474 | 0.460 | 0.530 | 0.438 |
| <i>CYP3A4</i> | rs2687116 | C | 0.220 | 0.721 | 0.005 | 0.045 | 0.030 | 0.102 | 0.083 |
| <i>ABCB1</i> | rs1045642 | A | 0.395 | 0.150 | 0.398 | 0.575 | 0.518 | 0.428 | 0.438 |
| <i>ABCB1</i> | rs1128503 | A | 0.416 | 0.136 | 0.627 | 0.587 | 0.416 | 0.403 | 0.458 |
| <i>ABCB1</i> | rs2032582 | T | 0.049 | 0.001 | 0.134 | 0.050 | 0.018 | 0.059 | 0.479 |
| <i>SLC6A4</i> | rs2066713 | A | 0.257 | 0.254 | 0.066 | 0.289 | 0.381 | 0.314 | 0.292 |
| <i>SLC6A4</i> | rs1042173 | C | 0.485 | 0.185 | 0.822 | 0.552 | 0.437 | 0.542 | 0.375 |
| <i>TPH1</i> | rs1799913 | T | 0.321 | 0.163 | 0.475 | 0.269 | 0.391 | 0.372 | 0.354 |
| <i>UGT2B10</i> | rs2942857° | C | 0.158 | 0.444 | 0.085 | 0.027 | 0.002 | 0.089 | 0.000 |
| <i>UGT2B10</i> | rs61750900° | T | 0.043 | 0.035 | 0.001 | 0.031 | 0.089 | 0.064 | 0.000 |
| Tamaño de muestra | | | 5,008 | 1,322 | 1,008 | 978 | 1,006 | 694 | 24 |

* Frecuencias alélicas reportadas para este estudio en sujetos mexicanos.

° A partir de datos de 1000Genomes_30x, con un total global de 6,404 genomas (1,786 AFR; 1,170 EAS; 1,202 SAS; 1,266 EUR; 980 AMR).

5.d.ii. Asociación de variantes genéticas con parámetros farmacocinéticos

Para determinar el impacto de las variantes genéticas en los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} , $t_{m\acute{a}x}$, $t_{1/2}$, depuración (Cl) y tiempo medio de residencia (TMR), se realizaron análisis de asociación entre dichas variables mediante regresión lineal múltiple, incluyendo variables demográficas. La selección de covariables demográficas se realizó analizando su colinealidad con el método paramétrico de coeficiente de correlación R de Pearson, encontrando una correlación esperada de la variable índice de masa corporal (IMC) con peso ($p < 0.00$) y edad ($p = 0.017$), género con peso y talla ($p < 0.00$), y talla con peso ($p < 0.00$) (Tabla 10). No se encontró correlación de género con IMC y edad, por lo que estas tres variables demográficas fueron incluidas como covariables para modelos de regresión lineal para la selección de las variantes genéticas, ya que estas variables demográficas podrían explicar parte de la variabilidad obtenida en los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 10. Matriz de correlación de las variables demográficas.

| | | Edad (años) | Peso (kg) | Talla (m) | IMC (kg/m ²) | Género |
|--------------------------|-----|-------------|-----------|-----------|--------------------------|---------|
| Edad (años) | R | 1 | 0.323 | -0.014 | 0.481* | 0.039 |
| | p | - | 0.123 | 0.950 | 0.017 | 0.855 |
| Peso (kg) | R | 0.323 | 1 | 0.758** | 0.665** | 0.681** |
| | p | 0.123 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Talla (m) | R | -0.014 | 0.758** | 1 | 0.023 | 0.696** |
| | p | 0.950 | 0.000 | - | 0.913 | 0.000 |
| IMC (kg/m ²) | R | 0.481* | 0.665** | 0.023 | 1 | 0.298 |
| | p | 0.017 | 0.000 | 0.913 | - | 0.157 |
| Género | R | 0.039 | 0.681** | 0.696** | 0.298 | 1 |
| | p | 0.855 | 0.000 | 0.000 | 0.157 | - |

* Correlación significativa < 0.05 (a dos colas).

** Correlación significativa < 0.01 (a dos colas).

Posteriormente, se estudió la relación entre el genotipo de los voluntarios participantes con los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, ABC , $t_{m\acute{a}x}$, $t_{1/2}$, Cl y TMR. De las variantes genéticas con anotación clínica relevante en la farmacogenética seleccionadas para este estudio, mediante un análisis de regresión con GLM con las variables farmacocinéticas y covariables demográficas, se encontraron significativos los siguientes efectos:

- $C_{m\acute{a}x}$: 2 variantes en *ABCB1*, 4 variantes en *CYP2B6* y una en *CYP2D6*

- ABC_{0-t} : 4 variantes en *CYP2B6* y 3 en *CYP2D6*
- $ABC_{0-\infty}$: 4 variantes en *CYP2B6* y 3 en *CYP2D6*
- $t_{m\acute{a}x}$: 1 variante en *CYP2C9*
- $t_{1/2}$: 1 variante en *SLC6A4*, 2 variantes en *CYP2B6* y 2 en *CYP2D6*
- Cl: 2 variantes en *ABCB1*, 4 variantes en *CYP2B6* y 2 en *CYP2D6*

El resumen de las SNVs con efectos significativos ($p < 0.05$) se muestra en la *tabla 11*, donde la variante con el efecto individual de mayor significancia estadística para cada parámetro farmacocinético se destaca en negritas. En el *anexo 9.f* se muestra un ejemplo de salida cruda de gPLINK para $C_{m\acute{a}x}$ como variable farmacocinética de respuesta, listando todos los genes y sus variantes analizadas en este estudio, tanto significativas como no significativas.

Un valor de efecto aditivo del alelo (ADD) positivo indica que dicha variante genera un incremento proporcional al valor en cada variable farmacocinética, siendo el caso contrario para valores negativos. Las covariables género y edad resultaron significativas en varios de los modelos. Específicamente para $C_{m\acute{a}x}$, edad y género también resultaron significativos ($p < 0.05$) en las variantes en *CYP2B6*, *CYP2D6* y *ABCB1*; la edad resultó significativa para ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ para las variantes del *CYP2B6* y *CYP2D6* ($p < 0.05$); y el género fue significativo en las SNVs del *CYP2B6* para Cl, y para ABC_{0-t} en las variantes *CYP2B6* y *CYP2D6*. Además, se encontró que resultaron significativas las covariables edad y género en variantes de *CYP2C19* y *SLC6A4* para $C_{m\acute{a}x}$, y género para las variantes del *CYP2C19*, *CYP1A2* y *CYP3A4* en el análisis de ABC_{0-t} .

Para cuantificar el impacto de las variantes en los parámetros farmacocinéticos, se analizó $t_{1/2}$ estratificado por variantes del *CYP2D6* (*Fig. 6 y 7*), con el genotipo homocigoto para el alelo silvestre (*wild type*) a la izquierda. El genotipo *CYP2D6* rs1135840 C/C tuvo diferencias significativas al compararse con los genotipos C/G y G/G ($p = 0.001$ y $p = 0.002$), mientras que el genotipo *CYP2D6* rs1065852 A/A tuvo diferencias significativas contra los genotipos A/G y G/G ($p < 0.000$). Para el resto de los parámetros farmacocinéticos, el genotipo *CYP2D6* rs1135840 C/C tuvo diferencias significativas en ABC_{0-t} ($p < 0.017$), $ABC_{0-\infty}$ ($p < 0.002$), K_{el} ($p < 0.001$) y TMR ($p = 0.001$) contra los otros dos genotipos C/G y G/G. En Cl, solo resultó distinto el genotipo *CYP2D6* rs1135840 G/G ($p = 0.020$) contra el genotipo C/C.

Para el genotipo *CYP2D6* rs1065852 A/A, además del $t_{1/2}$, los parámetros farmacocinéticos ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, K_{el} y TMR resultaron significativamente distintos ($p < 0.03$) a los otros dos genotipos encontrados. Para la CI, solo resultó distinto en el genotipo rs1065852 G/G ($p = 0.012$) contra el genotipo A/A.

Tabla 11. SNVs con efecto significativo en las variables farmacocinéticas.

| Variable PK | Gen | SNV | Alelo | Coficiente/ Tamaño del efecto (ADD) | Valor p |
|--------------------|----------------------|-------------------|----------|--|--------------|
| C _{máx} | <i>ABCB1</i> | rs2032582 | C | -2.27 | 0.033 |
| | <i>ABCB1</i> | rs1128503 | G | -2.11 | 0.042 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | A | 5.38 | 0.009 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803418 | G | -2.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803419 | A | -2.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs2279344 | G | 4.94 | 0.005 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs28371703 | A | 4.87 | 0.016 |
| ABC _{0-t} | <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | A | 219.30 | 0.022 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803418 | G | -156.30 | 0.002 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803419 | A | -156.30 | 0.002 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs2279344 | G | 180.50 | 0.033 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1135840 | C | 142.00 | 0.005 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs28371703 | A | 291.80 | 0.001 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1065852 | A | 249.80 | 0.001 |
| ABC _{0-∞} | <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | A | 568.30 | 0.020 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803418 | G | -336.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803419 | A | -336.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs2279344 | G | 463.50 | 0.032 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1135840 | C | 301.80 | 0.023 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs28371703 | A | 733.80 | 0.001 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1065852 | A | 783.60 | 0.000 |
| t _{máx} | <i>CYP2C9</i> | rs2256871 | G | -1.99 | 0.047 |
| t _{1/2} | <i>SLC6A4</i> | rs1042173 | A | 9.89 | 0.049 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | A | 18.43 | 0.045 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs2279344 | G | 16.82 | 0.035 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs28371703 | A | 23.54 | 0.006 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1065852 | A | 28.64 | 0.000 |
| CI | <i>ABCB1</i> | rs2032582 | C | 14.20 | 0.018 |
| | <i>ABCB1</i> | rs1128503 | G | 11.77 | 0.048 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | A | -24.28 | 0.047 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803418 | G | 14.00 | 0.035 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs4803419 | A | 14.00 | 0.035 |
| | <i>CYP2B6</i> | rs2279344 | G | -22.78 | 0.031 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs28371703 | A | -26.79 | 0.022 |
| | <i>CYP2D6</i> | rs1065852 | A | -21.36 | 0.043 |

Nota: En **negritas** se indica la variante con el efecto con mayor significancia estadística (menor p-value).

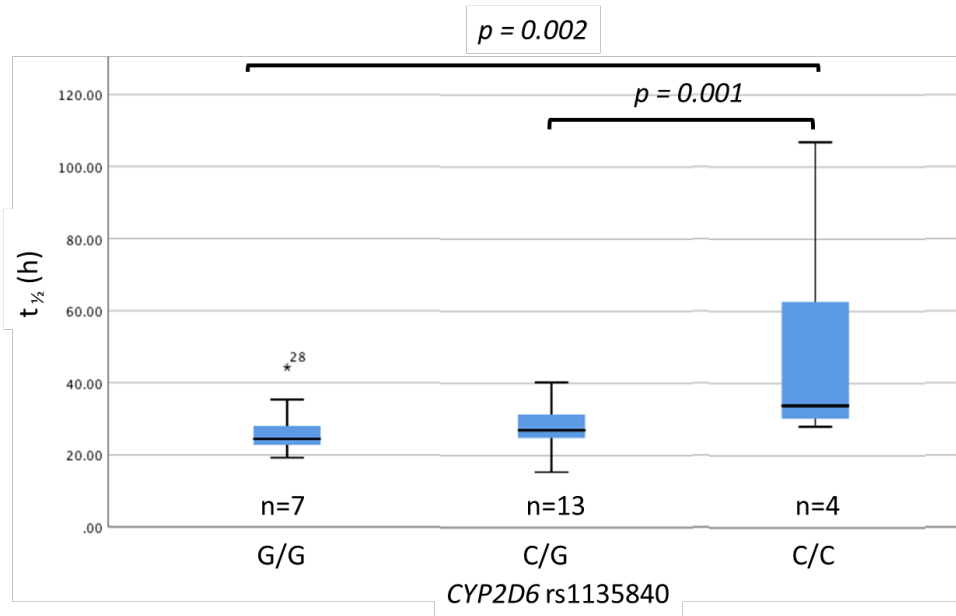


Figura 6. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs1135840 del gen *CYP2D6*.

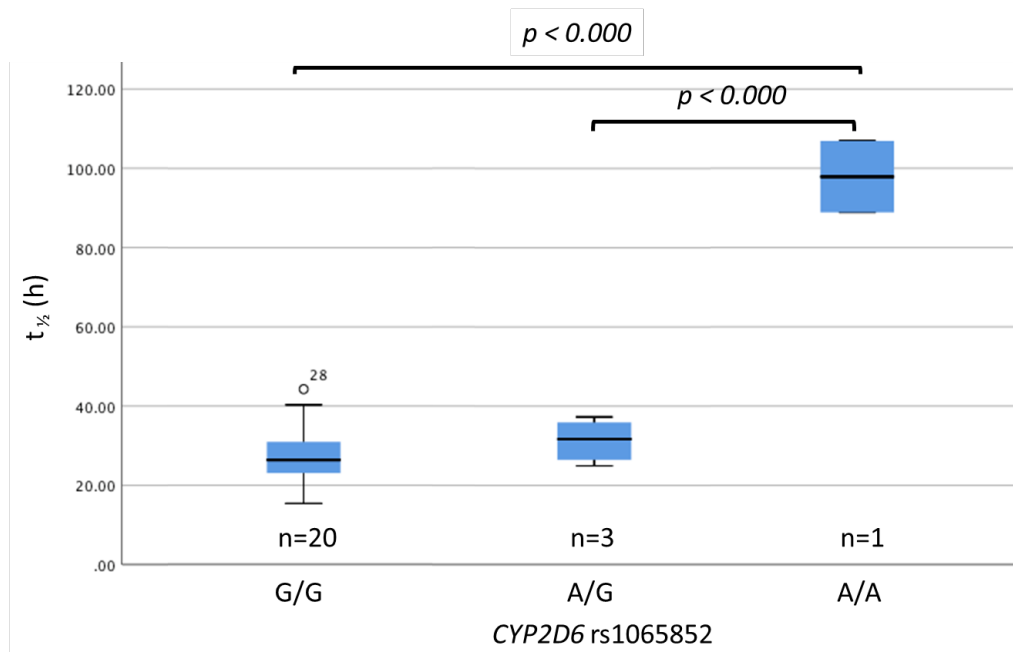


Figura 7. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs1065852 del gen *CYP2D6*.

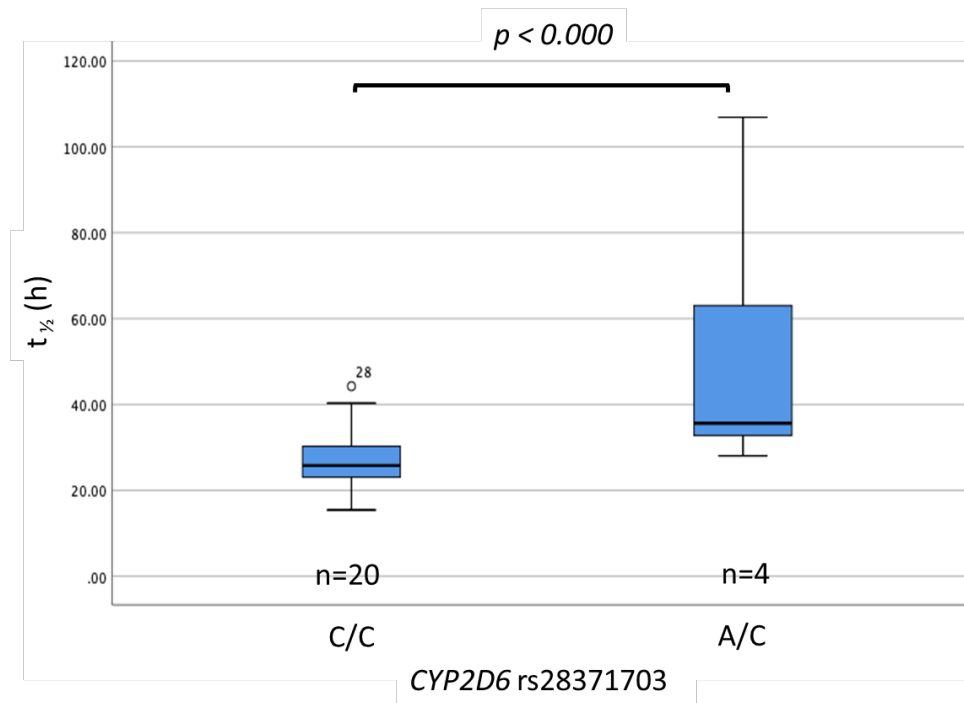


Figura 8. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs28371703 del gen *CYP2D6*.

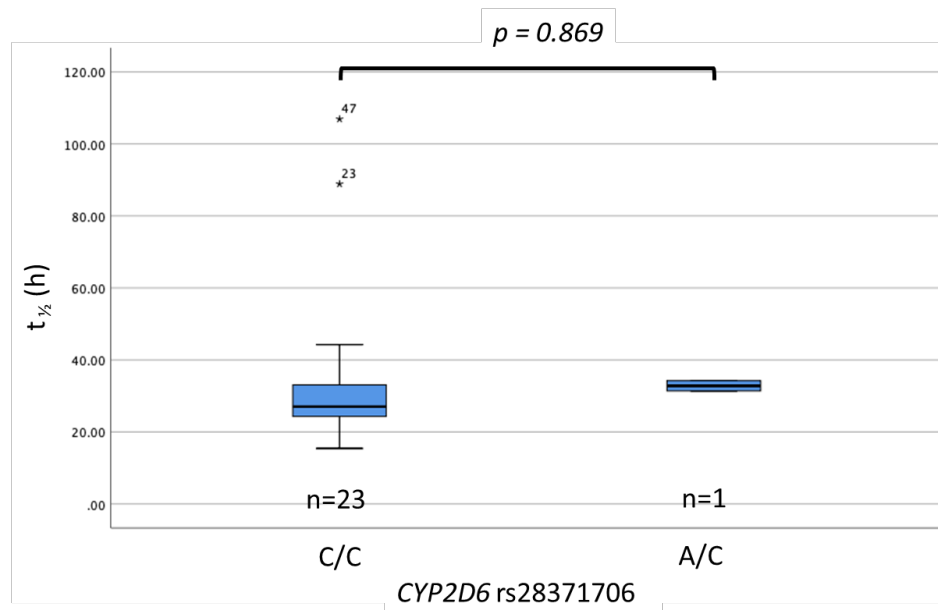
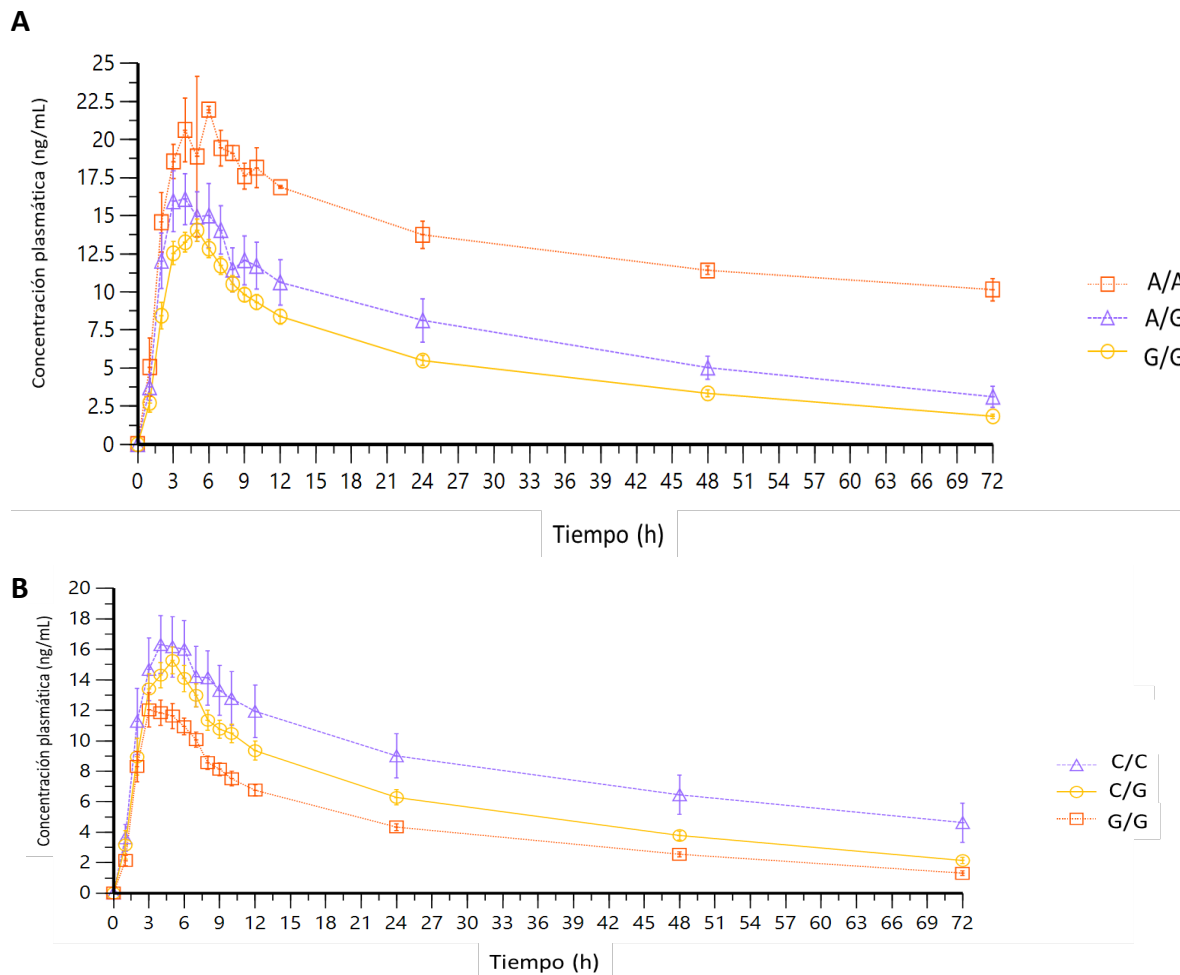


Figura 9. Tiempo de vida media (horas) estratificada por genotipo de la variante rs28371706 del gen *CYP2D6*.

En las figuras 8 y 9 se presenta el impacto de dos variantes adicionales del *CYP2D6*, rs28371703 y rs28371706, en $t_{1/2}$. En estos dos casos solo se obtuvieron dos genotipos en la muestra de estudio, y en la variante rs28371703 se evidencia una diferencia fenotípica estadísticamente

significativa ($p < 0.000$) del genotipo heterocigoto A/C, presentando valores mayores y más dispersos que el homocigoto C/C. Respecto a la variante *CYP2D6* rs28371706, 23 sujetos presentaron genotipo homocigoto G/G y un sujeto genotipo A/G, y la diferencia de $t_{1/2}$ entre estos genotipos no fue significativa ($p = 0.0869$)

Basados en los genotipos encontrados, se estratificaron los perfiles plasmáticos de los sujetos basado en los alelos del *CYP2D6* y *CYP2C19* (Fig. 10). Se confirmaron fenotípicamente los alelos *CYP2D6**10, relacionado con función disminuida del *CYP2D6* y caracterizado por las variantes rs1065852 (100 C>T) y rs1135840 (4180G>C) (Fig. 10.A-B). También se identificó a un sujeto heterocigoto para el alelo *CYP2D6**4 de pérdida de función de *CYP2D6*, con el rs28371703 (974C>A) (Fig. 10.C). Por otra parte, para el *CYP2C19* rs12769205 también se presentó una diferencia en el perfil plasmático (Fig. 10.D). En la estratificación con las otras tres variantes estudiadas para *CYP2C19* (rs11188072, rs4917623 y rs4244285) no se presentaron cambios evidentes en los perfiles farmacocinéticos de fluoxetina.



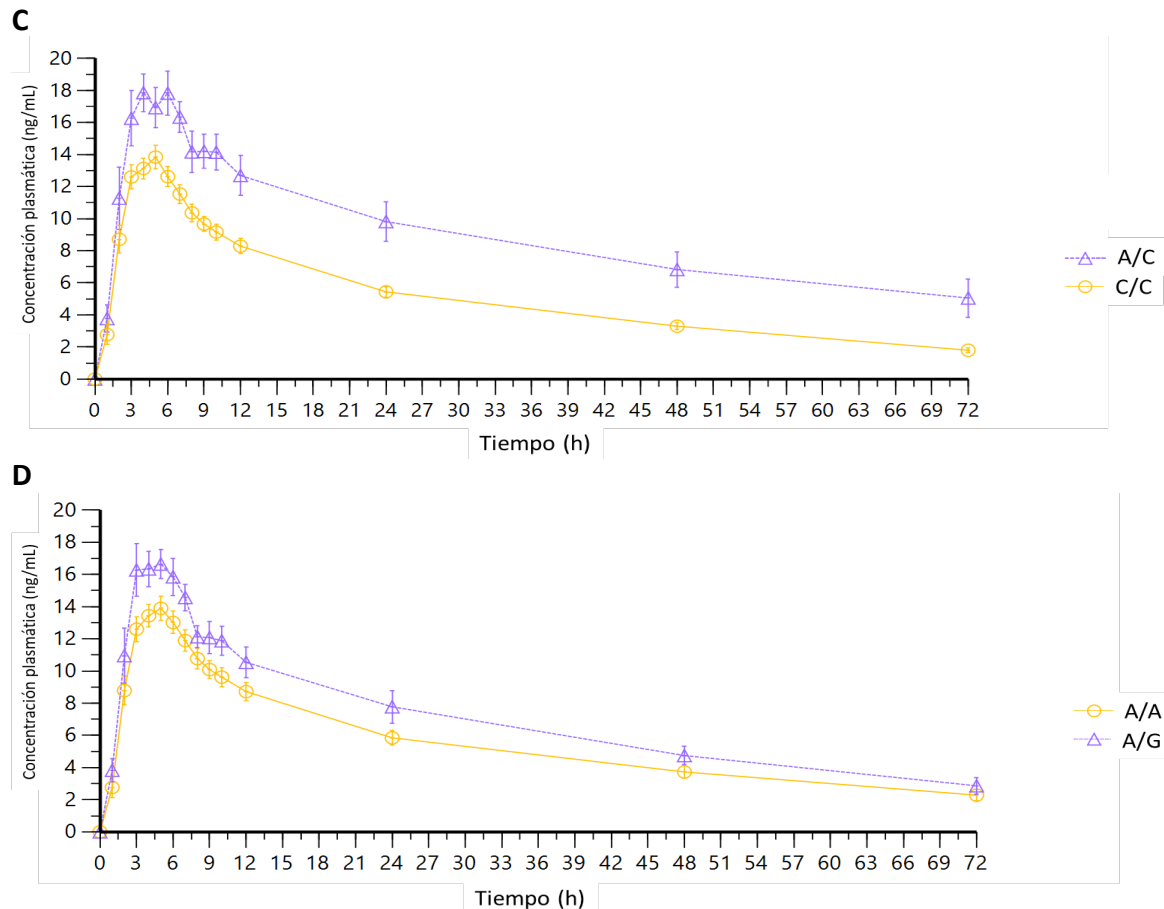


Figura 10. Concentración plasmática promedio de fluoxetina contra tiempo, estratificada por genotipos de *CYP2D6* (A-C) y *CYP2C19* (D).

A. rs1065852 (100 C>T), asociado con el alelo *CYP2D6**10 de función disminuida (G/G n = 20; A/G n = 3; G/G n = 20); **B.** rs1135840 (4180G>C), asociado con el alelo *CYP2D6**10 de función disminuida (G/G n = 7; C/G n = 13; C/C n = 4); **C.** rs28371703 (974C>A), asociado con el alelo *CYP2D6**4 de pérdida de función (C/C n = 20; A/C n = 4); **D.** *CYP2C19* rs12769205 (17687 A>G), asociado con el alelo *CYP2C19**35 de pérdida de función (A/A n = 20; A/G n = 4).

Adicionalmente, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple con variable de respuesta Y = parámetro farmacocinético contra X = múltiples variantes genéticas, para obtener ecuaciones lineales, incluyendo las covariables demográficas. En la tabla 12 se resumen los modelos de regresión lineal con mejor correlación y significancia estadística ($p < 0.0001$), calculados con el método *stepwise* a partir de las 54 variantes estudiadas. Se indica la variable de respuesta para cada modelo, las variables predictoras, los coeficientes de cada predictor ($p < 0.05$), con los modelos de regresión integrando las variables demográficas y removiéndolas para evaluar el efecto total del genotipo.

Tabla 12. Variables demográficas y variantes genéticas como efectos predictores (independientes) de las variables farmacocinéticas (dependientes).

| Modelos de regresión sin variables demográficas | | | | | Modelos de regresión con variables demográficas | | | | | |
|---|-------------------------|--------------|--------------------|-------------------------|---|-------------------------|--------------|----------------|-------------------------|-------|
| Variable dependiente y | Variables predictoras x | Coefficiente | R ² | R ² ajustado | Variable dependiente y | Variables predictoras x | Coefficiente | R ² | R ² ajustado | |
| ABC _{0-t} (ng/mL/h) | Constante | -384.909 | 0.984 | 0.977 | ABC _{0-t} (ng/mL/h) | Constante | 1407.983 | 0.984 | 0.978 | |
| | ABCB1 rs1128503 | -6.563 | | | | ABCB1(rs1045642) | -35.575 | | | |
| | CYP1A2 rs2470890 | -33.751 | | | | ABCB1 rs1128503 | -5.932 | | | |
| | CYP1A2 rs762551 | -18.890 | | | | CYP1A2 rs2069514 | -36.506 | | | |
| | CYP2C19 rs4244285 | 12.884 | | | | CYP1A2 rs2470890 | -22.919 | | | |
| | CYP2C9 rs1799853 | 26.770 | | | | CYP2B6 rs2279342 | -64.374 | | | |
| | CYP2C9 rs28371686 | 74.827 | | | | CYP2C19 rs4917623 | 29.571 | | | |
| | CYP2D6 rs1065852 | -55.760 | | | | CYP2C9 rs1799853 | -12.555 | | | |
| | CYP2D6 rs1135840 | 23.740 | | | | CYP2D6 rs1135840 | 15.952 | | | |
| | CYP2D6 rs28371703 | 137.454 | | | | CYP2D6 rs28371703 | 78.419 | | | |
| | CYP2D6 rs28371706 | -118.191 | | | | CYP3A4 rs2687116 | -7.826 | | | |
| | CYP2D6 rs72549358 | 115.010 | | | | CYP3A5 rs776746 | -53.635 | | | |
| | CYP3A4 rs2740574 | -126.951 | | | | Género* | -131.696 | | | |
| | CYP3A4 rs3735451 | -29.337 | | | | Talla (m) | -257.222 | | | |
| | SLC6A4 rs1042173 | 13.325 | | | | TPH1 rs1799913 | -20.761 | | | |
| | Cl (L/h) | Constante | | | | 567.486 | 0.980 | | | 0.969 |
| ABCB1 rs2032582 | | -1.280 | CYP1A2 rs2470890 | 3.452 | | | | | | |
| CYP1A2 rs2470890 | | 5.436 | CYP2C19 rs11188072 | 3.238 | | | | | | |
| CYP2B6 rs2279344 | | -5.530 | CYP2C9 rs28371686 | -3.142 | | | | | | |
| CYP2B6 rs4803418 | | 1.582 | CYP2D6 rs1065852 | 6.809 | | | | | | |
| CYP2C19 rs11188072 | | 2.272 | CYP2D6 rs16947 | -6.315 | | | | | | |
| CYP2C19 rs12769205 | | 5.584 | CYP2D6 rs28371703 | -19.606 | | | | | | |
| CYP2C19 rs4917623 | | 1.555 | CYP2D6 rs28371706 | 19.316 | | | | | | |
| CYP2C9 rs1799853 | | -4.696 | CYP3A4 rs2242480 | -3.734 | | | | | | |
| CYP2C9 rs2256871 | | 4.406 | CYP3A5 rs776746 | 6.012 | | | | | | |
| CYP2C9 rs28371686 | | -9.384 | Edad (años) | -0.520 | | | | | | |
| CYP2D6 rs16947 | | -3.932 | Género* | 20.301 | | | | | | |
| CYP2D6 rs28371703 | | -19.079 | SLC6A4 rs1042173 | -2.145 | | | | | | |
| CYP2D6 rs28371706 | | 26.620 | | | | | | | | |
| CYP3A4 rs67666821 | | -45.090 | | | | | | | | |
| SLC6A4 rs1042173 | | -5.815 | | | | | | | | |
| SLC6A4 rs2066713 | -1.428 | | | | | | | | | |
| TMR* (h) | Constante | -5.723 | 0.963 | 0.955 | | | | | | |
| | CYP2B6 rs2279344 | 0.925 | | | | | | | | |
| | CYP2B6 rs35303484 | 3.481 | | | | | | | | |
| | CYP2C8 rs11572080 | 1.637 | | | | | | | | |

| | | | | |
|--------------------|--------------------------|---------|-------|-------|
| | <i>CYP2C9</i> rs2256871 | 14.518 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs1065852 | -18.607 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs28371703 | 21.511 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs28371706 | -20.413 | | |
| | <i>CYP3A4</i> rs2740574 | 14.015 | | |
| | <i>TPH1</i> rs1799913 | -0.834 | | |
| $t_{1/2}^*$ (h) | Constante | -1.100 | 0.935 | 0.924 |
| | <i>CYP2B6</i> rs35303484 | 3.229 | | |
| | <i>CYP2C9</i> rs2256871 | 10.096 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs1065852 | -13.304 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs28371703 | 15.256 | | |
| | <i>CYP2D6</i> rs28371706 | -13.635 | | |
| | <i>CYP3A4</i> rs2740574 | 9.739 | | |
| | <i>TPH1</i> rs1799913 | -0.696 | | |

* Género codificado: 0 = Femenino; 1 = Masculino.

Nota: Se omiten modelos de TMR y $t_{1/2}$ sin variables demográficas género, edad e IMC, ya que no resultaron significativas.

En los modelos de regresión generados se obtuvieron coeficientes de correlación R^2 ajustados entre 0.70 y 0.97. La variable de respuesta con menor correlación para las variantes genéticas fue $C_{m\acute{a}x}$, con la cual además disminuyó la calidad del modelo al agregar las variables demográficas, siendo solo el género y la edad significativas para el modelo con variables demográficas.

Los modelos de ABC_{0-t} resultaron tener la mayor correlación ($R^2_{adj} > 0.977$), con y sin inclusión de variables demográficas, por lo que se deduce que es el parámetro farmacocinético cuyo valor se podría predecir mejor a partir del genotipo y de la información demográfica, incluyendo género y talla. El IMC no resultó significativo para este parámetro farmacocinético, confirmando lo encontrado anteriormente sobre que esta variable demográfica no está asociada significativamente con talla y género.

Las variantes del gen *CYP2D6* son estadísticamente significativas en todos los modelos de regresión, y su coeficiente se reduce con la inclusión del género para los modelos de $C_{m\acute{a}x}$ y Cl, así como con la inclusión de la talla para ABC_{0-t} . Específicamente *CYP2D6* rs28371703 es significativa en todos los modelos de regresión, con los mayores coeficientes, por lo que resulta ser la variante de mayor impacto en los parámetros farmacocinéticos de fluoxetina. En ausencia de variables

demográficas, también la variante *CYP2D6* rs28371706 resulta de relevancia después de *CYP2D6* rs28371703.

La variante *CYP1A2* rs2470890 resulta significativa en los modelos de ABC_{0-t} y CI, así como las variantes rs1799853, rs28371686 y rs2256871 del gen *CYP2C9* para CI, TMR y $t_{1/2}$, por lo que las variantes de esta última enzima también resultan importantes en las variables farmacocinéticas de eliminación del fármaco. Variantes del *CYP3A4* también resultan ser relevantes para los parámetros farmacocinéticos, con 5 diferentes variantes en los modelos (rs2242480, rs67666821, rs2740574, rs3735451 y rs2687116), excepto en los modelos de $C_{máx}$ donde las variantes del *CYP3A4* no resultan significativas.

Se encontraron interacciones de uno, dos y tres variantes de las 34 significativas que tienen impacto en los valores de las variables $C_{máx}$ (Fig. 11), ABC_{0-t} (Fig. 12) y CI (Fig. 13) con respecto al valor promedio de cada una en la muestra estudiada en este proyecto mediante la técnica estadística de MDR. Se destaca que el mayor impacto cuantitativo en $C_{máx}$ lo tienen las combinaciones de los 2 genotipos *CYP2D6* rs1080985 GG y *CYP3A4* rs2687116 AA, *CYP2D6* rs1080985 CC y *CYP3A4* rs2687116 AC, así como la combinación de los 3 genotipos *CYP3A4* rs2687116 AC - *CYP1A2* rs2069526 AC - *CYP2D6* rs1080985 CC, y de la interacción *CYP3A4* rs2687116 AA - *CYP1A2* rs2069526 AA - *CYP2D6* rs1080985 GG. Por otra parte, el mayor impacto cuantitativo en ABC_{0-t} lo obtuvo la combinación de los 3 genotipos *CYP2C9* rs11188072 GG – *CYP1A2* rs2069514 GG - *CYP2B6* rs4802101 AG (Fig. 12).

Respecto al impacto cuantitativo en CI, las interacciones con los mayores cambios con respecto al promedio lo tuvieron las combinaciones de los 3 genotipos *CYP2D6* rs16947 GG – *CYP2C8* rs11572080 GG - *CYP2D6* rs1135840 CC y la interacción *CYP2D6* rs16947 AA – *CYP2C8* rs11572080 GG - *CYP2D6* rs1135840 CC (Fig. 13). Sin embargo, es importante destacar que, debido al limitado tamaño de muestra en estudio, la n resultante en todas las interacciones mencionadas fue de 1, por lo que no se pueden hacer inferencias concluyentes a partir de este análisis.

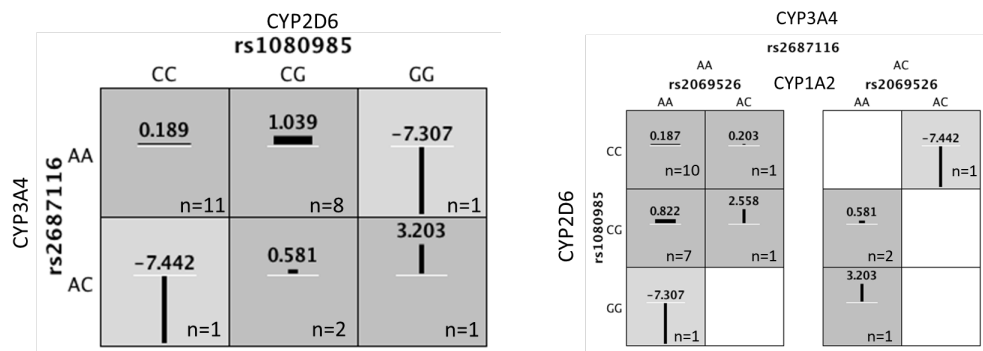


Figura 11. Efecto de interacción de 2 y 3 variantes en *CYP3A4*, *CYP2D6* y *CYP1A2* en $C_{m\acute{a}x}$.

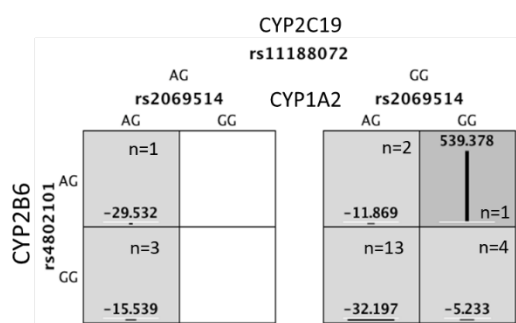


Figura 12. Efecto de interacción de 3 variantes en *CYP2C19*, *CYP2B6* y *CYP1A2* en el ABC_{0-t} .

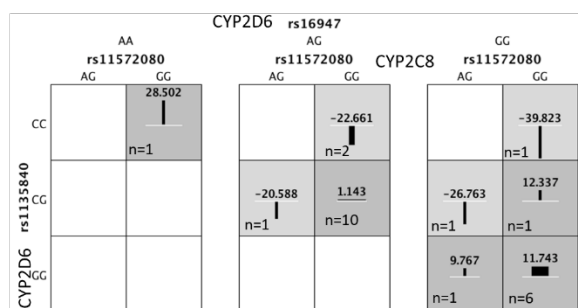


Figura 13. Efecto de interacción de 3 variantes en *CYP2D6* y *CYP2C8* en Cl .

A partir de los análisis estadísticos reportados anteriormente con las variantes estudiadas, específicamente a partir de las variantes *CYP2D6*, se identificó en un sujeto del estudio (No. 25) la variante *CYP2D6*10* rs1065852, asociado con metabolizadores pobres de fármacos (función disminuida de *CYP2D6*). Dicho sujeto además resultó tener valores farmacocinéticos extremos en el análisis estadístico fuera de los ± 2 residuales estudentizados, fenotípicamente confirmado por tener un metabolismo lento de fluoxetina, con eliminación (Cl) 5.72 veces más baja que el

promedio de los sujetos en el estudio (8.45 L/h vs. 48.27 L/h). El $t_{1/2}$ para este sujeto fue calculado en 3 veces más que el promedio, siendo 31.02 h el promedio en este estudio contra 106.9 h para el sujeto 25. Al remover los datos farmacocinéticos del sujeto 25 del análisis de bioequivalencia (*tabla 13*), se obtuvo una disminución de la variabilidad intersujeto global del estudio en el parámetro ABC_{0-t} de 4.22% (44.97% vs. 40.75%) y en el $ABC_{0-\infty}$ de 13.66% (57.12% vs. 43.46%). Estos resultados pueden ser comparados con los mostrados en el análisis estadístico de bioequivalencia con todos los sujetos del estudio de la *tabla 7*.

Tabla 13. Bioequivalencia de fluoxetina posterior a la remoción de los datos farmacocinéticos del sujeto con fenotipo de metabolizador lento ($n=23$).

| Parámetro | Media Geométrica | | Cociente (P/R %) | Intervalo de Confianza (90%) | | | CV (%) Intra - sujeto | CV (%) Inter - sujeto | Potencia estadística (%) |
|-------------------|------------------|----------------|------------------|------------------------------|---|--------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| | Prueba (P) | Referencia (R) | | | | | | | |
| $C_{m\acute{a}x}$ | 15.32 | 14.83 | 103.28 | 95.89 | - | 111.23 | 14.7% | 28.37% | 100.0% |
| ABC_{0-t} | 363.16 | 346.11 | 104.93 | 99.61 | - | 110.53 | 10.3% | 40.75% | 100.0% |
| $ABC_{0-\infty}$ | 441.64 | 426.27 | 103.61 | 100.24 | - | 107.09 | 6.5% | 43.46% | 100.0% |

6. Discusiones

Desde hace más de cuatro décadas en el mundo, y a partir de 1998 en México, los estudios de bioequivalencia se han regulado con medidas clínicas, analíticas y estadísticas estrictas para no poner en riesgo a los usuarios de alternativas farmacéuticas disponibles en el mercado y mejorar la perspectiva económica ligada a la salud a nivel personal y social (COFEPRIS, 2013). En esta investigación se condujo un estudio clínico de bioequivalencia entre dos formulaciones de fluoxetina, comparando un medicamento de prueba contra el de referencia, a través de un estudio cruzado con 24 sujetos sanos mexicanos. Posteriormente, se evaluó la contribución de variantes genéticas en la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos $C_{máx}$, ABC , $t_{máx}$, $t_{1/2}$, CI y TMR .

El clorhidrato de fluoxetina es un antidepresivo inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (SSRI), indicado para el tratamiento de la depresión, entre otros trastornos neurológicos, ampliamente utilizado a nivel mundial. El registro de su medicamento innovador Prozac® (NDA) se sometió a la FDA en 1983 por Eli Lilly, después de 7 años de investigación y desarrollo farmacéutico, siendo aprobado y lanzado al mercado hasta 1988 en EUA (Wenthur, Bennett, & Lindsley, 2014). Con una historia de 35 años en el mercado, la fluoxetina (Prozac® y genéricos) tuvo un total de prescripciones anuales en el 2020 estimadas solo para EUA en 23,403,050 dosis, con un 30% de estos pacientes reportando su consumo por al menos 90 días (ClinCalc, 2023).

La base de datos internacional *clinicaltrials.gov* tiene reportados a nivel mundial 333 estudios clínicos (fase I a IV) con fluoxetina, siendo 12 de ellos de farmacocinética y bioequivalencia (Clinicaltrials.gov, 2023). En México, en el RNEC se tiene registro de 15 protocolos con fluoxetina, siendo 13 de ellos de biodisponibilidad comparativa y bioequivalencia (COFEPRIS, 2023). Con esto se evidencia el interés e impacto del desarrollo de medicamentos genéricos con este principio activo para el tratamiento de desórdenes mentales desde hace varias décadas.

A pesar de tener mejor eficacia terapéutica que antidepresivos de primera generación, la respuesta clínica de la fluoxetina es aún variable para sus diferentes indicaciones, con 10.6% de pacientes descontinuoando el tratamiento de trastorno depresivo mayor por falta de eficacia terapéutica (Beasley, Koke, Nilsson, & Gonzalez, 2000; Hertzberg, Feldman, Beckham, Kudler, &

Davidson, 2000; Montgomery et al., 1994). Por esta razón, la investigación farmacológica sobre la fluoxetina es aún relevante, ya que la falta de eficacia terapéutica podría deberse a causas farmacocinéticas también, por una alta variabilidad intersujeto de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC reportada para este principio activo, de más de 40% y hasta 57% como se confirmó en este proyecto. Adicionalmente, es relevante explorar la farmacocinética y farmacogenética de antidepresivos entre individuos con diferente ancestría, ya que una dosis homologada ante distintos fenotipos metabolizadores genera variaciones que conducen a falta de eficacia o reacciones adversas, para lo cual es necesario titular la dosis hasta encontrar una posología adecuada para cada paciente (Hongkaew et al., 2021; Sagahón-Azúa et al., 2021).

6.a. Estudio clínico y bioanalítico de bioequivalencia de fluoxetina

En este proyecto se reportan los resultados de un estudio clínico de bioequivalencia, cruzado, de 2 periodos, 2 secuencias, con 24 sujetos sanos mexicanos, entre dos formulaciones (prueba y referencia) de clorhidrato de fluoxetina cápsulas con 20 mg. La edad e IMC entre sujetos masculinos y femeninos no tuvieron diferencias significativas, aunque las diferencias en el peso y talla sí resultan significativas entre géneros. El método bioanalítico para el analito fluoxetina cumplió los parámetros de validación de acuerdo con los requerimientos de la NOM-177-SSA1-2013, y con este protocolo de análisis se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de cada tiempo de muestreo de cada uno de los sujetos participantes.

6.b. Análisis farmacocinético y estadístico de bioequivalencia

La vida media ($t_{1/2}$) de fluoxetina se calculó en promedio en 30.71 h y 31.32 h para la formulación de prueba y de referencia, lo cual es menor a lo reportado en la literatura internacional esperado entre 4 y 6 días (Micromedex, 2016; PLM, 2016). Sin embargo, estos valores coinciden con lo reportado para metabolizadores extensivos (PLM, 2016). Los valores máximos registrados para $t_{1/2}$ en nuestra muestra en estudio fueron de 88.86 y 106.88 h (3.7 y 4.5 días), correspondientes al sujeto 25 para la formulación de prueba y referencia. La $t_{m\acute{a}x}$ promedio se presentó a las 4.34 horas, siendo esto aproximadamente 1 h antes de lo reportado en los datos farmacocinéticos publicados de fluoxetina. Con los valores farmacocinéticos promedio, se tiene

evidencia entonces de una mayoría de sujetos con metabolismo extensivo de fluoxetina en la muestra de población mexicana analizada en este proyecto.

Se concluyó la bioequivalencia entre las formulaciones de prueba y referencia de fluoxetina cápsulas con 20 mg. El intervalo de los cocientes prueba/referencia de los tres parámetros farmacocinéticos $C_{máx}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ estuvieron dentro de los límites de aceptación clásicos de 80-125%. La variabilidad intrasujeto fue de máximo 14.4% para $C_{máx}$. Respecto a la variabilidad intersujeto, el valor calculado fue de hasta 57.12% para $ABC_{0-\infty}$. Se identificaron 5 sujetos con valores de $C_{máx}$ y/o ABC fuera de ± 2 desviaciones estándar (fuera de la distribución normal del 95% de los datos): sujetos 4, 9, 11, 23 y 25.

6.c. Estudio farmacogenético

A partir de los datos obtenidos del microarreglo Infinium GSA 24 v1.0 (Illumina) se evaluó la relación de 54 variantes genéticas (39 variantes relacionadas con citocromos y otras enzimas metabólicas de interés y 15 variantes relacionadas con mecanismos de acción y respuesta a antidepresivos) con los parámetros farmacocinéticos (fenotipo), encontrando asociaciones cuantitativas del genotipo con el fenotipo metabolizador de los sujetos participantes.

En la muestra de estudio se encontraron 4 variantes en 4 genes distintos con diferencias en su frecuencia del alelo minoritario (MAF) con respecto al promedio de poblaciones disponibles (ancestría africana americana, asiáticos del este y del sur, europeos y latinos/americanos mezclados) mayor al 10% (entre 13% y 43%), siendo éstas las variantes *ABCB1* rs2032582, *CYP1A2* rs2069514, *CYP2B6* rs4802101 y *CYP2D6* rs108098. No obstante, es importante recalcar la limitación del tamaño de muestra de este proyecto para los análisis farmacogenéticos, ya que dicho tamaño de muestra fue calculado para confirmar estadísticamente la bioequivalencia con las variables farmacocinéticas $C_{máx}$ y ABC.

Con una estrategia de gen candidato, se identificaron variantes con efecto en las variables farmacocinéticas empleadas como respuesta del modelo: $C_{máx}$, ABC_{0-t} , $t_{máx}$, $t_{1/2}$, Cl y tiempo medio de residencia. Se realizaron modelos de regresión sin y con la inclusión de variables demográficas sin colinealidad entre ellas (IMC, género y edad). De las 54 variantes analizadas de 12 genes relacionados con farmacocinética (5 para *CYP1A2*, 9 para *CYP2B6*, 1 para *CYP2C8*, 5 para *CYP2C9*,

6 para *CYP2C19*, 7 para *CYP2D6*, 5 para *CYP3A4*, y 1 para *CYP3A5*), farmacodinamia y eficacia (3 para *ABCB1*, 3 para *SLC6A4*, 2 para *TPH1*, y 7 para *COMT*), resultaron significativas en el análisis estadístico 34 variantes en 10 genes, de las cuales 29 variantes fueron de 7 citocromos (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, y *CYP3A5*), y 5 de ellas de 3 genes relacionados con farmacodinamia y eficacia (*SLC6A4*, *TPH1*, *ABCB1*).

Entre ellas, las variantes más relevantes fueron *CYP2B6* rs4802101, *CYP2C9* rs2256871, *CYP2C19* rs12769205, *CYP3A4* rs67666821 y del *CYP2D6* las variantes rs28371703, rs1065852 y rs28371706. Las variantes del *CYP2D6* se confirmaron fenotípicamente con el perfil farmacocinético por tener función del citocromo disminuida (*CYP2D6*10*). Se discuten a continuación los genes y sus variantes que resultaron significativos para las variables farmacocinéticas de respuesta en cada modelo (indicados para cada variante), así como el cambio biológico reportado y hallazgos clínicos que se han asociado a éstas:

- *CYP2B6*

○ rs4802101 → $C_{m\acute{a}x}$

- c.-750T>C: Ubicado en un sitio de unión putativo para el factor de transcripción del factor nuclear de hepatocitos-1 α .
- Portadores de -750C tienen una expresión más baja de *CYP2B6* en comparación con -750T.
- Los pacientes con alelo CC presentan metabolismo disminuido de ciclofosfamida, mientras que los que tienen alelo TT presentan metabolismo incrementado para este fármaco (PharmGKB, 2022b).
- Removida del haplotipo *CYP2B6*28* por evidencia inconsistente sobre si está incluida en este haplotipo (Desta *et al.*, 2021; Rotger *et al.*, 2007).
- Variante con anotación clínica en nivel de evidencia 3.
- Interacción entre antidepresivos puede deberse a inhibición de *CYP2B6* (Hesse *et al.*, 2000)

- *CYP2C9*

○ rs2256871 → $t_{m\acute{a}x}$

- c.752A>G

- p.His251Arg
 - Parte del haplotipo *CYP2C9*9*
 - Alelo G está asociado con expresión disminuida de *CYP2C9* comparado con el alelo A (Zhang *et al.*, 2020).
 - Alelo G está asociado con una disminución del metabolismo de la warfarina en pacientes cardiacos en comparación con el alelo A.
- *CYP2C19*
- rs12769205 → CI
 - 17687 A>G
 - Variante intrónica de pérdida de función.
 - Forma parte del haplotipo *CYP2C19*35*. También asociada con el *CYP2C19*2* (Chaudhry *et al.*, 2015).
 - SNV con impacto conocido en terapia con otros medicamentos, como clopidogrel (Brown & Pereira, 2018).
- *CYP2D6*:
- rs28371703 → ABC_{0-t}, t_{1/2} y CI
 - c.974C>A
 - p.Leu91Met
 - Variante incluida en los haplotipos: *CYP2D6*1, *1xN, *2xN, *3xN, *4, *4xN, *6xN, *9x2, *10x2, *17x2, *29x2, *35xN, *36xN, *41x2, *43xN, *45xN, *74, *82 y *160* (Hicks *et al.*, 2015)
 - Anotación clínica para los fármacos tamoxifeno, paroxetina, risperidona, amitriptilina y agentes antineoplásicos.
 - Variante con anotación clínica en nivel 1A y 3.
 - rs1065852 → t_{1/2}
 - c.100C>T
 - p.Pro34Ser
 - Variante considerada en los haplotipos: *CYP2D6*1, *1xN, *2xN, *3xN, *4, *4xN, *6xN, *9x2, *10, *10x2, *17x2, *29x2, *35xN, *36, *36xN, *37,*

*41x2, *43xN, *45xN, *47, *49, *52, *54, *56, *57, *64, *65, *69, *72, *87, *94, *95, *99, *100, *101, *114, *132, *142 y *147 (Hicks *et al.*, 2015)

- Variante con anotación clínica en nivel de evidencia 1A y 3.
- rs28371706 → $t_{1/2}$ y CI
 - c.1023C>T
 - p.Thr107Ile
 - Anotación clínica para fármacos debrisoquinona, dextrometorfano, codeína, meoprolol y bufuralol.
 - Variante considerada en los haplotipos: *CYP2D6**1, *1xN, *2xN, *3xN, *4xN, *6xN, *9x2, *10x2, *17, *17x2, *29x2, *35xN, *36xN, *40, *41x2, *43xN, *45xN, *58, *64, *82, *141 y *154 (Hicks *et al.*, 2015)
 - Genotipos AA + AG están asociados con una disminución de la depuración (aclaramiento) de nevirapina en niños con VIH en comparación con el genotipo GG.
 - Variante con anotación clínica en nivel de evidencia 1A y 3.
- *CYP3A4*
 - rs67666821 → CI (modelo sin covariables demográficas género y edad)
 - Delección g.31002dup
 - Variante considerada en los haplotipos *CYP3A4**1 (alelo T) y *20 (genotipo TT).
 - Variante p.P488fs genera proteína truncada con pérdida completa de la función enzimática (Gómez-Bravo *et al.*, 2018).
 - Alelo T (Genotipo TT) está asociado con una menor tasa metabólica (Saiz-Rodríguez *et al.*, 2020).
 - Anotación clínica para fármacos midazolam, tacrolimus, ambrisentan, aripiprazol y atorvastatina.
 - Variante con anotación clínica en nivel de evidencia 3 principalmente.

El citocromo CYP2D6 resulta de los más importantes en farmacología, siendo aún compleja la clasificación de sus haplotipos con un fenotipo metabolizador específico, lo cual ha sido explorado por diversas guías y estudios, incluso aplicando técnicas de predicción computacional mediante redes neuronales (Caudle et al., 2020; McInnes et al., 2020; Ray, Ozcagli, Sadee, & Wang, 2019). Confirmado con la información reportada para fluoxetina, entre ella una anotación de la FDA en la etiqueta del medicamento (PharmGKB, 2022a), las variantes del gen *CYP2D6* resultan relevantes para el metabolismo de este fármaco, por ser un sustrato de alta afinidad e inhibidor competitivo importante (Deodhar et al., 2021; Sager et al., 2014).

Con nuestros resultados fue posible la cuantificación del impacto en las variables farmacocinéticas, especialmente del genotipo *CYP2D6* rs1065852 A/A, con el cual se incrementó la vida media plasmática alrededor de 3 veces con respecto a los genotipos A/G y G/G, y confirmando fenotípicamente a este sujeto como metabolizador *lento* en nuestra muestra de estudio. Esta variante forma parte del haplotipo *CYP2D6*10*, conocido por tener función disminuida del citocromo junto con otras variantes del gen *CYP2D6* (Caudle et al., 2020). Este hallazgo es consistente con la literatura, ya que se ha reportado una frecuencia alélica de entre 2.8% y hasta 4.3% en poblaciones caucásicas, hispánicas y afroamericanas (Reyes-Barron et al., 2016) para esta variante, lo cual coincide con los resultados de este estudio clínico por haberse encontrado en uno de 24 voluntarios (4.2%). Adicionalmente, tras remover los datos farmacocinéticos de este sujeto, se logró controlar la variabilidad intersujeto de fluoxetina entre 4.2% y hasta 13.7% en los parámetros farmacocinéticos de ABC.

Se presentaron dos genotipos distintos en las variantes *CYP2D6* rs28371703 y *CYP2D6* rs28371706 en nuestra muestra. Con la variante *CYP2D6* rs28371703, los sujetos heterocigotos A/C tienden a exhibir tiempos de vida media mayores y más variables (sesgados positivamente), en promedio 10 h arriba del promedio de los homocigotos C/C. Sin embargo, dado el limitado tamaño de muestra en estudio, esta evidencia se considera descriptiva y no confirmatoria.

En resumen, en este estudio clínico se encontró que la genotipificación resulta una herramienta útil para la predicción de fenotipos farmacocinéticos distintos para el fármaco clorhidrato de fluoxetina. Con esta estrategia, fue posible controlar hasta en un 13.7% la variabilidad intersujeto de fluoxetina en los parámetros farmacocinéticos de ABC en este estudio con 24 sujetos sanos mexicanos. De esta forma, se podría evitar la incidencia de reacciones adversas a los medicamentos administrados en

estudio, principalmente por posible toxicidad en caso de presentarse concentraciones plasmáticas elevadas por lento metabolismo del fármaco. Esta evidencia fue obtenida a pesar de la limitación del tamaño de muestra de este estudio farmacogenético, en el marco de un estudio de bioequivalencia cuyo tamaño de muestra resultó ser suficiente y con adecuada potencia estadística para el objetivo primario de determinar bioequivalencia.

7. Conclusiones y perspectivas

En el marco de los estudios de intercambiabilidad y bioequivalencia, las variables farmacocinéticas se estudian con la finalidad de determinar estadísticamente si una formulación de prueba puede ser considerada bioequivalente con respecto a una formulación de referencia. Por otro lado, el conocimiento de la farmacocinética de los principios activos en diferentes poblaciones es importante, ya que contribuye a identificar variaciones en la cantidad o velocidad de absorción de los fármacos. Más aún, la evaluación farmacogenética contribuye a profundizar en el conocimiento y avanzar en la exploración farmacológica de principios activos.

En este proyecto, la caracterización farmacocinética y farmacogenética en el marco de un estudio de bioequivalencia con clorhidrato de fluoxetina en sujetos sanos mexicanos resulta una contribución relevante, ya que es una demostración de la utilidad de realizar análisis farmacogenéticos en estudios clínicos controlados y aleatorizados. Con esto, se destaca la importancia de la exploración de aquellos fármacos con evidencia de variabilidad farmacocinética intersujeto alta en población mexicana, lo cual podría ser una de las razones por las cuales se tienen diferencias importantes en la eficacia y/o seguridad clínica entre sujetos como resultado del tratamiento farmacológico, así como se presenta en varios antidepresivos, como los del grupo de los SSRIs.

Con más evidencias de la relación farmacocinética-farmacogenética, y con mayor acceso a pruebas de genotipificación en las diferentes regiones del mundo, será cada vez más común que se establezcan y soliciten análisis de variantes farmacogenéticas de interés en pacientes. Esto ya es una realidad en múltiples países de Europa y en América del Norte, con pruebas de genotipificación a precios accesibles y disponibles fácilmente para la población general.

Las agencias sanitarias alrededor del mundo requirieron más evidencias científicas para solicitar o recomendar estas pruebas farmacogenéticas dadas variaciones esperadas en diferentes poblaciones. Es un hecho que la FDA y la agencia europea de medicamentos (EMA) consideran ya guías farmacogenéticas en su regulación actualmente. Por ejemplo, a la fecha la FDA tiene recomendaciones sobre asociaciones fármaco-gen para 62 fármacos respecto a su manejo terapéutico, para 22 fármacos con respecto a evidencias de seguridad y respuesta, y para 40 fármacos con asociación en su farmacocinética (FDA, 2023). Se espera que, en el futuro, este tipo

de recomendaciones sobre interacciones fármaco-gen puedan ser integradas a la regulación sanitaria de países como México, y en Latinoamérica en general.

De las variantes seleccionadas para estudiar mediante la estrategia de gen candidato, en este estudio fue posible identificar como significativas y cuantificar el efecto sobre la farmacocinética de 34 variantes de 10 genes con relevancia en metabolismo de fluoxetina, 29 de ellas en 7 citocromos (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, y *CYP3A5*), y 5 variantes en 3 genes relacionados con PD y eficacia (*SLC6A4*, *TPH1*, y *ABCB1*). Respecto al control de la variabilidad intersujeto, fue posible confirmar una reducción de hasta 13.7% en la variabilidad en el parámetro farmacocinético $ABC_{0-\infty}$ con la variante rs1065852 del gen *CYP2D6*, parte del haplotipo *CYP2D6*10*, conocido por presentar función disminuida de dicho citocromo.

Dado que el tamaño de muestra necesario para estudios de bioequivalencia es alrededor de 10 veces menor en términos generales con respecto al requerido para estudios farmacogenéticos de asociación, una sugerencia derivada de este trabajo es incluir un componente farmacogenético en estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia como un objetivo secundario. De esta forma, se compilará información farmacogenética exploratoria en el marco de los estudios de bioequivalencia ejecutados en cada país de acuerdo con las regulaciones locales.

Finalmente, este estudio reportado podría ser de utilidad futura para el diseño de estudios clínicos de bioequivalencia, ya que la genotipificación prospectiva puede ser empleada como una herramienta para controlar la variabilidad intrasujeto en un estudio controlado y aleatorizado, así como evitar posibles reacciones adversas ligadas a genotipos conocidos. Dicha propuesta se hará cada vez más factible con más experiencias y datos de estudios de bioequivalencia con un componente farmacogenético, para la identificación de nuevas variantes de interés y confirmación de asociación con principios activos particulares en diferentes poblaciones a nivel mundial.

La tendencia mundial hacia la medicina personalizada requiere que la comunidad científica-médica tenga un conocimiento más extenso de la caracterización genética, con impacto en la farmacocinética y farmacodinamia, así como en la seguridad y eficacia de fármacos. Por lo tanto, es necesario continuar las investigaciones en esta dirección en diferentes poblaciones a

nivel internacional. Con este estudio, así como algunos otros similares realizados previamente en México y el mundo, se confirma el interés en la caracterización genotípica de los sujetos participantes en estudios farmacológicos, especialmente relevante en poblaciones donde la genotipificación es aún poco accesible para la población general.

8. Referencias

- Abdullah-Koolmees, H., van Keulen, A. M., Nijenhuis, M., & Deneer, V. H. M. (2021). Pharmacogenetics Guidelines: Overview and Comparison of the DPWG, CPIC, CPNDS, and RNPgX Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595219>
- Alfaro, C. L., Lam, Y. W. F., Simpson, J., & Ereshefsky, L. (2000). CYP2D6 Inhibition by Fluoxetine, Paroxetine, Sertraline, and Venlafaxine in a Crossover Study: Intraindividual Variability and Plasma Concentration Correlations. *The Journal of Clinical Pharmacology*, *40*(1), 58–66. <https://doi.org/10.1177/009127000004000108>
- Alfirevic, A., & Pirmohamed, M. (2017). Genomics of Adverse Drug Reactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 38. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.11.003>
- Alpharma, L. (2016). Transkrip. In *PLM*. PLM.
- Alwi, Z. Bin. (2005). The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, *12*(2), 4–12. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3349395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Anderson, C. A., Pettersson, F. H., Clarke, G. M., Cardon, L. R., Morris, A. P., & Zondervan, K. T. (2010). Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature Protocols*, *5*(9), 1564–1573. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.116>
- Approved Labeling Enclosure. PROZAC® FLUOXETINE HYDROCHLORIDE. (n.d.). In *NDA 18-936/S-064*. <https://doi.org/10.1038/nrd1387>
- Bal-Price, A., & Jennings, P. (2014). In *In Vitro Toxicology Systems* (1st ed.; A. Bal-Price & P. Jennings, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0521-8>
- Basit, A., Neradugomma, N. K., Wolford, C., Fan, P. W., Murray, B., Takahashi, R. H., ... Prasad, B. (2020). Characterization of Differential Tissue Abundance of Major Non-CYP Enzymes in Human. *Molecular Pharmaceutics*, *17*(11), 4114–4124. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00559>
- Beasley, C. M., Koke, S. C., Nilsson, M. E., & Gonzalez, J. S. (2000). Adverse events and treatment discontinuations in clinical trials of fluoxetine in major depressive disorder: An updated meta-analysis. *Clinical Therapeutics*, *22*(11), 1319–1330. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(00\)83028-3](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(00)83028-3)
- Blazquez, A., Mas, S., Plana, M. T., Lafuente, A., & Lazaro, L. (2012). Fluoxetine pharmacogenetics in child and adult populations. *European Child and Adolescent Psychiatry*, *21*(11), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s00787-012-0305-6>
- Blier, P. (2001). Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *62 Suppl 1*, 12–17. Retrieved from <https://www.psychiatrist.com/JCP/article/Pages/pharmacology-rapid-onset-antidepressant-treatment.aspx>
- Borobia, A. M., Novalbos, J., Guerra-López, P., López-Rodríguez, R., Tabares, B., Rodríguez, V., ... Carcas, A. J. (2009). Influence of sex and CYP2D6 genotype on mirtazapine disposition, evaluated in Spanish healthy volunteers. *Pharmacological Research*, *59*(6), 393–398. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.02.006>
- Brown, S.-A., & Pereira, N. (2018). Pharmacogenomic Impact of CYP2C19 Variation on Clopidogrel Therapy in Precision Cardiovascular Medicine. *Journal of Personalized Medicine*, *8*(1), 8. <https://doi.org/10.3390/jpm8010008>
- Cacabelos, R. (2015). Pharmacogenomics of Antidepressants. *Psychiatry, Depression & Anxiety*, *1*(1), 1–42. <https://doi.org/10.24966/PDA-0150/100001>
- Candelaria, M., Gallardo-Rincón, D., Arce, C., Cetina, L., Aguilar-Ponce, J. L., Arrieta, Ó., ... Dueñas-González, A. (2007). A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Annals of Oncology*, *18*(9), 1529–1538. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm204>
- Cariaso, M., & Lennon, G. (2012). SNPedia: a wiki supporting personal genome annotation, interpretation and analysis. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D1308–D1312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr798>
- Carrasco Portugal, M. del C. (2008). *Estudios farmacocinéticos en mexicanos. Evidencia de diferencias interétnicas y sus posibles causas*. Instituto Politécnico Nacional.
- Caudle, K. E., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Swen, J. J., Haidar, C. E., Klein, T. E., ... Gaedigk, A. (2020). Standardizing CYP 2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clinical and*

- Translational Science*, 13(1), 116–124. <https://doi.org/10.1111/cts.12692>
- Certara. (2017). *Phoenix WinNonlin*. Retrieved from <https://www.certara.com/software/pkpd-modeling-and-simulation-2/phoenix-winnonlin-2/>
- Chaudhry, A. S., Prasad, B., Shirasaka, Y., Fohner, A., Finkelstein, D., Fan, Y., ... Schuetz, E. G. (2015). The CYP2C19 Intron 2 Branch Point SNP is the Ancestral Polymorphism Contributing to the Poor Metabolizer Phenotype in Livers with CYP2C19*35 and CYP2C19*2 Alleles. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(8), 1226–1235. <https://doi.org/10.1124/dmd.115.064428>
- Chen, S., Francioli, L. C., Goodrich, J. K., Collins, R. L., Kanai, M., Wang, Q., ... Karczewski, K. J. (2022). A genome-wide mutational constraint map quantified from variation in 76,156 human genomes. *BioRxiv*, 2022.03.20.485034. <https://doi.org/10.1101/2022.03.20.485034>
- Chow, S.-C., & Liu, J. (2008). *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies* (3rd ed.). CRC Press.
- ClinCalc. (2023). Drug Usage Statistics, United States, 2013 - 2020. Retrieved May 5, 2023, from ClinCalc DrugStats Database version 2022.08 website: <https://clincalc.com/DrugStats/Drugs/Fluoxetine>
- Clinicaltrials.gov. (2023). Studies found for: bioequivalence | Prozac. Retrieved May 5, 2023, from Clinicaltrials.gov website: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results/details?term=bioequivalence&intr=Prozac>
- COFEPRIS. NOM-177-SSA1-2013. , Norma Oficial Mexicana § (2013).
- COFEPRIS. (2023). Registro Nacional de Estudios Clínicos (RNEC) / Consultas de ensayos clínicos registrados: Fluoxetina. Retrieved May 5, 2023, from RNEC website: <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.asp>
- Cohen, N. (2008). Pharmacogenomics and Personalized Medicine. In N. Cohen (Ed.), *Methods in Pharmacology and Toxicology* (1st ed.). <https://doi.org/10.1272/manms.8.9>
- Company, E. L. (2006). Prozac Fluoxetine PV5321 DPP. In *Eli Lilly & Company*.
- Cruz-Correa, O. F., León-Cachón, R. B. R., Barrera-Saldaña, H. A., & Soberón, X. (2017). Prediction of atorvastatin plasmatic concentrations in healthy volunteers using integrated pharmacogenetics sequencing. *Pharmacogenomics*, 18(2), 121–131. <https://doi.org/10.2217/pgs-2016-0072>
- de Leon, J. (2006). AmpliChip CYP450 test: personalized medicine has arrived in psychiatry. *Future Drugs*, 6(3), 277–286. <https://doi.org/10.1586/14737159.6.3.277>
- de Leon, J., Armstrong, S. C., & Cozza, K. L. (2006). Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics*, 47(1), 75–85. <https://doi.org/10.1176/appi.psy.47.1.75>
- Deodhar, M., Rihani, S. B. Al, Darakjian, L., Turgeon, J., & Michaud, V. (2021). Assessing the Mechanism of Fluoxetine-Mediated CYP2D6 Inhibition. *Pharmaceutics*, 13(2), 148. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020148>
- Desta, Z., El-Boraie, A., Gong, L., Somogyi, A. A., Lauschke, V. M., Dandara, C., ... Gaedigk, A. (2021). PharmVar GeneFocus: CYP2B6. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 110(1), 82–97. <https://doi.org/10.1002/cpt.2166>
- DiStefano, J. K. (2011). Disease Gene Identification. Methods and Protocols. In J. K. DiStefano (Ed.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 700). <https://doi.org/10.1007/978-1-61737-954-3>
- Dorado, P., Sosa-Macias, M. G., Penas-Lledo, E. M., Alanis-Banuelos, R., Lares-Asseff, I., Wong, M., ... Llerena, A. (2011). CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo , Mexican-Tepehuano , and Spaniards. *The Pharmacogenomics Journal*, 450(11), 108–112. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.29>
- DrugBank. (2021). Fluoxetine. Retrieved from DrugBank website: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00472>
- Ekström, L., Skilving, I., Ovesjö, M.-L., Aklillu, E., Nylén, H., Rane, A., ... Björkhem-Bergman, L. (2015). miRNA-27b levels are associated with CYP3A activity in vitro and in vivo. *Pharmacology Research & Perspectives*, 3(6), 1–7. <https://doi.org/10.1002/prp2.192>
- EMA. *ICH Topic E 9: Statistical Principles for Clinical Trials*. , (1998).
- EMA. (2005). *FLUOXETINA STADA cápsulas EFG*. Retrieved from https://www.stada.es/sites/default/files/productos/estudios/RESUMEN-_BIOEQUIVAL_Fluoxetina_200505.pdf
- EMA. (2011). *Guideline on the use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products*.
- Fairley, S., Lowy-Gallego, E., Perry, E., & Flicek, P. (2020). The International Genome Sample Resource (IGSR) collection of open human genomic variation resources. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz836>

- Fan, J., & Liu, H. (2013). Statistical analysis of big data on pharmacogenomics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(7), 987–1000. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.008>
- FDA. (2013). Clinical pharmacogenomics: Premarket evaluation in early-phase clinical studies and recommendations for labeling. In *Guidance for industry*. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guidance+for+Industry+Clinical+Pharmacogenomics:+Premarket+Evaluation+in+Early-Phase+Clinical+Studies+and+Recommendations#0%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guida>
- FDA. (2023). Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. Retrieved October 2, 2023, from <https://www.fda.gov/drugs/science-and-research-drugs/table-pharmacogenomic-biomarkers-drug-labeling>
- Finberg, J. P. M., & Rabey, J. M. (2016). Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. *Frontiers in Pharmacology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00340>
- Fricke-Galindo, I, Céspedes-Garro, C., Rodrigues-Soares, F., Naranjo, M. E. G., Delgado, Á., de Andrés, F., ... Llerena, A. (2016). Interethnic variation of CYP2C19 alleles, 'predicted' phenotypes and 'measured' metabolic phenotypes across world populations. *The Pharmacogenomics Journal*, 16(2). <https://doi.org/10.1038/tpj.2015.70>
- Fricke-Galindo, Ingrid, Jung-Cook, H., Llerena, A., & Lopez-Lopez, M. (2016). Interethnic variability of pharmacogenetic biomarkers in Mexican healthy volunteers: A report from the RIBEF (Ibero-American Network of Pharmacogenetics and Pharmacogenomics). *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, Vol. 31. <https://doi.org/10.1515/dmpt-2015-0030>
- Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2001). *Pharmacokinetic & Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications* (4th ed.). Sweden: Apotekassocieteten.
- Garcés-Eisele, S. J., Cedillo-Carvalho, B., Reyes-Núñez, V., Estrada-Marín, L., Vázquez-Pérez, R., Juárez-Calderón, M., ... Ruiz-Argüelles, A. (2014). Genetic selection of volunteers and concomitant dose adjustment leads to comparable hydralazine/valproate exposure. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 39(4), 368–375. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12155>
- García-Roca, P., Medeiros, M., Reyes, H., Rodríguez-Espino, B. A., Alberu, J., Ortiz, L., ... Castaneda-Hernandez, G. (2012). CYP3A5 Polymorphism in Mexican Renal Transplant Recipients and its Association with Tacrolimus Dosing. *Archives of Medical Research*, 43(4), 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.05.005>
- Gassó, P., Rodríguez, N., Mas, S., Pagerols, M., Blázquez, A., Plana, M. T., ... Lafuente, A. (2014). Effect of CYP2D6, CYP2C9 and ABCB1 genotypes on fluoxetine plasma concentrations and clinical improvement in children and adolescent patients. *The Pharmacogenomics Journal*, (14), 457–462. <https://doi.org/10.1038/tpj.2014.12>
- GBCGroup. (2015). Diversidad genética y farmacogenómica en poblaciones mexicanas. Retrieved June 1, 2016, from Global Biotech Consulting Group website: <http://www.gbcbiotech.com/farmacogenomica/diversidad.html>
- Gómez-Bravo, M. A., Apellaniz-Ruiz, M., Salcedo, M., Fondevila, C., Suarez, F., Castellote, J., ... Rodríguez-Antona, C. (2018). Influence of donor liver CYP3A4*20 loss-of-function genotype on tacrolimus pharmacokinetics in transplanted patients. *Pharmacogenetics and Genomics*, 28(2), 41–48. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000321>
- González-Vacarezza, N., Abad-Santos, F., Carcas-Sansuan, A., Dorado, P., Peñas-Lledó, E., Estévez-Carrizo, F., & Llerena, A. (2012). Use of pharmacogenetics in bioequivalence studies to reduce sample size: an example with mirtazapine and CYP2D6. *The Pharmacogenomics Journal*, 13(5), 452–455. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.29>
- González, H. M., Gómez-Martínez, L. E., Chávez C, T. D. J., Treviño, R., Romero, E. M., & Hoyo-Vadillo, C. (2006). Prevalence of CYP2C19 and CYP3A4 in poor metabolizers among inhabitants of Tlaxcala, Mexico. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 49(January), 102–103. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L46657577%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00838969&id=doi:&atitle=Prevalence+of+CYP2C19+and+CYP3A4+in+poor+metabolizers+among+inhabitants+of+Tlaxcala,+Mexico&stilt>
- Ham, B.-J., Lee, B.-C., Paik, J.-W., Kang, R.-H., Choi, M.-J., Choi, I.-G., & Lee, M.-S. (2007). Association between the tryptophan hydroxylase-1 gene A218C polymorphism and citalopram antidepressant response in a Korean population. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(1), 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.08.001>

- Henry, R. J., & Walker, J. M. (2013). *Pharmacogenomics. Methods and protocols* (1st ed.; F. Innocenti & R. H. N. van Schaik, Eds.). Humana Press.
- Hernández-Lemus, E. (2013). Computational pharmacogenomics. In D. Barch (Ed.), *Omics for Personalized Medicine* (pp. 163–186). https://doi.org/10.1007/978-81-322-1184-6_8
- Hertzberg, M., Feldman, M., Beckham, J., Kudler, H., & Davidson, J. (2000). Lack of Efficacy for Fluoxetine in PTSD: A Placebo Controlled Trial in Combat Veterans. *Annals of Clinical Psychiatry, 12*(2), 101–105. <https://doi.org/10.3109/10401230009147096>
- Hesse, L. M., Venkatakrishnan, K., Court, M. H., Moltke, L. L. von, Duan, S. X., Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (2000). CYP2B6 Mediates the In Vitro Hydroxylation of Bupropion: Potential Drug Interactions with Other Antidepressants. *Drug Metabolism and Disposition, 28*(10), 1176 LP – 1183. Retrieved from <http://dmd.aspetjournals.org/content/28/10/1176.abstract>
- Hicks, J. K., Bishop, J. R., Sangkuhl, K., Muller, D. J., Ji, Y., Leckband, S. G., ... Gaedigk, A. (2015). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clinical Pharmacology and Therapeutics, 98*(2), 127–134. <https://doi.org/10.1002/cpt.147>
- Hodgson, K., Mufti, S., Uher, R., & McGuffin, P. (2012). Genome-wide approaches to antidepressant treatment: working towards understanding and predicting response. *Genome Medicine, 4*(6), 52. <https://doi.org/10.1186/gm351>
- Hongkaew, Y., Gaedigk, A., Willfert, B., Ngamsamut, N., Kittitharaphan, W., Limsila, P., & Sukasem, C. (2021). Relationship between CYP2D6 genotype, activity score and phenotype in a pediatric Thai population treated with risperidone. *Scientific Reports, 11*(1), 4158. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83570-w>
- IBM. (2017). *SPSS Statistics*. Retrieved from <https://www.ibm.com/mx-es/analytics/spss-statistics-software>
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (1996). Guideline for good clinical practice E6(R1). *ICH Harmonised Tripartite Guideline, June*(4). Retrieved from http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf
- ICH Harmonised Tripartite Guideline. (1997). General Considerations for Clinical Trials- E8. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 4*(July).
- Illumina. (2015). *Infinium® Global Screening Array-24 v1.0*. Retrieved from <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/infinium-commercial-gsa-data-sheet-370-2016-016.pdf>
- Illumina. (2023). GenomeStudio v2.0.5. Retrieved from <https://support.illumina.com/downloads/genomestudio-2-0.html>
- INMEGEN. (2015). The Mexican Genome Diversity Project. Retrieved June 9, 2016, from Genoma 1.66 website: <http://diversity.inmegen.gob.mx/>
- Jacobo-Cabral, C. O., Garcia-Roca, P., Romero-Tejeda, E. M., Reyes, H., Medeiros, M., Castaneda-Hernandez, G., & Troconiz, I. F. (2015). Population pharmacokinetic analysis of tacrolimus in Mexican paediatric renal transplant patients: Role of CYP3A5 genotype and formulation. *British Journal of Clinical Pharmacology, 80*(4), 630–641. <https://doi.org/10.1111/bcp.12649>
- Ji, Y., Biernacka, J., Snyder, K., Drews, M., Pellemounter, L., Colby, C., ... Weinshilboum, R. (2012). Catechol O-methyltransferase pharmacogenomics and selective serotonin reuptake inhibitor response. *Pharmacogenomics Journal, 12*(1), 78–85. <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.69>
- Joas, E., Jonsson, L., Viktorin, A., Smedler, E., Pålsson, E., Goodwin, G., & Landén, M. (2021). Effect of CYP2C19 polymorphisms on antidepressant prescription patterns and treatment emergent mania in bipolar disorder patients. *European Neuropsychopharmacology, 53*(March), S420–S421. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.10.541>
- Jovanović, D., Kilibarda, V., Dordević, S., Jovanović, M., Jović-Stošić, J., Srdić, D., & Knežević, T. (2006). Bioequivalence testing of a new tablet formulation of generic fluoxetine. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 31*(1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF03190640>
- Julious, S. (2004). Tutorial in biostatistics. Sample sizes for clinical trials with Normal data. *Statistics in Medicine, 23*, 1921–1986.
- Kandasamy, M., Tripathy, K., Ravi, S., Kamath, N., Pai, B., Srinivas, N., ... Thangam, S. (2011). Unsuspected poor metabolizer phenotypes of fluoxetine in bioavailability/bioequivalence studies from an Indian population perspective. *Arzneimittelforschung, 60*(01), 12–21. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296243>

- Kato, M., Fukuda, T., Serretti, A., Wakeno, M., Okugawa, G., Ikenaga, Y., ... Kinoshita, T. (2008). ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(2), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.09.003>
- Khojasteh, S. C., Wong, H., & Hop, C. E. C. A. (2011). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics. Quick Guide* (Vol. 91). <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.35>
- Kidd, K. K. (2016). The ALlele FREquency Database (ALFRED). Retrieved June 9, 2016, from NSF Grant website: <https://alfred.med.yale.edu/alfred/index.asp>
- Kirchheiner, J., Henckel, H.-B., Meineke, I., Roots, I., & Brockmöller, J. (2004). Impact of the CYP2D6 Ultrarapid Metabolizer Genotype on Mirtazapine Pharmacokinetics and Adverse Events in Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 24(6), 647–652. <https://doi.org/10.1097/01.jcp.0000145341.30547.f0>
- Kirchheiner, J., Keulen, J.-T. H. A., Bauer, S., Roots, I., & Brockmöller, J. (2008). Effects of the CYP2D6 Gene Duplication on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Tramadol. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 28(1), 78–83. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e318160f827>
- Landau, R., Bollag, L. A., & Kraft, J. C. (2012). Pharmacogenetics and anaesthesia: The value of genetic profiling. *Anaesthesia*, 67(2), 165–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2011.06918.x>
- Larson, R. S. (2012). Bioinformatics and Drug Discovery. In R. Larson (Ed.), *Springer Protocols, Methods in Molecular Biology* (2nd ed., Vol. 531). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_1
- Lazalde Ramos, B. P. (2012). *Polimorfismos de relevancia farmacogenética de las Familias CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 y CYP3A4 en población indígena del Noroeste de México*. Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura.
- Lee, H. Y., & Lee, Y. jin. (2016). The data analysis tool for average bioequivalence (ABE) and bioavailability (BA) (BEAR v2.7.7). Retrieved June 9, 2016, from CRAN Repository website: <http://pkpd.kmu.edu.tw/bear/>
- Lee, S. J. (2013). Clinical application of CYP2C19 pharmacogenetics toward more personalized medicine. *Frontiers in Genetics*, 3(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00318>
- Licinio, J., & Wong, M. L. (2011). Pharmacogenomics of antidepressant treatment effects. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(1), 63–71.
- Liu, Z.-Q., Zhu, B., Tan, Y.-F., Tan, Z.-R., Wang, L.-S., Huang, S.-L., ... Zhou, H.-H. (2002). O- Dealkylation of Fluoxetine in Relation to CYP2C19 Gene Dose and Involvement of CYP3A4 in Human Liver Microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(1), 105–111. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.105>
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. In *Technical Note 52646*. Retrieved from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Matthiesen, R. (2010). *Bioinformatics Methods in Clinical Research* (Vol. 593). <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-194-3>
- McInnes, G., Dalton, R., Sangkuhl, K., Whirl-Carrillo, M., Lee, S., Tsao, P. S., ... Woodahl, E. L. (2020). Transfer learning enables prediction of CYP2D6 haplotype function. *PLOS Computational Biology*, 16(11), e1008399. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008399>
- Micromedex. (2016). Fluoxetine Chlorhidrate. In *Truven Health Analytics LLC*. Truven Health Analytics LLC.
- Montgomery, D. B., Roberts, A., Green, M., Bullock, T., Baldwin, D., & Montgomery, S. A. (1994). Lack of efficacy of fluoxetine in recurrent brief depression and suicidal attempts. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 244(4), 211–215. <https://doi.org/10.1007/BF02190400>
- Moraes, M. O., Lerner, F. E., Corso, G., Bezerra, F. A. F., Moraes, M. E. A., & De Nucci, G. (1999). Fluoxetine Bioequivalence Study: Quantification of Fluoxetine and Norfluoxetine by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 39(10), 1053–1061. <https://doi.org/10.1177/00912709922011827>
- Najib, N. M., Idrakeid, N., Beshtawi, M., Mohammed, B., Admour, I., Alam, S. M., ... Qumaruzaman. (2005). Bioequivalence evaluation of two brands of fluoxetine 20 mg capsules (Flutin and Prozac) in healthy human volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 26(6), 243–247. <https://doi.org/10.1002/bdd.456>
- Niitsu, T., Fabbri, C., Bentini, F., & Serretti, A. (2013). Pharmacogenetics in major depression: A comprehensive meta-analysis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.011>
- Ozawa, S., Soyama, A., Saeki, M., Fukushima-Uesaka, H., Itoda, M., Koyano, S., ... Sawada, J.-I. (2004). Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1. *Drug Metabolism and*

- Pharmacokinetics*, 19(2), 83–95. <https://doi.org/10.2133/dmpk.19.83>
- Palma-Aguirre, J. A., González-Llaven, J., Flores-Murrieta, F. J., & Castañeda-Hernández, G. (1997). Bioavailability of Oral Cyclosporine in Healthy Mexican Volunteers: Evidence for Interethnic Variability. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 37(7), 630–634. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1552-4604.1997.tb04346.x/abstract>
- Pander, J., Wessels, J. A., Mathijssen, R. H., Gelderblom, H., & Guchelaar, H.-J. (2010). Pharmacogenetics of tomorrow: the 1 + 1 = 3 principle. *Pharmacogenomics*, 11(7), 1011–1017. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2928-5>
- Patel, H., Lee, S., Breen, G., Menzel, S., Ojewunmi, O., & Dobson, R. J. B. (2022). The COPILOT Raw Illumina Genotyping QC Protocol. *Current Protocols*, 2(4). <https://doi.org/10.1002/cpz1.373>
- Perez, C. (2004). *Técnicas de Análisis Multivariante de Datos. Aplicaciones con SPSS*. Pearson Prentice Hall.
- Peters, E. J., Reus, V., & Hamilton, S. P. (2009). The ABCB1 transporter gene and antidepressant response. *F1000 Biology Reports*, 1. <https://doi.org/10.3410/B1-23>
- Phan, J., Yin, Y., Zhang, H., Qiang, W., & Shekhtman, E. (2020). ALFA: Allele Frequency Aggregator. Retrieved from National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine website: www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/
- PharmGKB. (2021a). Clinical Annotation Levels of Evidence. Retrieved from PharmGKB website: <https://www.pharmgkb.org/page/clinAnnLevels>
- PharmGKB. (2021b). Fluoxetine. Retrieved from <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449673>
- PharmGKB. (2021c). Scoring of PharmGKB Clinical Annotations. Retrieved from PharmGKB website: <https://www.pharmgkb.org/page/clinAnnScoring>
- PharmGKB. (2021d). SLC6A4. Clinical Annotations. Retrieved from <https://www.pharmgkb.org/gene/PA312/clinicalAnnotation>
- PharmGKB. (2022a). Annotation of FDA Label for fluoxetine and CYP2D6. Retrieved from PharmGKB website: Annotation of FDA Label for fluoxetine and CYP2D6%0A
- PharmGKB. (2022b). Clinical Annotation for rs4802101 (CYP2B6); cyclophosphamide; Lupus erythematosus (level 3 Toxicity, Metabolism/PK). Retrieved from <https://www.pharmgkb.org/clinicalAnnotation/1446908002>
- PharmGKB. (2022c). The Pharmacogenomics Knowledgebase. Retrieved from PharmaGKB website: <https://www.pharmgkb.org/>
- Phillips, I. R., Shephard, E. A., & Ortiz de Montellano, P. (2013). *Cytochrome P450 Protocols* (3rd ed.; I. R. Phillips, E. A. Shephard, & P. Ortiz de Montellano, Eds.). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-321-3_17
- Pirmohamed, M. (2001). Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52(4), 345–347. <https://doi.org/10.1046/j.0306-5251.2001.01498.x>
- PLM. (2016). PROZAC®20 (IPP). In *Diccionario de especialidades farmacéuticas*.
- Puri, A. (2012). Pharmacogenetics variations in Anesthesia. *Journal of Anesthesia and Clinical Research*, 3(8), 8–11. <https://doi.org/10.4172/2155-6148.1000233>
- QIAGEN. (2022). *Puregene DNA Handbook*. Retrieved from <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=a9e6a609-4600-4b03-afbd-974318590ce5&lang=en>
- Ray, B., Ozcagli, E., Sadee, W., & Wang, D. (2019). CYP2D6 haplotypes with enhancer SNP rs5758550 and rs16947 (*2 allele): implications for CYP2D6 genotyping panels. *Pharmacogenetics and Genomics*, 29(2), 39–47. <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000363>.CYP2D6
- Regmi, B., & Bharat, L. (2012). Genetic Variation in Drug Disposition. In A. Noreddin (Ed.), *Readings in Advanced Pharmacokinetics - Theory, Methods and Applications* (pp. 101–110). <https://doi.org/10.1038/5147>
- Relling, M. V., & Klein, T. E. (2011). CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(3), 464–467. <https://doi.org/10.1038/clpt.2010.279>
- Reyes-Barron, C., Tonarelli, S., Delozier, A., Briones, D. F., Su, B. B., Rubin, L. P., & Xu, C. (2016). Pharmacogenetics of Antidepressants, A Review of Significant Genetic Variants in Different Populations. *Clin Depress*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/cdp.1000109>
- Reyes-Hernandez, O. D., Lares-Asseff, I., Sosa-Macias, M., Vega, L., Albores, A., & Elizondo, G. (2008). A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology*, 81(2), 97–103. <https://doi.org/10.1159/000109983>

- Ritchie, M. D., & Motsinger, A. a. (2005). Multifactor dimensionality reduction for detecting gene-gene and gene-environment interactions in pharmacogenomics studies. *Pharmacogenomics*, 6(5), 823–834. <https://doi.org/10.2217/14622416.6.8.823>
- Roses, A. D. (2000). Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*, 405(6788), 857–865. <https://doi.org/10.1038/35015728>
- Rotger, M., Tegude, H., Colombo, S., Cavassini, M., Furrer, H., Décosterd, L., ... Zanger, U. M. (2007). Predictive Value of Known and Novel Alleles of CYP2B6 for Efavirenz Plasma Concentrations in HIV-infected Individuals. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 81(4), 557–566. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100072>
- Sagahón-Azúa, J., Medellín-Garibay, S. E., Chávez-Castillo, C. E., González-Salinas, C. G., Milán-Segovia, R. del C., & Romano-Moreno, S. (2021). Factors associated with fluoxetine and norfluoxetine plasma concentrations and clinical response in Mexican patients with mental disorders. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(5). <https://doi.org/10.1002/prp2.864>
- Sager, J. E., Lutz, J. D., Foti, R. S., Davis, C., Kunze, K. L., & Isoherranen, N. (2014). Fluoxetine- and Norfluoxetine-Mediated Complex Drug–Drug Interactions: In Vitro to In Vivo Correlation of Effects on CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(6), 653–662. <https://doi.org/10.1038/clpt.2014.50>
- Saiz-Rodríguez, M., Almenara, S., Navares-Gómez, M., Ochoa, D., Román, M., Zubiaur, P., ... Abad-Santos, F. (2020). Effect of the Most Relevant CYP3A4 and CYP3A5 Polymorphisms on the Pharmacokinetic Parameters of 10 CYP3A Substrates. *Biomedicines*, 8(4), 94. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8040094>
- Sanguhl, K. (2012). Fluoxetine Pathway, Pharmacokinetics. Retrieved January 1, 2016, from PharmGKB website: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA161749012#PGG>
- Sanguhl, K., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2009). Selective serotonin reuptake inhibitors pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 19(11), 907–909. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833132cb>
- Scott, S. A. (2014). *Personalized Patient Therapy with Pharmacogenetics*. New York.
- Shi, S., Liu, Y., Wu, J., Li, Z., Zhao, Y., Zhong, D., & Zeng, F. (2010). Comparative bioavailability and tolerability of a single 20-mg dose of two fluoxetine hydrochloride dispersible tablet formulations in fasting, healthy Chinese male volunteers: An open-label, randomized-sequence, two-period crossover study. *Clinical Therapeutics*, 32(11), 1977–1986. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2010.10.003>
- Sim, S. C., & Gaedigk, A. (2016). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. Retrieved June 9, 2016, from <http://www.cypalleles.ki.se/index.htm>
- Sosa-Macías, M., Elizondo, G., Flores-Pérez, C., Flores-Perez, J., Bradley-Alvarez, F., Alanis-Banuelos, R., & Lares-Asseff, I. (2006). CYP2D6 Genotype and Phenotype in Amerindians of Tepehuano Origin and Mestizos of Durango, Mexico. *Journal of Clinical Pharmacology*, 46, 527–536. <https://doi.org/10.1177/0091270006287586>
- Stäubli, C. K., Meier, R., Lampert, M. L., Mikoteit, T., Hatzinger, M., Allemann, S. S., ... Meyer zu Schwabedissen, H. E. (2022). Case report: Non-response to fluoxetine in a homozygous 5-HTTLPR S-allele carrier of the serotonin transporter gene. *Frontiers in Psychiatry*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2022.942268>
- Sugihara, M., Takeuchi, S., Sugita, M., Higaki, K., Kataoka, M., & Yamashita, S. (2015). Analysis of Intra- and Intersubject Variability in Oral Drug Absorption in Human Bioequivalence Studies of 113 Generic Products. *Molecular Pharmaceutics*, 12(12), 4405–4413. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00602>
- Tamási, V., & Falus, A. (2012). Genetic and Epigenetic Factors Affecting Cytochrome P450 Phenotype and Their Clinical Relevance. In J. Paxton (Ed.), *Topics on Drug Metabolism* (pp. 87–110). Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/genetic-and-epigenetic-factors-affecting-cytochrome-p450-phenotype-and-their-clinical-significance>
- Thompson, R. A., Isin, E. M., Li, Y., Weidolf, L., Page, K., Wilson, I., ... Kenna, J. G. (2012). In vitro approach to assess the potential for risk of idiosyncratic adverse reactions caused by candidate drugs. *Chemical Research in Toxicology*, 25(8), 1616–1632.
- Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Fuhr, U., & Kirchheiner, J. (2008). The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics*, 8(1), 4–15. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500462>
- van Harten, J. (1993). Clinical Pharmacokinetics of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*, 24(3), 203–220. <https://doi.org/10.2165/00003088-199324030-00003>
- Wang, G., Lei, H. P., Li, Z., Tan, Z. R., Guo, D., Fan, L., ... Zhou, H. H. (2009). The CYP2C19 ultra-rapid metabolizer genotype influences the pharmacokinetics of voriconazole in healthy male volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 65(3), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0574-7>

- Wang, H.-C., Yeh, T. L., Chang, H. H., Gean, P. W., Chi, M. H., Yang, Y. K., ... Chen, P. S. (2011). TPH1 is associated with major depressive disorder but not with SSRI/SNRI response in Taiwanese patients. *Psychopharmacology*, *213*(4), 773–779. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2034-1>
- Wenthur, C. J., Bennett, M. R., & Lindsley, C. W. (2014). Classics in chemical neuroscience: Fluoxetine (Prozac). *ACS Chemical Neuroscience*, *5*(1), 14–23. <https://doi.org/10.1021/cn400186j>
- Wilson, M., Tiao, G., & Atkinson, E. (2021). Local Ancestry Inference for Latino/Admixed American Samples in gnomAD. *GnomAD Browser*.
- Yan, Q. (2014). Pharmacogenomics in drug discovery and development. In Q. Yan (Ed.), *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (2nd ed., Vol. 1175). <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-205-2>
- Yong Chung, J., Jung Lee, Y., Bok Jang, S., Ahyoung Lim, L., Soo Park, M., & Hwan Kim, K. (2010). CYP3A5*3 Genotype Associated With Intrasubject Pharmacokinetic Variation Toward Tacrolimus in Bioequivalence Study. *Therapeutic Drug Monitoring*, *32*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181c49a4c>
- Yu, Y. W.-Y., Tsai, S.-J., Hong, C.-J., Chen, T.-J., Chen, M.-C., & Yang, C.-W. (2005). Association Study of a Monoamine Oxidase A Gene Promoter Polymorphism with Major Depressive Disorder and Antidepressant Response. *Neuropsychopharmacology*, *30*(9), 1719–1723. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300785>
- Zee, A.-H. M. der, & Daly, A. K. (2012). *Pharmacogenetics and Individualized Therapy* (A.-H. M. der Zee & A. K. Daly, Eds.). Retrieved from <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047043354X.html>
- Zhang, L., Sarangi, V., Moon, I., Yu, J., Liu, D., Devarajan, S., ... Weinshilboum, R. (2020). CYP2C9 and CYP2C19 : Deep Mutational Scanning and Functional Characterization of Genomic Missense Variants. *Clinical and Translational Science*, *13*(4), 727–742. <https://doi.org/10.1111/cts.12758>
- Zheng, X., Fu, Z., Chen, X., Wang, M., & Zhu, R. (2021). Effects of ABCB1 gene polymorphism on the efficacy of antidepressant drugs. *Medicine*, *100*(28), e26411. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026411>
- Zhou, D., Guo, J., Linnenbach, A. J., Booth-Genthe, C. L., & Grimm, S. W. (2010). Role of Human UGT2B10 in N - Glucuronidation of Tricyclic Antidepressants, Amitriptyline, Imipramine, Clomipramine, and Trimipramine. *Drug Metabolism and Disposition*, *38*(5), 863–870. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.030981>

9. Anexos

9.a. Carta de conducción del estudio clínico en apego a las Buenas Prácticas Clínicas (BPC)



Ciudad de México, México, a 10 de junio del 2016.

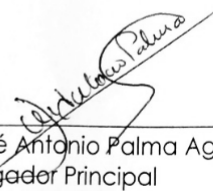
Dra. María del Carmen Jiménez Martínez
Responsable del Campo Disciplinario en Farmacología Clínica
Campo del Conocimiento de Investigación Clínica Experimental En Salud
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.
UNAM

PRESENTE

Por este conducto, yo Dr. José Antonio Palma Aguirre, confirmo que soy Investigador Principal y responsable clínico del centro de investigación Axis Clinicals Latina, lugar en donde se ejecutará el estudio de biodisponibilidad comparativa del proyecto del alumno M. en C. Carlos Alejandro Díaz Tufinio como parte de su trabajo de investigación para nivel Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, en el Campo del Conocimiento Investigación Clínica Experimental en Salud, Campo Disciplinario Farmacología Clínica.

Como investigador principal, soy el responsable de la conducción del estudio clínico en apego al protocolo aceptado en su momento por los Comités Institucionales de Ética en Investigación y de Investigación, de acuerdo a la regulación nacional e internacional vigente en esta materia, como la versión actual de la Declaración de Helsinki, los lineamientos vigentes de las Buenas Prácticas Clínicas (ICH E6 R1), así como a las Normas Oficiales Mexicanas, leyes y guías aplicables a los estudios clínicos.

Sin más por el momento, agradezco su valiosa atención y quedo a sus órdenes.



Dr. José Antonio Palma Aguirre
Investigador Principal
Axis Clinicals Latina
Tel. Ofna. 4432 2217 ext. 113
Correo electrónico: palma.a@axisclinicals.com

9.b. Aprobaciones del protocolo clínico por los comités de ética e investigación



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.

Asunto: Dictamen del estudio ACL16-PC019

Ciudad de México a 25 de agosto de 2016.

Dr. José Antonio Pablo Palma Aguirre.
Director Unidad Clínica.
Axis Clinicals Latina.

Estimado Dr. Palma:

El día 25 de agosto de 2016 el Comité de Ética en Investigación de *Axis Clinicals Latina* dictaminó como **APROBADO** el protocolo de estudio titulado: "Estudio clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno," con código del estudio: ACL16-PC019, Versión: 001, y Fecha de emisión: 24/Ago/16. Así como la "Carta de consentimiento informado", Versión: 001, y Fecha de emisión: 24/Ago/16. Esta aprobación expira en un año y deberá realizarse una revisión continua de la investigación el día 25/Ago/17.

Para dar cumplimiento a los requerimientos del Comité, las regulaciones nacionales e internacionales y las Guías ICH, usted deberá:

- Conducir el estudio de acuerdo con el protocolo y las regulaciones vigentes;
- Utilizar únicamente el consentimiento informado aprobado por el Comité, así como los materiales del reclutamiento de sujetos;
- Informar inmediatamente acerca de cualquier información nueva que pueda afectar adversamente la seguridad de los sujetos o la conducción del estudio;
- Informar inmediatamente todos los eventos adversos serios (severos) y/o riesgos no anticipados a este Comité; y
- Buscar y obtener aprobación previa de cambios en la investigación, excepto cuando sea necesario eliminar riesgos a los sujetos de estudio.
- Notificar al Comité la fecha de inicio y terminación del estudio.

Atentamente:

Dr. Germán Noyoa Heckel.
Presidente del Comité de Ética en Investigación.
Axis Clinicals Latina

Axis Clinicals Latina, S.A. de C.V.

Ing. Basilio Romo Anguiano #225, Colonia Guadalupe Insurgentes, Gustavo A. Madero, C.P. 07870, México, D.F.
FMT-CIE-04-02-02

Registro CONBIOÉTICA: CONBIOETICA-09-CEI-017-20160718

Página 1 de 1



EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

Con fundamento en lo dispuesto por los artículos 41 Bis, 98 y 100 de la Ley General de Salud; 14 fracción VII, 98-112 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud; 37 del Estatuto Orgánico del INMEGEN y de conformidad a su propio Manual de Funcionamiento, emite el presente documento:

| | |
|--|---|
| <i>Título del Proyecto:</i> | "Estudio farmacogenético y de biodisponibilidad comparativa para la evaluación del efecto de polimorfismos relevantes en la farmacocinética en voluntarios sanos mexicanos" |
| <i>Dirigido al Investigador Responsable:</i> | DRA. MIRELLE VANESSA GONZALEZ COVARRUBIAS |
| <i>Documentos sometidos a Revisión:</i> | <ul style="list-style-type: none"> • Addendum al protocolo ACL16-PC019 • Protocolo de donde se obtuvieron las muestras : "Estudio Clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clonhidrato de fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno". Fecha 24/Ago/18, versión 001. No. ACL16-PC019 • Carta de Consentimiento informado del protocolo ACL16-PC019 • Dictamen aprobatorio de Comité de Investigación, de Axis Clínica Latina para el protocolo ACL16-PC019, fecha 25 de agosto 2016. • Autorización de la COFEPRIS para el protocolo ACL16-PC019 fecha 27 de septiembre 2016, No. 163300410B0384/2016 |
| <i>No. de Dictamen:</i> | CEI 2017/04 |
| <i>Fecha de elaboración del dictamen:</i> | 30 marzo 2017 |
| <i>Decisión:</i> | APROBADO |

CONSIDERACIONES DE LOS INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN (CEI-INMEGEN)

El presente estudio es el Addendum de un estudio de bioequivalencia realizado por un tercero autorizado por la COFEPRIS. Presenta la documentación requerida para la ejecución del proyecto de donde se obtuvieron las muestras que van a ser utilizadas en el estudio de farmacogenética. En el Consentimiento informado del proyecto de bioequivalencia se menciona y se le solicita al participante su autorización explícita para extracción y análisis de ADN para futuros estudios.

Por lo antes expuesto, el CEI-INMEGEN emite el presente **Dictamen Aprobatorio**, el cual tendrá **validez de un año** a partir de la fecha de expedición del dictamen.




Atentamente,

PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DEL INMEGEN

Dra. Bárbara Patricia Antuna Puente

C.c.p.: -Lic. Teresa García de la Torre – Secretaria Técnica del Comité de Investigación del INMEGEN. Presente.

9.c. Autorización del protocolo clínico por COFEPRIS

| | | |
|--|---|--|
|  SALUD SECRETARÍA DE SALUD |  ESTADOS UNIDOS MEXICANOS COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS COMISIÓN DE AUTORIZACIÓN SANITARIA |  Cofepris Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios |
| <p>Axis Clinicals Latina, S.A. de C.V. Ing. Basilio Romo Anguiano No. 225, Guadalupe Insurgentes, C.P. 07870 Gustavo A. Madero, Ciudad de México</p> | | |
| | | <p>163300410B0384/2016 Ciudad de México, 27 de Septiembre de 2016</p> |
| <p>En respuesta a solicitud con número de ingreso 163300410B0384, de fecha 31 de agosto de 2016 recibida en el Centro Integral de Servicios (CIS), se extiende la siguiente notificación con fundamento en los artículos 4° párrafo cuarto, 8°, 14° y 16° de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos; 17°, 39° fracciones XV, XXI y XXIV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 1°, 2°, 3°, 15°, de la Ley Federal de Procedimientos Administrativos; 1°, 3° fracciones I, XXII y XXV, 4° fracción III, 13° Apartado A fracciones IX y X, 17° bis fracción IV, 102°, 194° último párrafo, 194° bis, 204°, 262°, 315°, 316°, 317°, 317° bis, 317° bis 1, 316° y 319° del Título Décimo Cuarto, 368° y 371° de la Ley General de Salud; 1°, 2° inciso C fracción X y 36° del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud; 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 13°, 14°, 16°, 21°, 22°, 62°, 64°, 67°, 73°, 98° y 116° fracción VI del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; 1°, 155°, 156° y 184° del Reglamento de Insumos para la Salud; 1,3 fracciones I inciso b, VI, VII y XII, 4° fracción II inciso c y 14° fracción I del Reglamento de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, así como de los artículos 7°, 8°, 9°, 10° y 11° del ACUERDO por el que se dan a conocer los trámites y servicios, así como los Formatos que aplica la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios, inscritos en el Registro Federal de Trámites y Servicios de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria, publicado en el Diario Oficial el día 01 de Julio de 2013.</p> | | |
| <p>Se autoriza el protocolo de investigación:</p> | | |
| Título | "Estudio clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno" | |
| No. de protocolo | ACL16-PC019 | |
| Patrocinador | Protein, S.A. de C.V. | |
| Unidad Clínica: | | |
| 1) Axis Clinicals Latina, S.A. de C.V. | Dirección: Ing. Basilio Romo Anguiano No. 225, Guadalupe Insurgentes, C.P. 07870, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. | |
| Investigador Principal: | Dr. José Antonio Pablo Palma Aguirre. | |
| Responsable Sanitario: | C.F.B. María de los Ángeles Melchor Baltazar | |
| Comité revisor: | Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación de Axis Clinicals Latina, S.A. de C.V. | |
| | Dirección: Ing. Basilio Romo Anguiano No. 225, Guadalupe Insurgentes, C.P. 07870, Gustavo A. Madero, Ciudad de México. | |
| | Dictamen avalado por: Dr. Germán Novoa Heckel y Dr. David Antonio Ávila Trejo. Presidentes de los Comités, respectivamente. | |
| | Fecha: 25 de agosto de 2016. | |
| Objetivo principal | Comparar la biodisponibilidad entre dos formulaciones orales de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos para determinar bioequivalencia. | |
| Diseño | Estudio de dosis única, por vía oral con deglución, cruzado (2 x 2), con dos tratamientos, dos periodos, dos secuencias, aleatorizado, con tiempo de muestreo truncado a 72 horas y bajo condiciones de ayuno. | |
| Tamaño de muestra | 22 voluntarios sanos de sexo indistinto, más 4 voluntarios excedentes. | |
| | | <p>CAS-CAS-P-01-POI-02-F-02 1 de 2</p> |
| <p>Oklahoma No. 14, Col. Nípoles, Del. Benito Juárez, Ciudad de México, C.P. 03810</p> | | |
| | | <p>COF 105885</p> |

SALUD
SECRETARÍA DE SALUD

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
COMISIÓN FEDERAL PARA LA PROTECCIÓN CONTRA RIESGOS SANITARIOS
COMISIÓN DE AUTORIZACIÓN SANITARIA

Cofepris
Comisión Federal para la Protección
contra Riesgos Sanitarios

Axis Clinicals Latina, S.A. de C.V.
Ing. Basilio Romo Anguiano No. 225, Guadalupe Insurgentes, C.P. 07870
Gustavo A. Madero, Ciudad de México

163300410B0384/2016
Ciudad de México, 27 de Septiembre de 2016

Documentos aprobados para el centro arriba citado de acuerdo al dictamen del CEI:

1. Protocolo Clínico del estudio con código ACL16-PC019, versión 001, fecha 24/Ago/16, en idioma español.
2. Consentimiento informado del estudio con código ACL16-PC019, versión 001, fecha 24/Ago/16, en idioma español.

Se acusa de recibo la información para prescribir del medicamento en estudio, en idioma español.

| Medicamento | Forma farmacéutica y concentración | Vía de administración | Intervalo de administración |
|--|------------------------------------|-----------------------|---|
| Prueba: Clorhidrato de Fluoxetina, fabricadas por Apotex, Inc. Canadá para Protein, S.A. de C.V. | Cápsula con 20 mg | Oral | Dosis única de 20 mg (1 cápsula), en dos periodos, con un periodo de lavado de 56 días. |
| Referencia: Clorhidrato de Fluoxetina (PROZAC®20), de Eli Lilly and Company | Cápsula con 20 mg | Oral | Dosis única de 20 mg (1 cápsula), en dos periodos, con un periodo de lavado de 56 días. |

Presentar la información de los lotes y fecha de caducidad de los medicamentos de prueba y de referencia en el Reporte del estudio, así como cumplir con las consideraciones estadísticas para aceptar la bioequivalencia exclusivamente dentro del margen de equivalencia de 80 a 125% para datos transformados logarítmicamente ABC y C_{max}, de acuerdo a la norma de intercambiabilidad vigente.

En caso de que no se dictamine bioequivalencia y la potencia sea menor al 80% se podrá realizar un estudio add on, considerando que el número de sujetos de investigación a agregar en este estudio debe ser calculado a partir del CV% intrasujeto. Cuando se recurra a un estudio add on se deben adoptar medidas apropiadas para preservar el error tipo I global de la prueba, utilizando niveles de significancia ajustados en ambos análisis (etapa 1 y etapa 2) para los intervalos de confianza y agregando el término "etapa" en el modelo estadístico del ANADEVA; lo anterior de acuerdo a la Norma de Intercambiabilidad vigente.

Las muestras biológicas obtenidas no serán utilizadas para líneas celulares permanentes ni inmortales.

Se reitera el compromiso de enviar los reportes de sospechas de eventos y reacciones adversas al Centro Nacional de Farmacovigilancia.

Deberá notificar a esta Comisión de Autorización Sanitaria la conclusión del estudio, anexando los datos sobresalientes y conclusiones.

Deberá registrar la información complementaria de su investigación a través del portal del Registro Nacional de Ensayos Clínicos (RNEC) en la sección de "protocolos de investigación en seres humanos" disponible en la página web de COFEPRIS, en un plazo no mayor a 5 días hábiles a partir de la recepción del presente.

SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.
COMISIONADO DE AUTORIZACIÓN SANITARIA

JUAN CARLOS GALAGA SOLÓRZANO

SUBP/CAPC

CAS-CAS-P-01-POI-02-F-02
2 de 2

Oklahoma No. 14, Col. Nápoles, Del. Benito Juárez, Ciudad de México, C.P. 03810

COF 105886

9.d. Consentimiento informado de participación en el estudio



**Consentimiento informado para participar en el proyecto de Investigación
“Estudio clínico y farmacogenético entre dos medicamentos para administración oral de
Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones
de ayuno”**

Por medio de la presente le invitamos a participar en esta investigación cuyo objetivo es analizar su genoma (información de la herencia) con el fin de identificar marcadores de la velocidad de degradación (metabolismo) y eliminación del fármaco, el cual será analizado con fines de bioequivalencia en el protocolo ACL16-PC019 “Estudio clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno” en el cual está usted participando en el laboratorio AXIS Clinicals Latina, y del cual ya firmó previamente un Consentimiento Informado.

En esta carta invitación y de consentimiento informado le damos a conocer el objetivo del estudio, beneficios y riesgos del mismo. De esta forma, si usted está de acuerdo e interesado en participar le invitamos a firmar este consentimiento sin ninguna presión o intimidación.

Actualmente los fármacos antidepresivos, como el Clorhidrato de Duloxetina y Fluoxetina, entre otros, pueden tener o no eficacia, esto en parte debido a variantes (o mutaciones) en el genoma (ADN) de cada persona que lo consume. Es decir, el medicamento puede ser efectivo para unos pacientes, pero no para otros, o bien puede generar reacciones tóxicas en unos, aunque no en otros, y no conocemos con exactitud qué pacientes van a responder adecuadamente al tratamiento. Por esta razón, en el marco del estudio de bioequivalencia, se desea estudiar variaciones de su genoma para poder identificar en un futuro próximo marcadores genéticos que nos ayuden a predecir la eficacia, falla terapéutica o aparición de reacciones adversas del fármaco que se le administra, con el fin de seleccionar fármacos y asignar dosis precisas a cada paciente según su conformación genómica (ADN).

Procedimiento del estudio.

- a) Además de su participación en el estudio de bioequivalencia en el laboratorio AXIS Clinicals Latina, si decide participar en esta investigación, le pediremos conteste un cuestionario adicional, donde se le preguntarán antecedentes familiares y demográficos, así como la medición de circunferencia de cadera y cintura. Adicionalmente, ya se le habrán consultado sus datos de peso, talla, edad, IMC, etc., lo cual se realizará al ingresar al estudio de bioequivalencia.



- b) Usted deberá seguir las instrucciones del personal médico capacitado que lo acompañará en todo momento en las instalaciones de AXIS Clinicals Latina durante el desarrollo del estudio.
- c) Para determinar cuales son las variantes genéticas que afectan la eficacia o falla terapéutica además del análisis químico de concentraciones del medicamento que se realizará en las muestras de sangre que le serán tomadas cada cierto tiempo, algunas de estas muestras serán empleadas para extraer y analizar su información genética (ADN), sin necesidad de tomar una muestra de sangre adicional. Cabe destacar que dicha muestra de sangre no será usada con fines de clonación genética ni ningún otro fin no especificado en este consentimiento.
- d) Esta muestra de sangre será enviada al Instituto Nacional de Medicina Genómica donde se extraerá ADN y se estudiará el genoma para la identificación de variantes que puedan determinar, en un futuro próximo, la velocidad de degradación (metabolismo) y eliminación del medicamento que se le administró.

Riesgos.

Los riesgos por la participación en este estudio no son mayores ni diferentes a los que se le han explicado y especificado en el Consentimiento Informado que firmó previamente cuando decidió participar en el estudio con código ACL16-PC019 "Estudio clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno" en AXIS Clinicals Latina, ya que sólo se usará una parte de las muestras de sangre tomadas previamente para propósitos de investigación académica.

Beneficios.

Usted no tendrá un beneficio inmediato, pero gracias a su participación, su comunidad y familiares pueden beneficiarse significativamente en un futuro próximo, al poder asignar con base en la información genómica, dosis y medicamentos distintos con mayor probabilidad de éxito en cada paciente que sufra depresión, ya que el estudio puede demostrar que la utilización del medicamento antidepresivo sea efectivo en mayor o menor grado de acuerdo a su genoma, lo cual será información no disponible de manera inmediata.

Sin embargo, usted no recibirá una compensación económica adicional por participar en este estudio, salvo por la compensación que ya fue especificada en el estudio con código ACL16-PC019 "Estudio clínico para determinar bioequivalencia entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno", el cual firmó anteriormente.



Confidencialidad.

Su nombre e información personal no será usado/divulgado en ningún estudio. La muestra de sangre no contendrá información personal de tal manera que su información no clínica no estará asociada a su muestra de sangre. El código que relaciona su muestra y su información personal estarán resguardados en AXIS Clinicals Latina y en el INMEGEN bajo estrictas medidas de seguridad a los que solo investigadores titulares tendrán acceso.

Usted es libre de acceder a participar en el estudio mediante la firma de este consentimiento, sólo basta que nos lo haga saber de forma verbal o escrita. Si decide no participar, esto no afectará su relación con el estudio de bioequivalencia en el que se enroló, con los médicos o los institutos de investigación.

Acceso a resultados del estudio.

Debido a las medidas de confidencialidad, los resultados individuales de las pruebas genéticas podrán darse a conocer solo a médicos que demuestren la inminente necesidad de conocer esta información. Los resultados generales serán publicados cuando la investigación haya concluido y será sin identificación de las personas que participaron.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

"Estudio clínico y farmacogenético entre dos medicamentos para administración oral de Clorhidrato de Fluoxetina en cápsulas con 20 mg en voluntarios sanos bajo condiciones de ayuno"

Ciudad de México, a ____ de diciembre de 2016.

Número de registro de la CNIC:

Lea usted antes y marque con una "X" la casilla que corresponda a su respuesta.

- 1 ¿Ha leído Usted la carta de consentimiento informado?
- 2 ¿Existen riesgos que pongan en peligro su salud al participar en el estudio?
- 3 ¿Es obligatorio que Usted participe en este estudio?
- 4 ¿Habrá repercusiones en los servicios que proporciona el IMSS para Usted o su familia, si Usted decide no participar en el estudio?

| | |
|----|----|
| Sí | No |
| Sí | No |
| Sí | No |
| Sí | No |



| | | | |
|---------------------------------|--|-------------------------------|----|
| 5 | ¿Su nombre y domicilio serán manejados de manera confidencial? | Sí | No |
| 6 | ¿Autoriza Usted que se tome la muestra de sangre sólo para este estudio? | Sí | No |
| 7 | ¿Autoriza Usted que se tome la muestra de sangre para este estudio y se almacene su genoma (ADN) para utilizarlo en estudios futuros con fines de investigación? | Sí | No |
| 8 | ¿Confirma Usted, que ha recibido la información y está de acuerdo en participar en el estudio? | Sí | No |
| | | | |
| Nombre y firma del participante | | Teléfono y dirección | |
| Testigo 1 | | Testigo 2 | |
| Nombre y firma del testigo 1 | | Nombre y firma del testigo 2 | |
| Dirección y teléfono: | | Dirección y teléfono: | |
| Parentesco con el voluntario: | | Parentesco con el voluntario: | |

Si tiene preguntas en un futuro, favor de comunicarse con la Dra. Vanessa González Covarrubias en el teléfono 53501900 ext.1212 (vgonzalez@inmegen.gob.mx) en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, o con el Dr. José Antonio Palma Aguirre al teléfono 4432 2217, 3611 0345 y 5517 4926, extensión 113, en AXIS Clinicals Latina.



ANEXO 1. CUESTIONARIO DE ANCESTRÍA

Favor de responder a las siguientes preguntas de la manera más precisa posible, con el fin de establecer si hay alguna relación entre las características genéticas y su lugar de nacimiento o sus antecedentes familiares. En caso de no conocer la información, indicar en la línea "no sé".

Los datos abajo escritos, así como sus datos clínicos y demográficos registrados al momento del reclutamiento del estudio, serán conservados de manera confidencial bajo responsabilidad de los investigadores, y éstos serán codificados para que no se conozca su identidad.

Nombre completo: _____

Edad: _____

Lugar de residencia actual (País y estado): _____

Lugar de nacimiento (País y estado): _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

MATERNOS

Lugar de nacimiento de la madre (País y estado): _____

Lugar de nacimiento de abuela materna (País y estado): _____

Lugar de nacimiento de abuelo materno (País y estado): _____

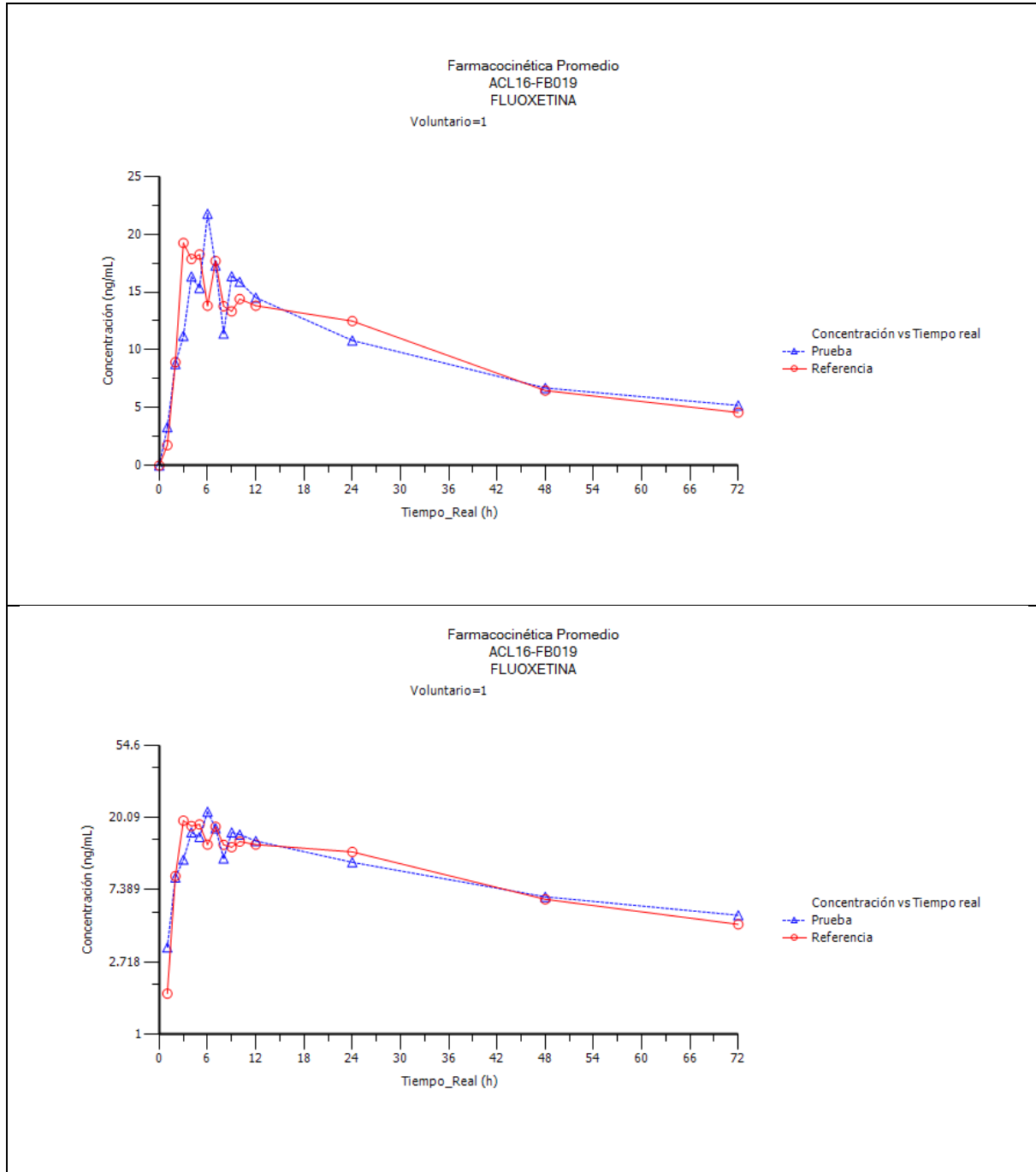
PATERNOS

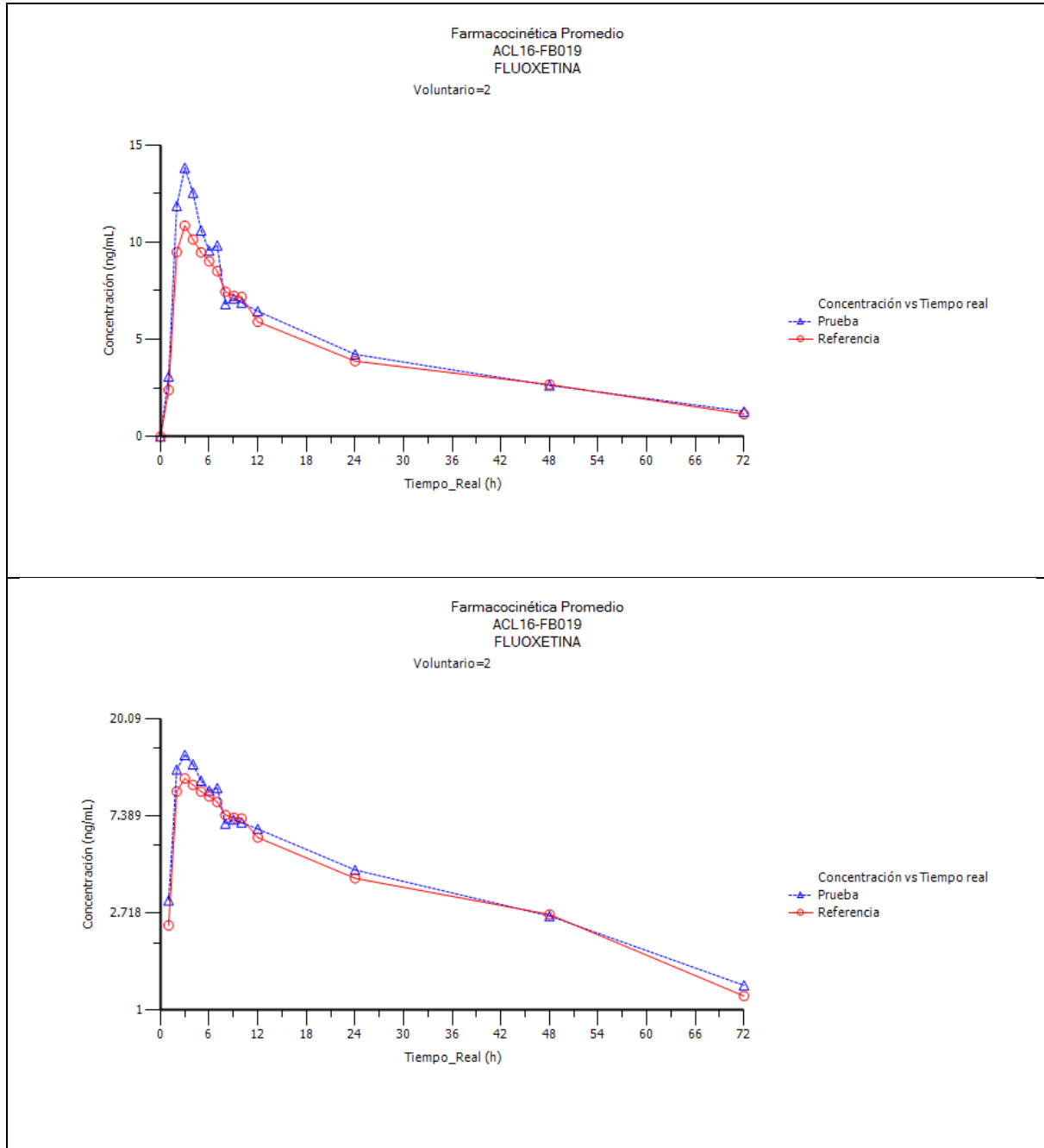
Lugar de nacimiento del padre (País y estado): _____

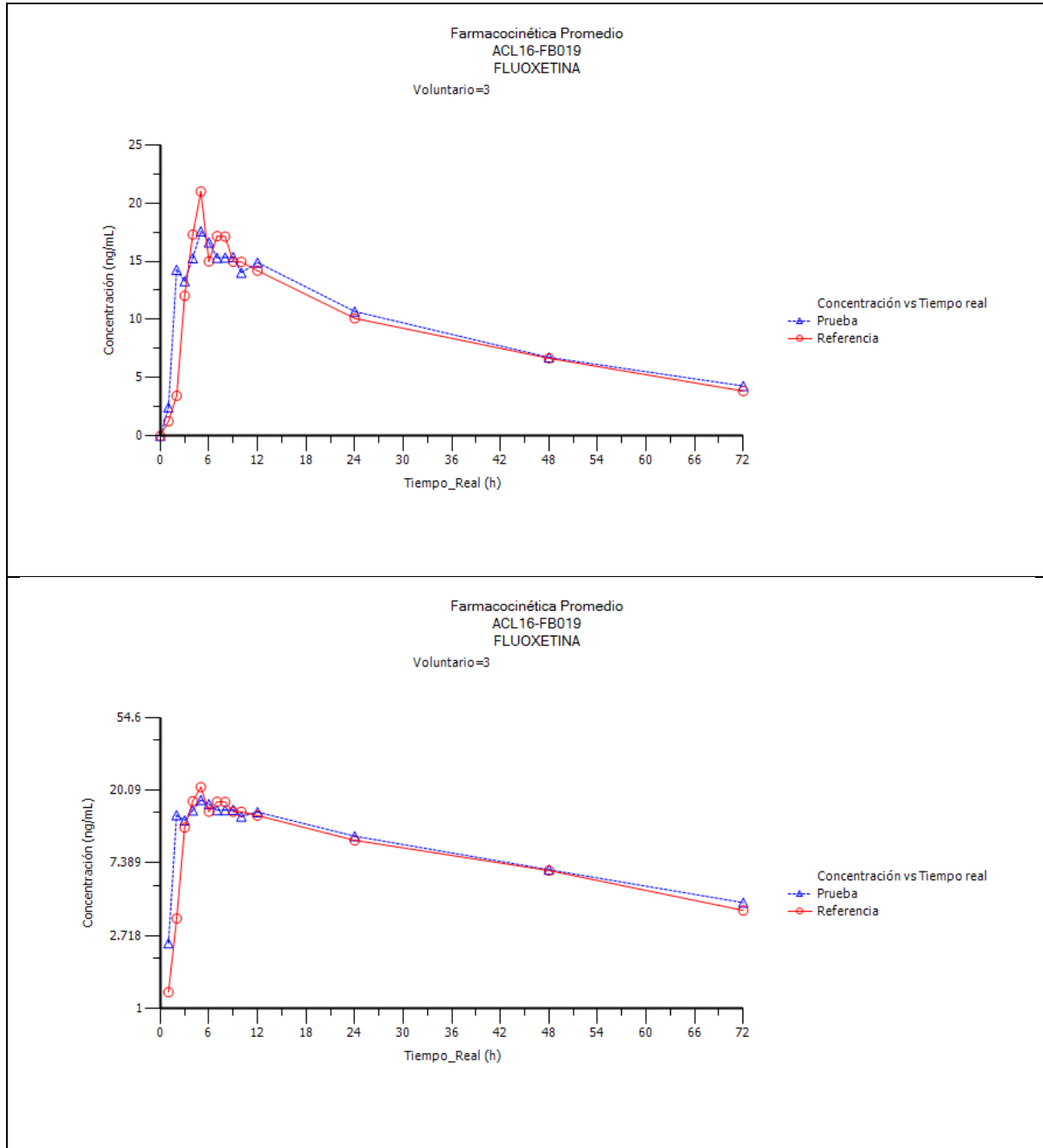
Lugar de nacimiento de abuela paterna (País y estado): _____

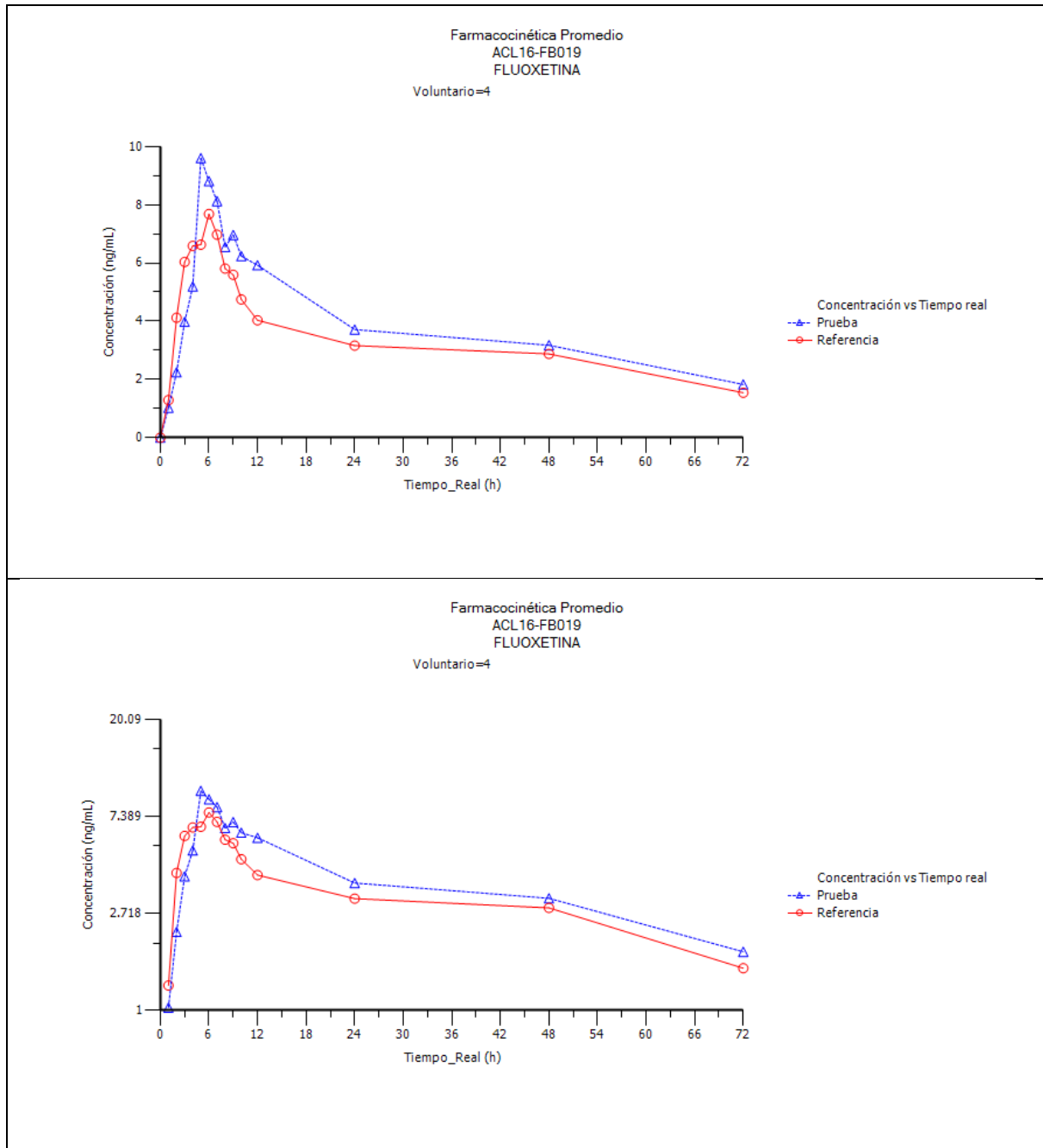
Lugar de nacimiento de abuelo materno (País y estado): _____

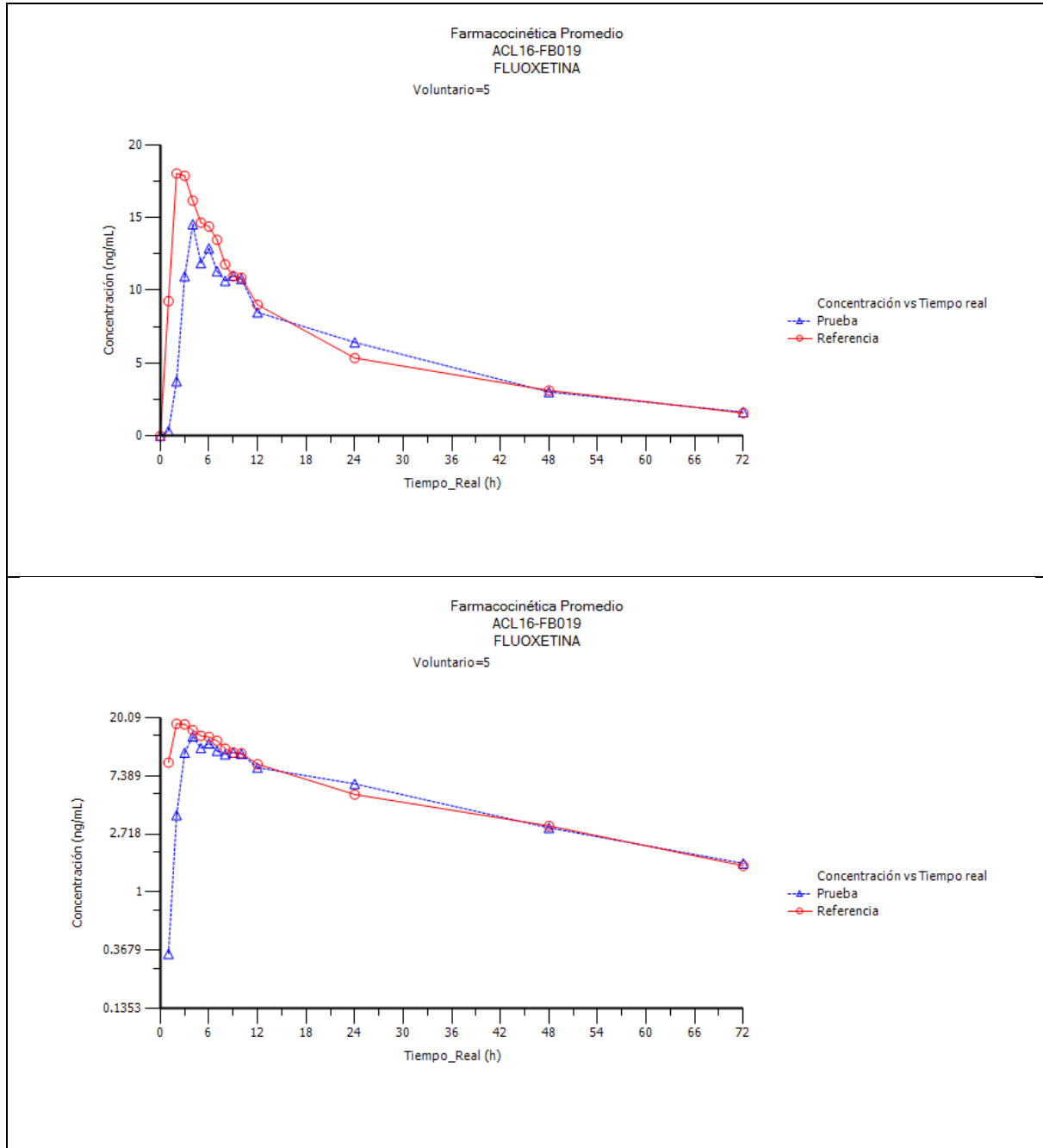
9.e. Perfiles farmacocinéticos individuales de fluoxetina en escala natural y logarítmica

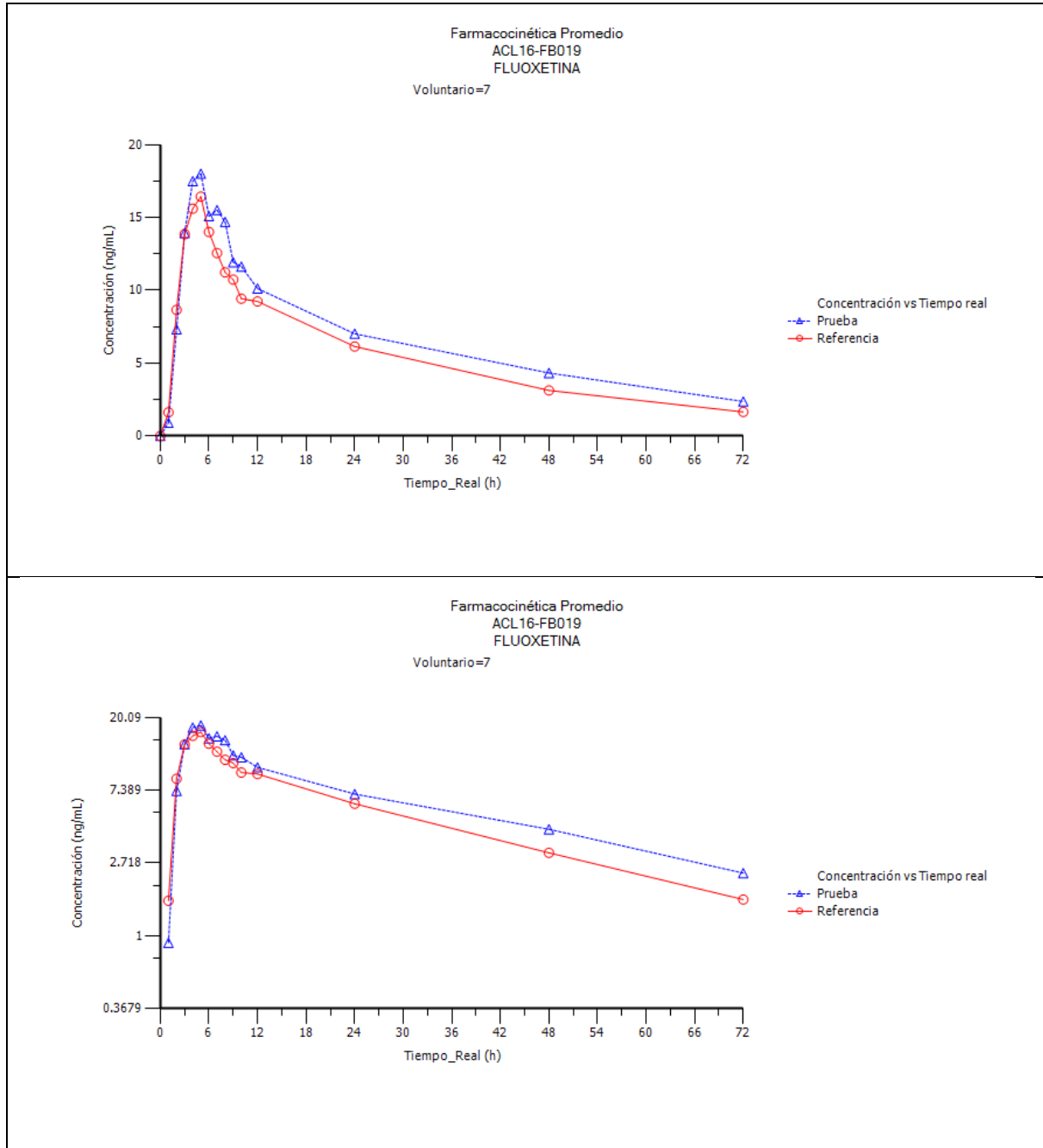


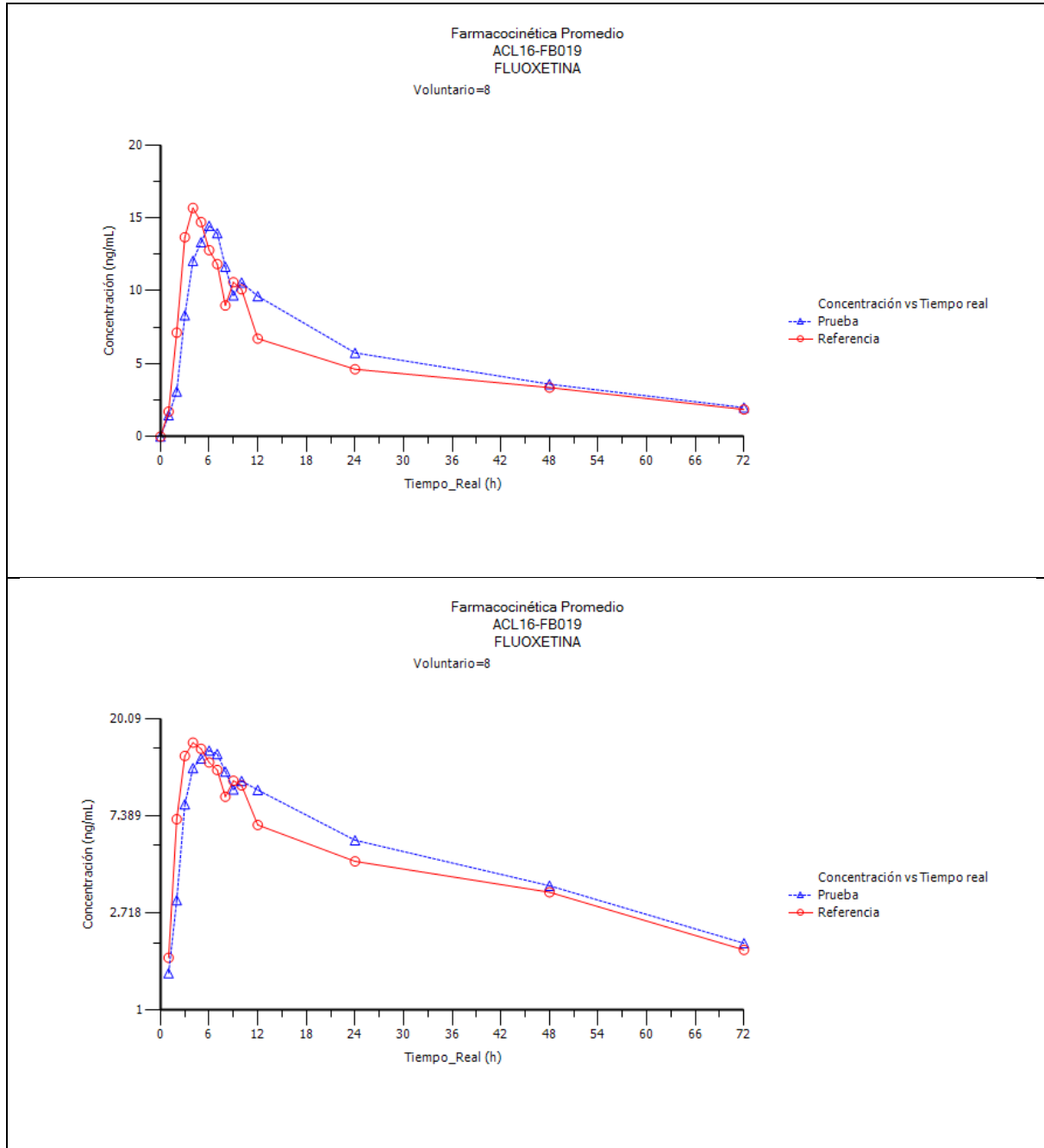


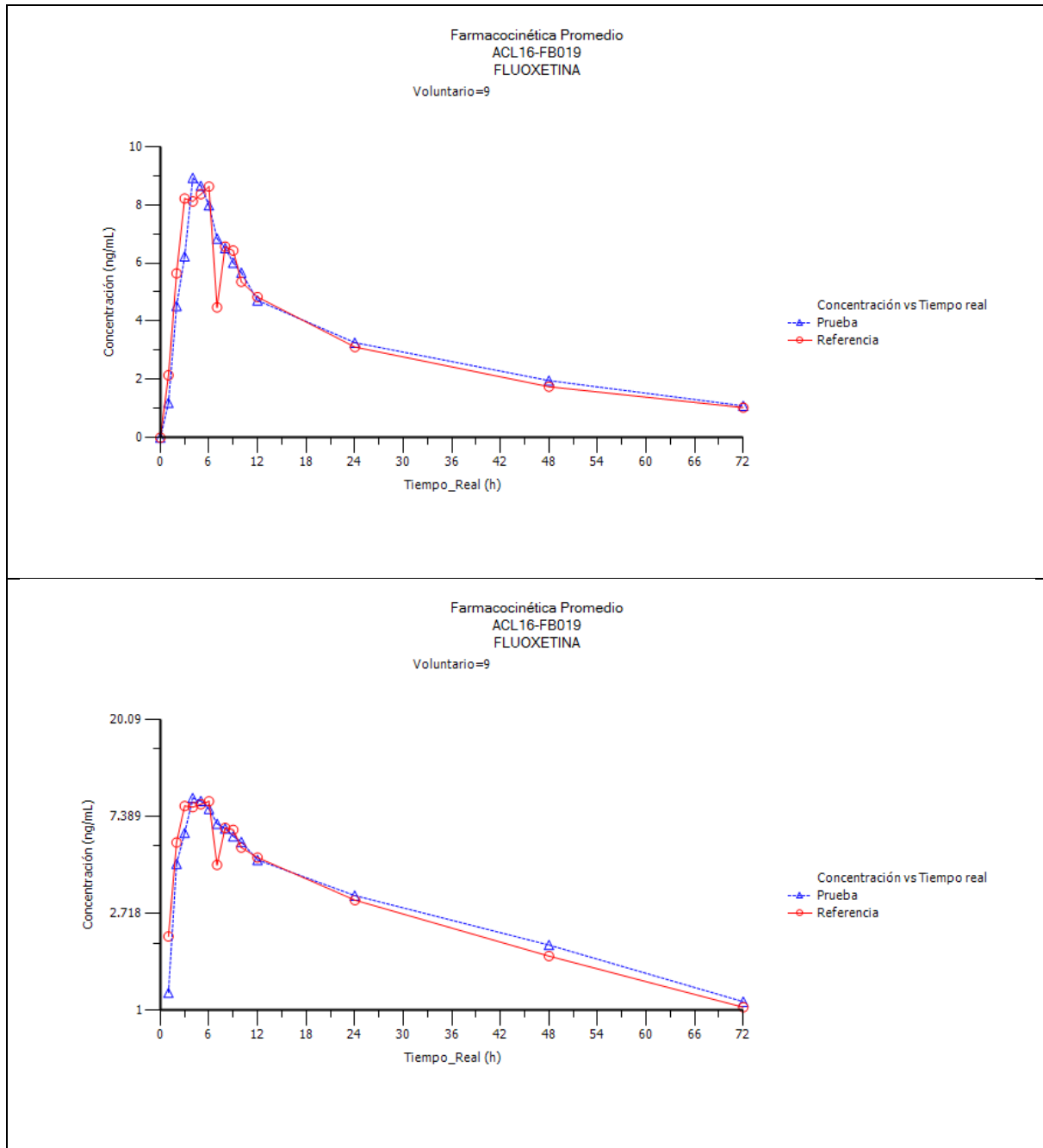


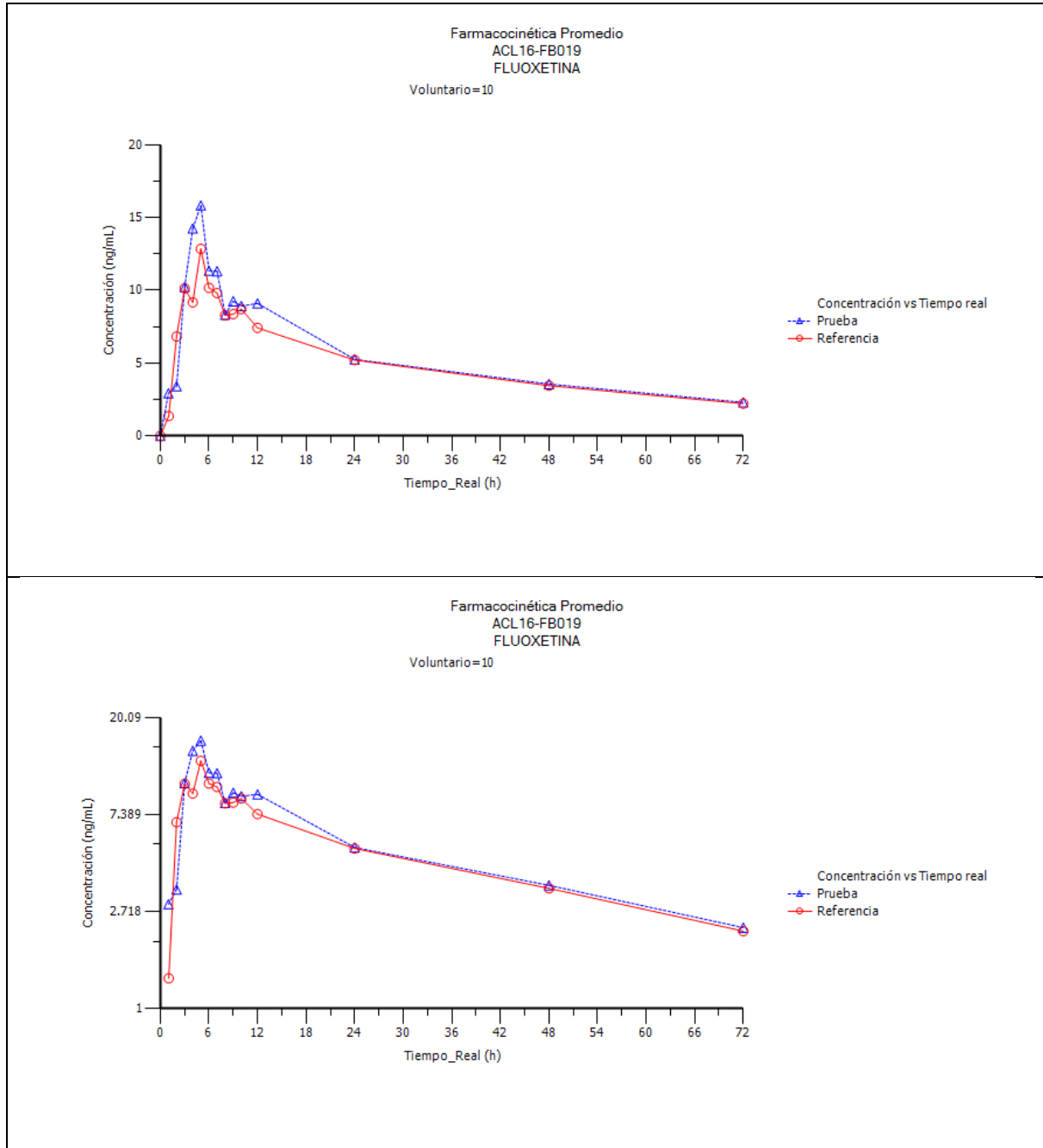


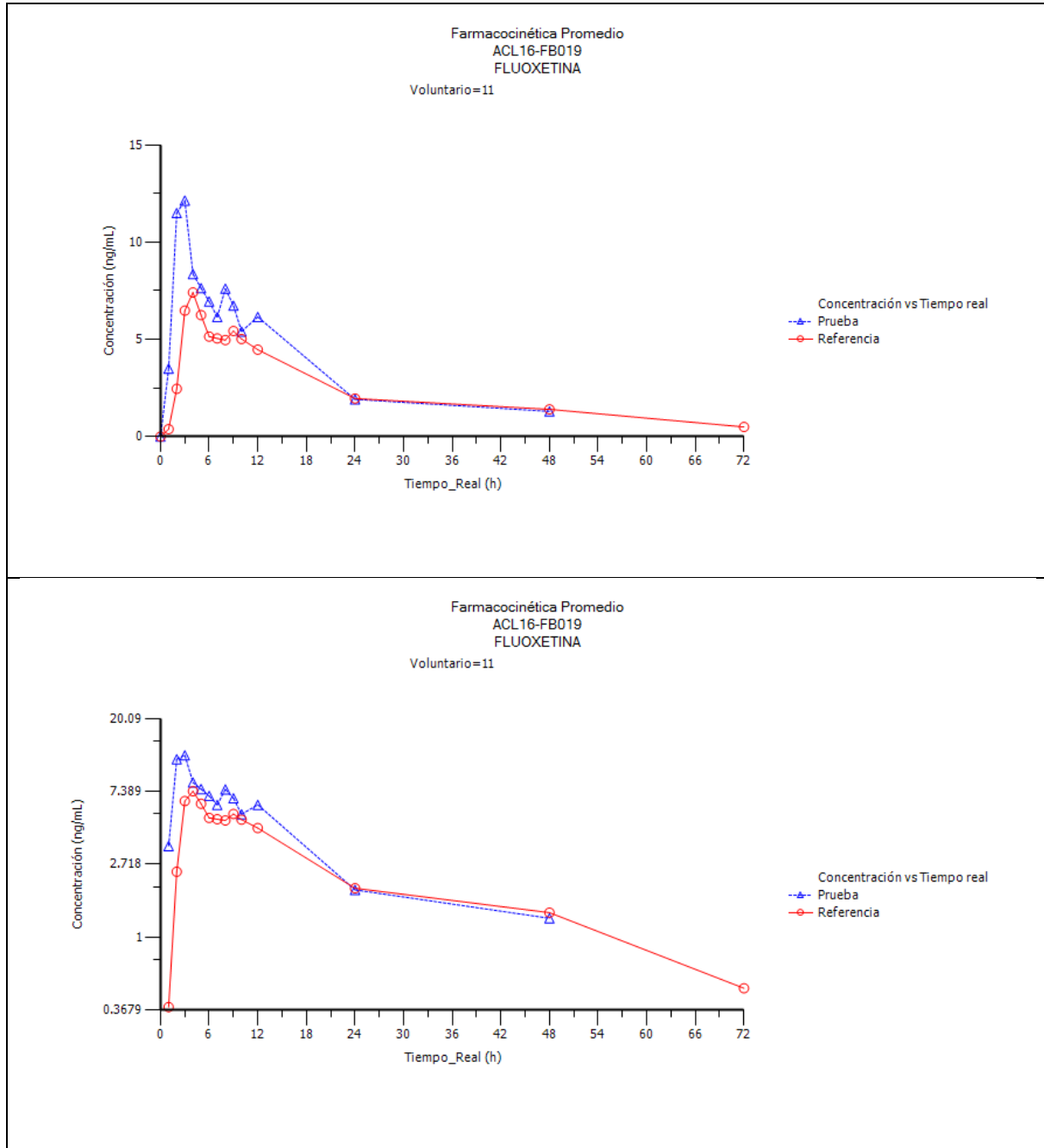


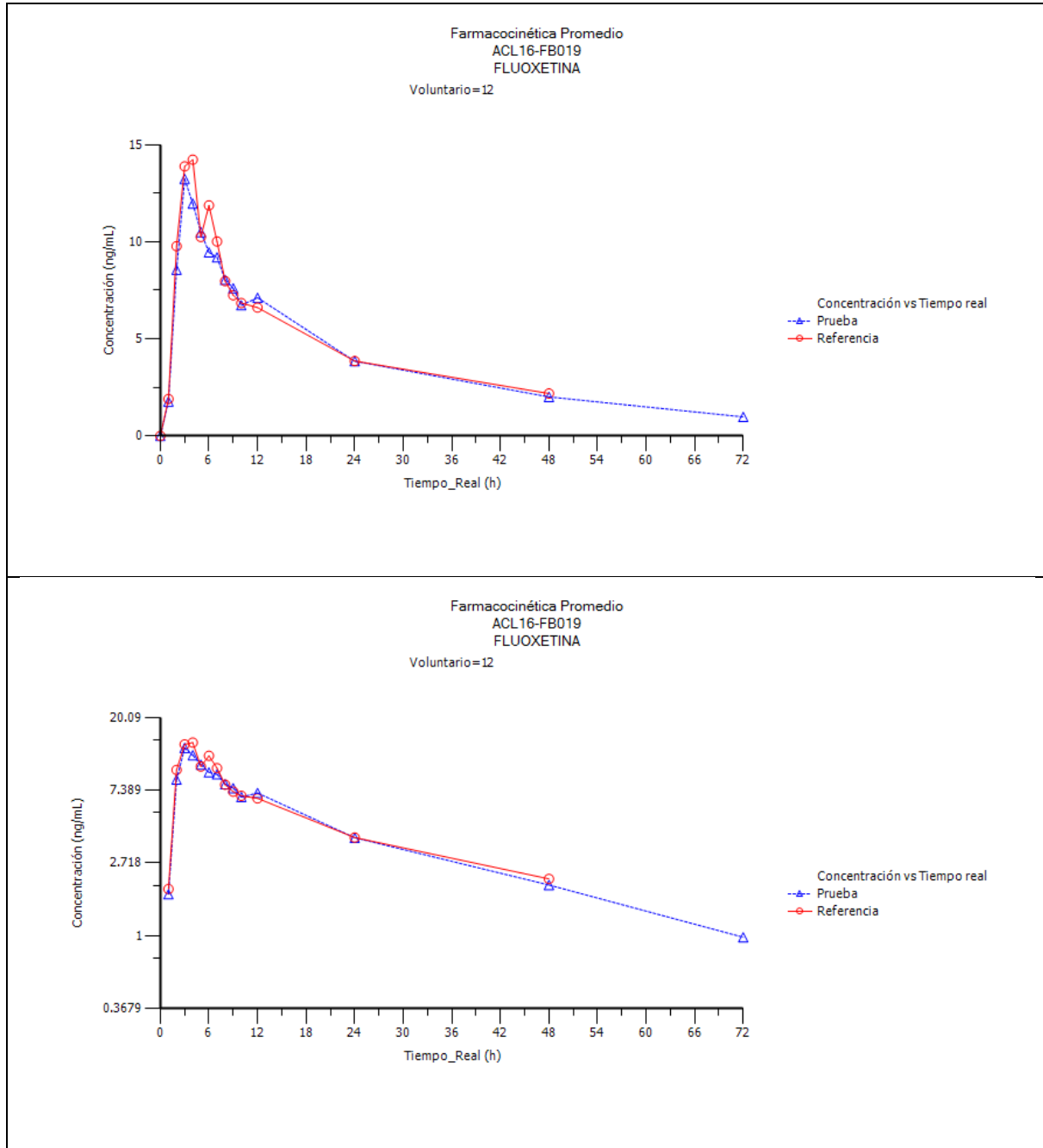


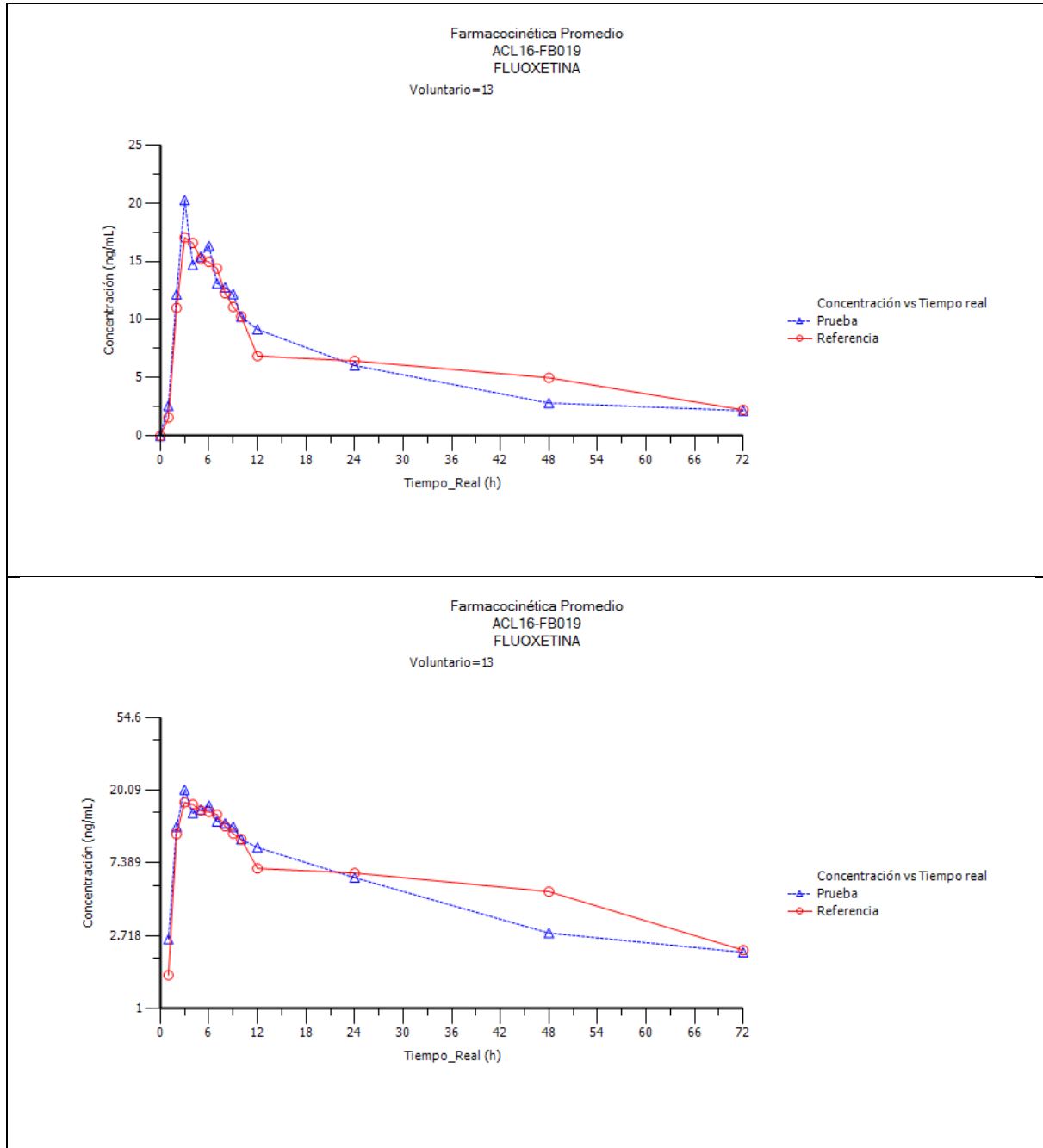


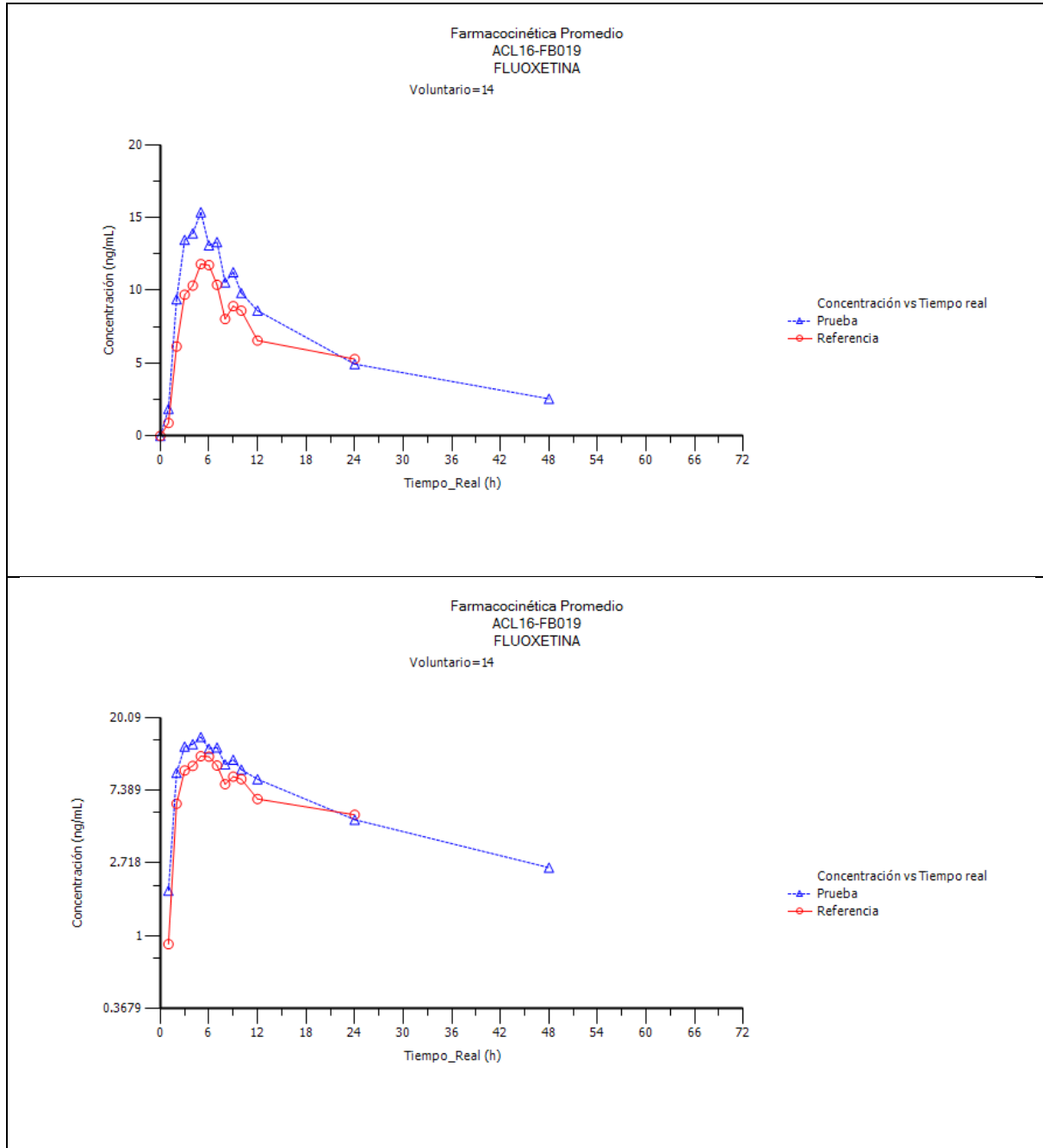


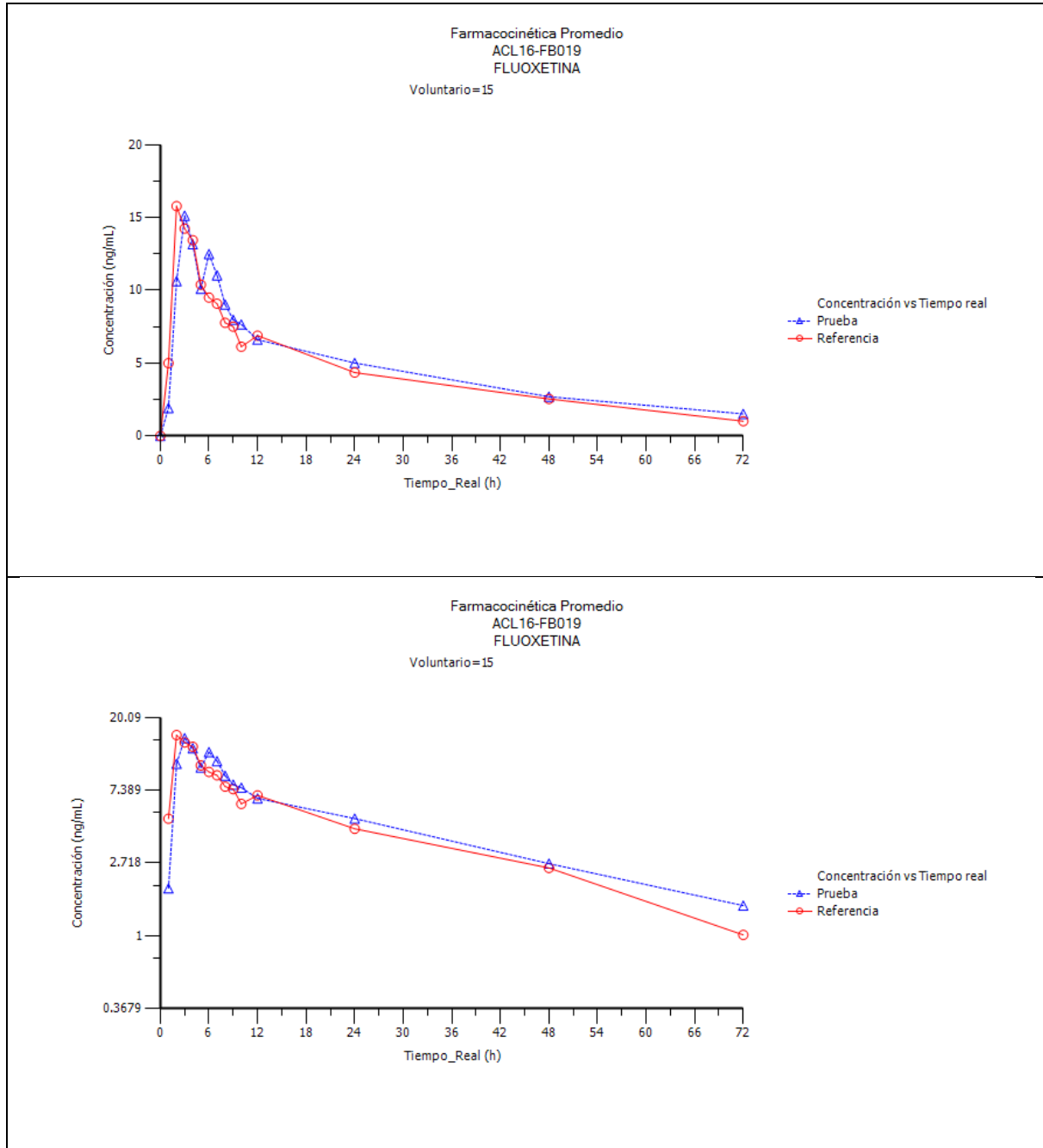


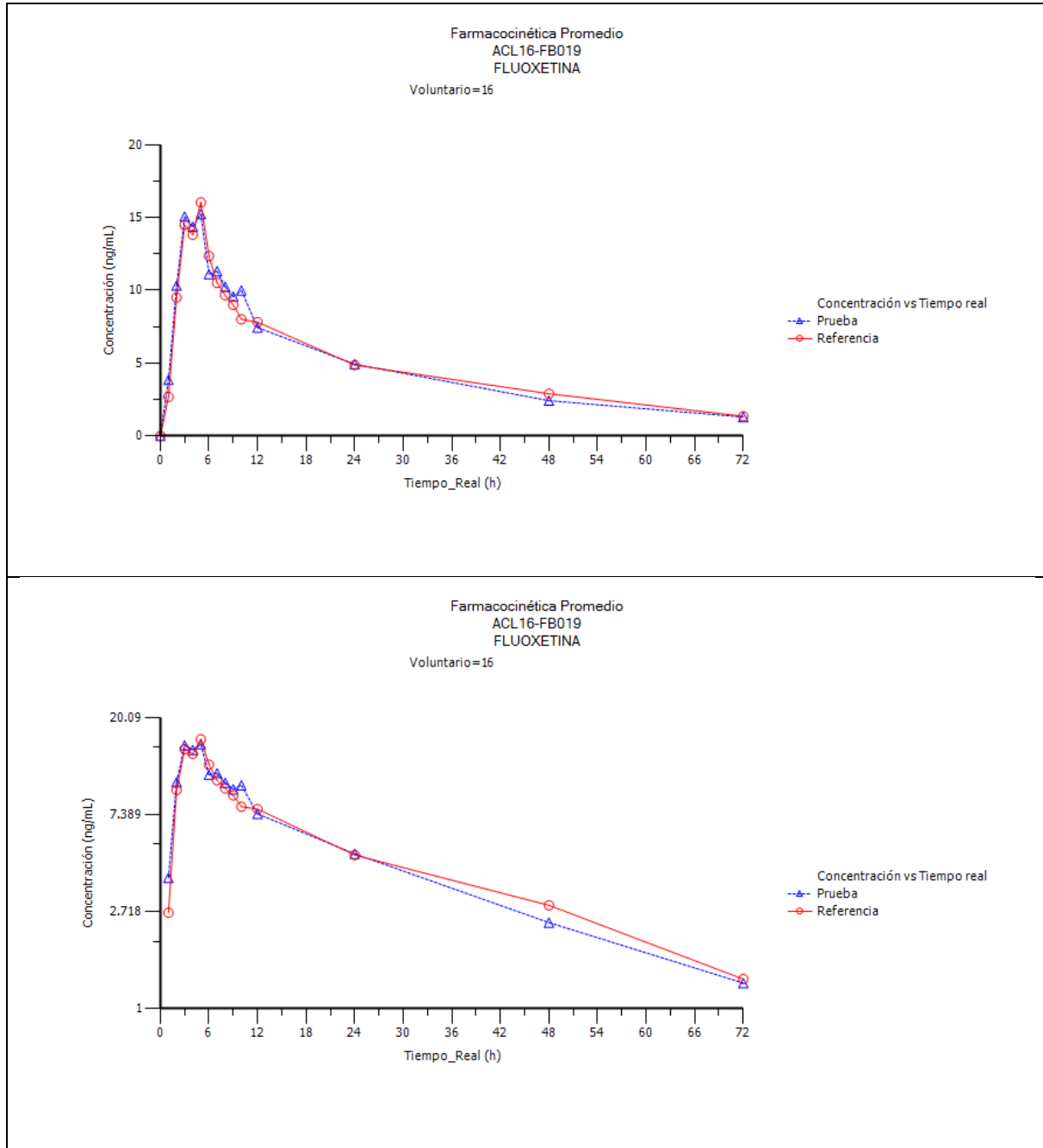


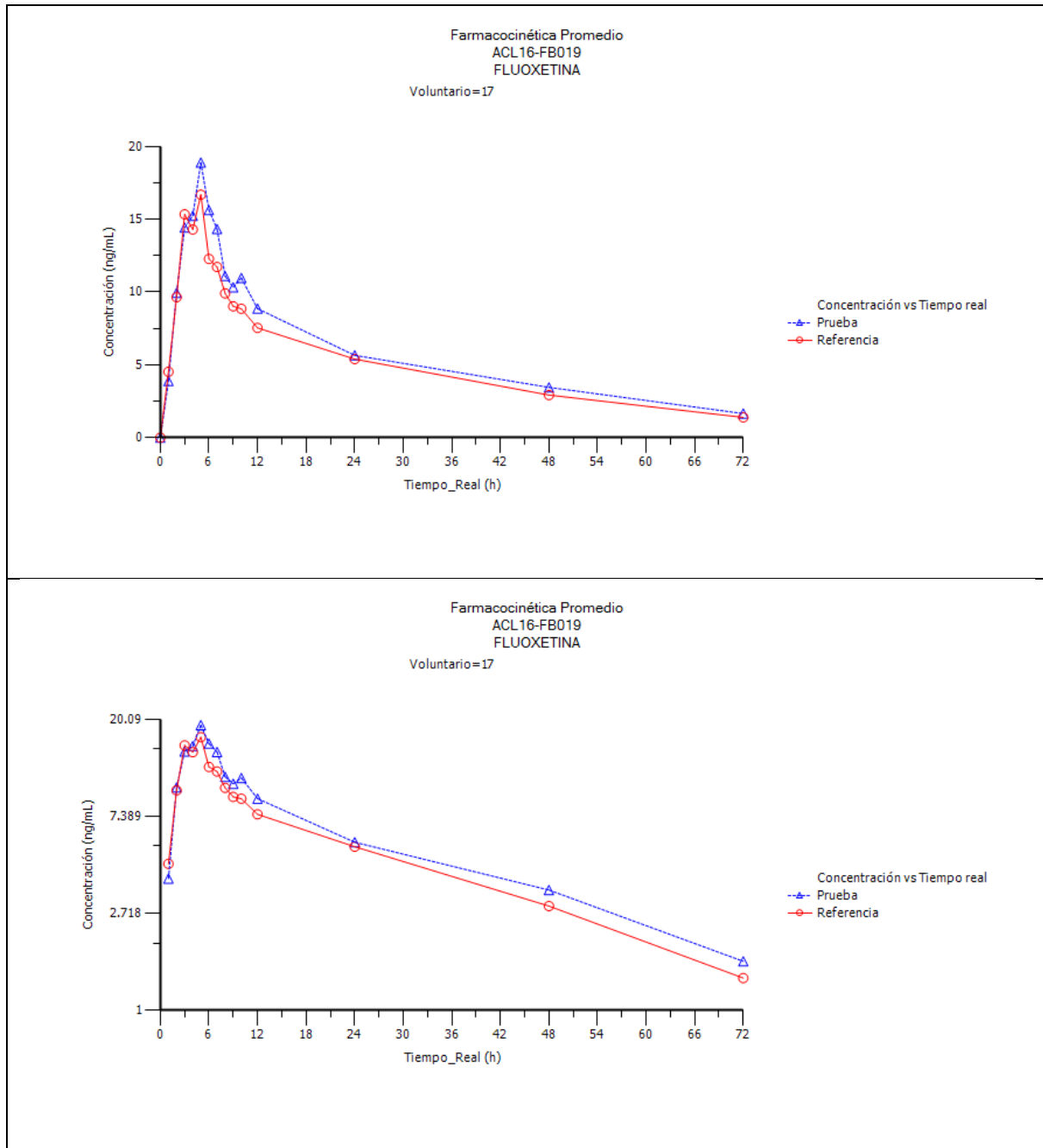


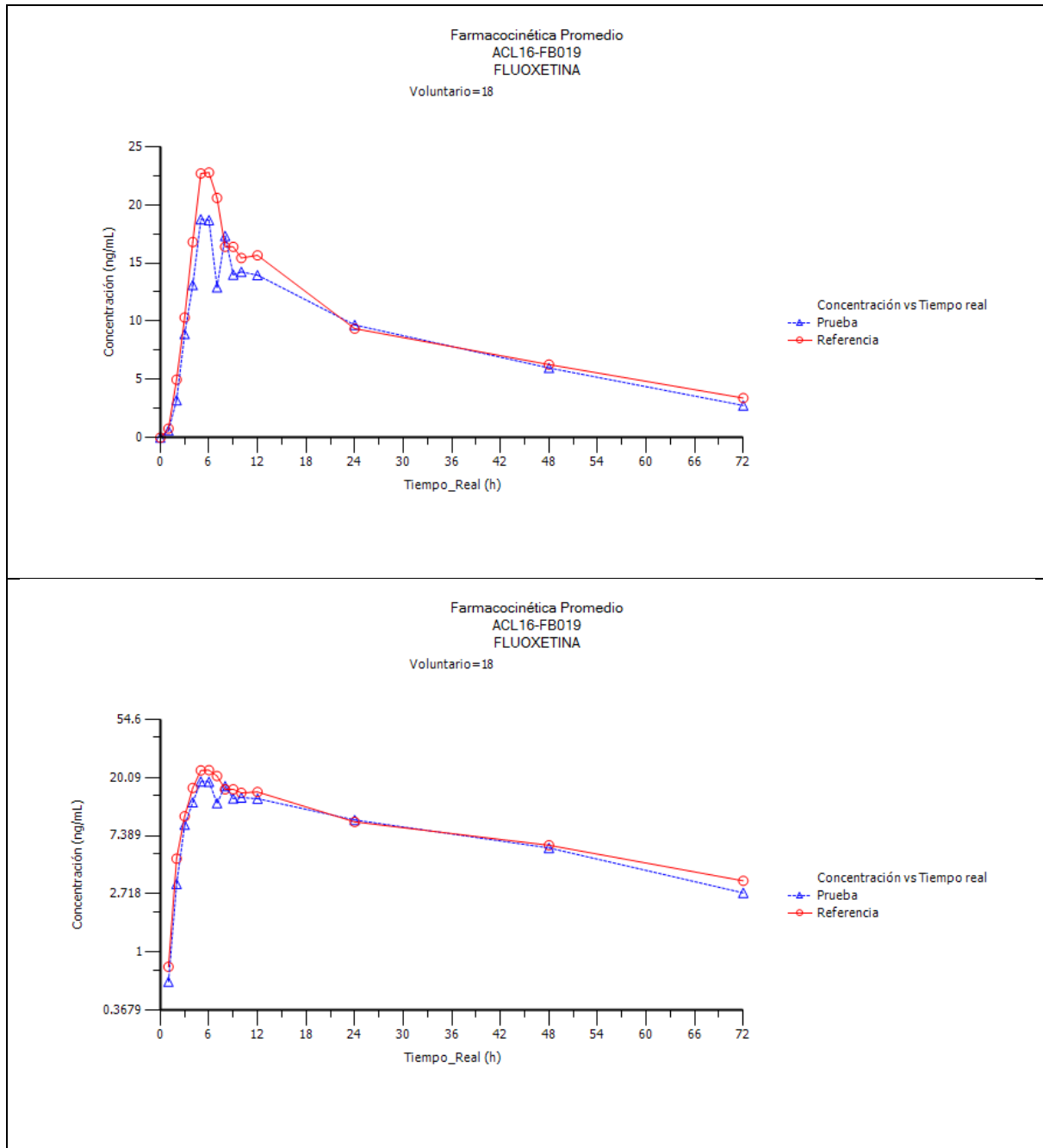


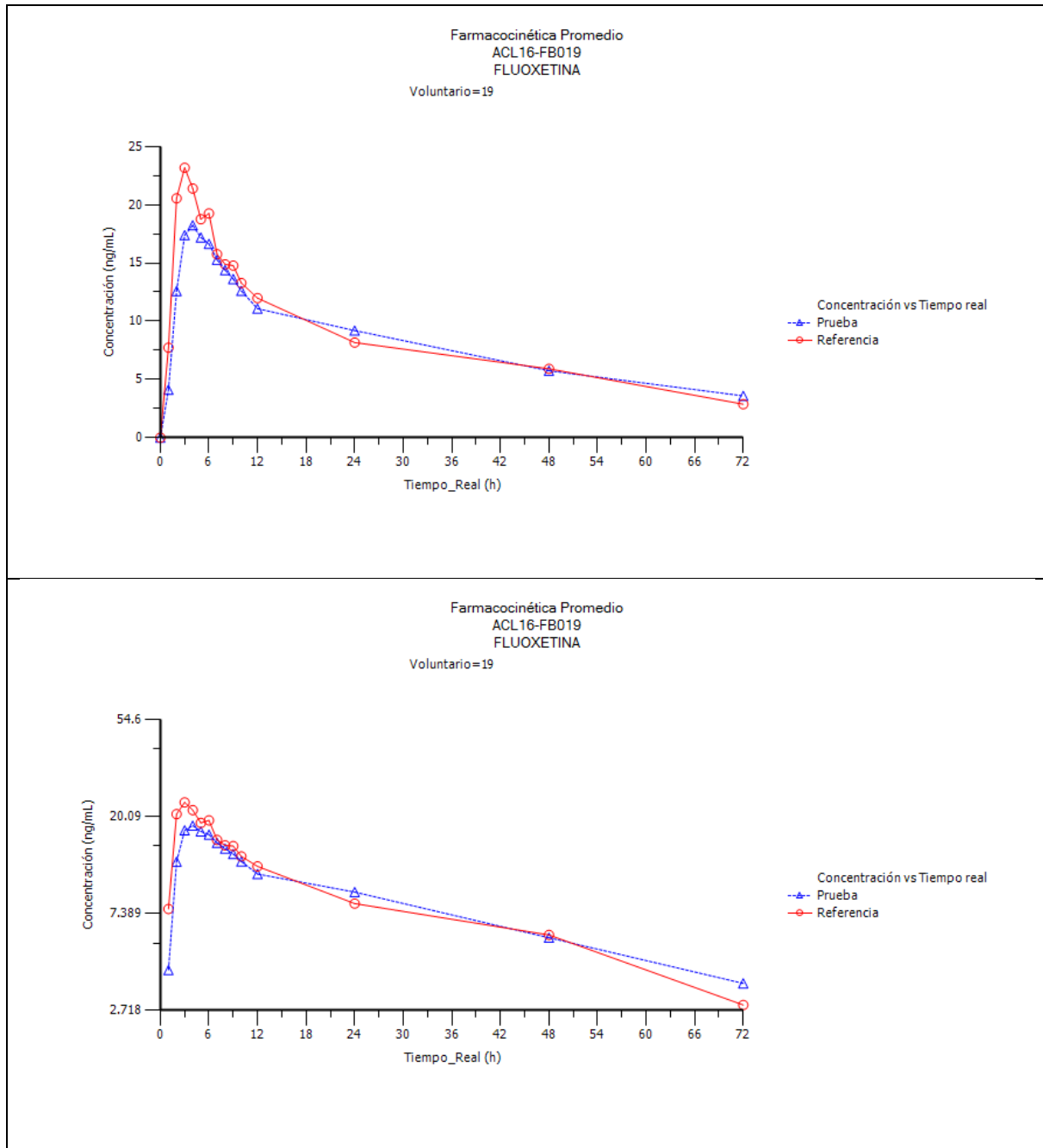


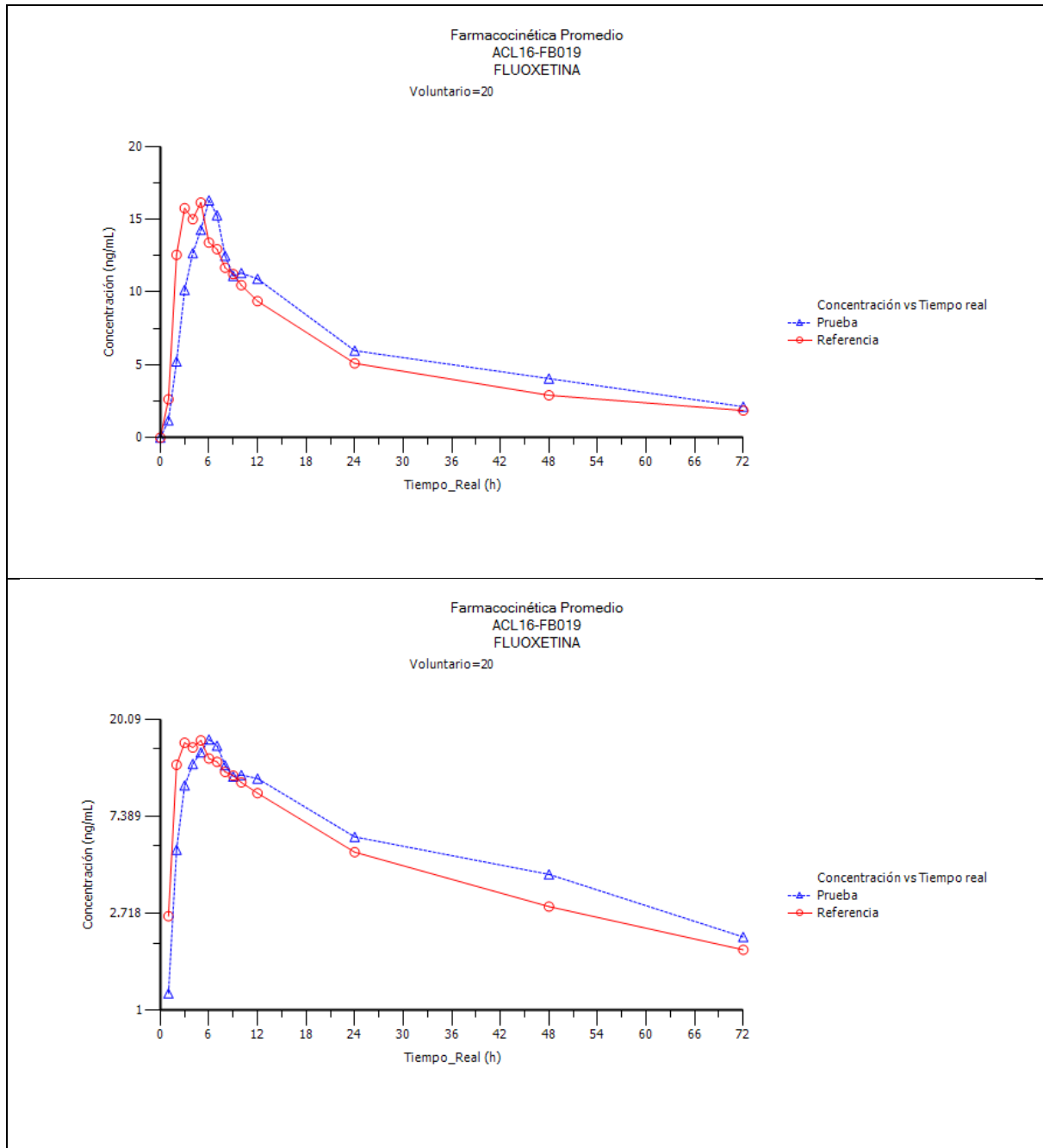


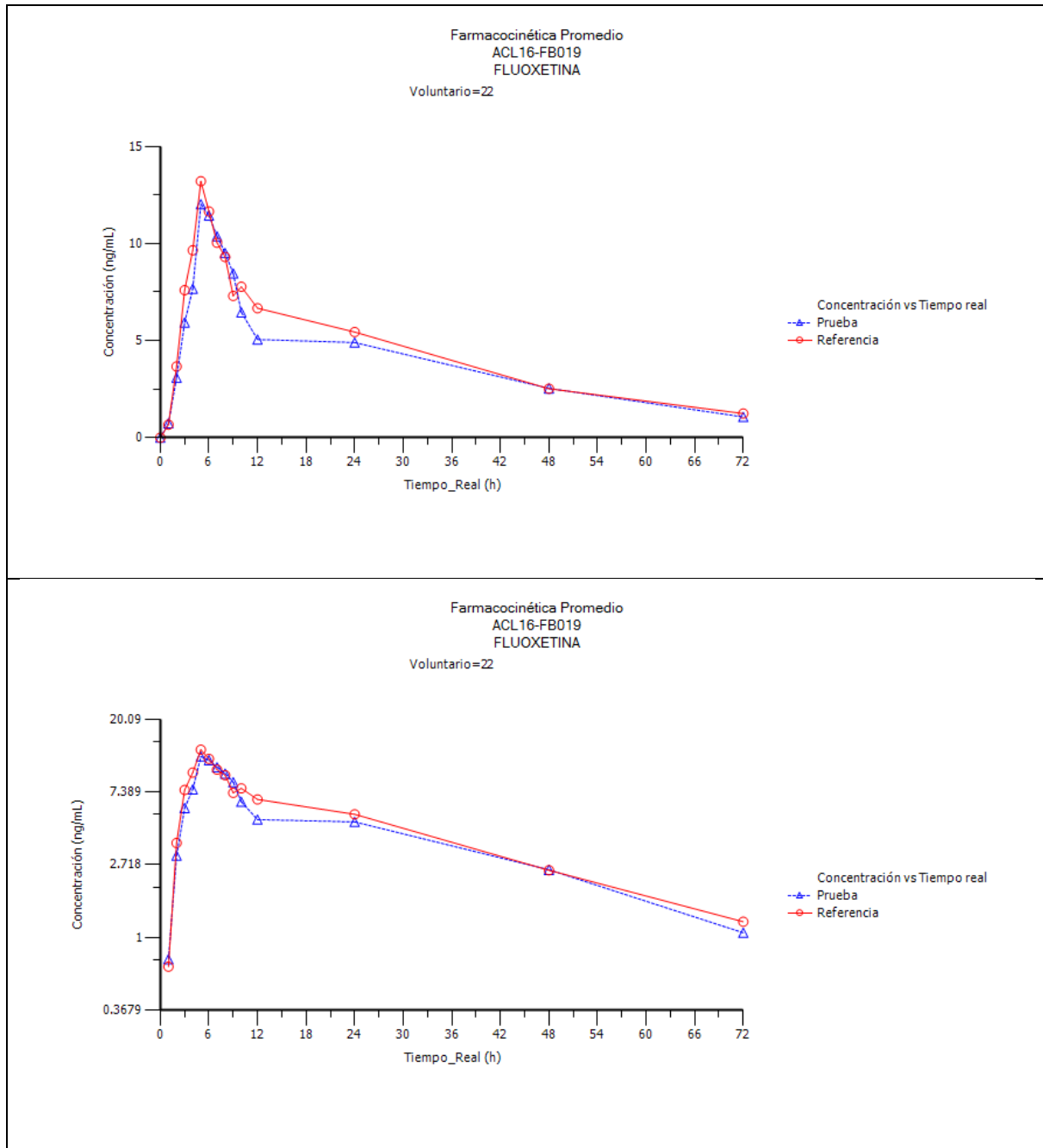


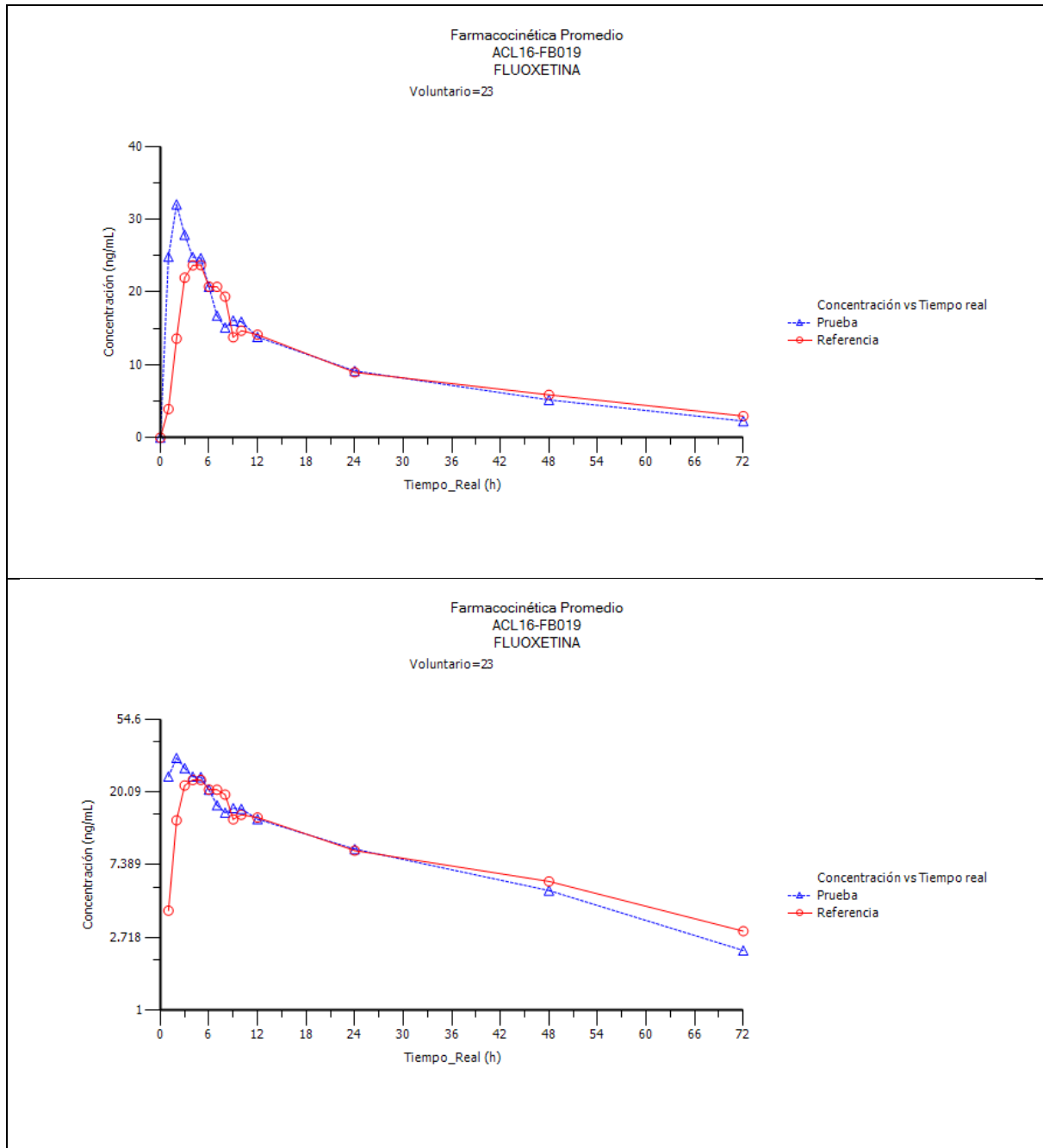


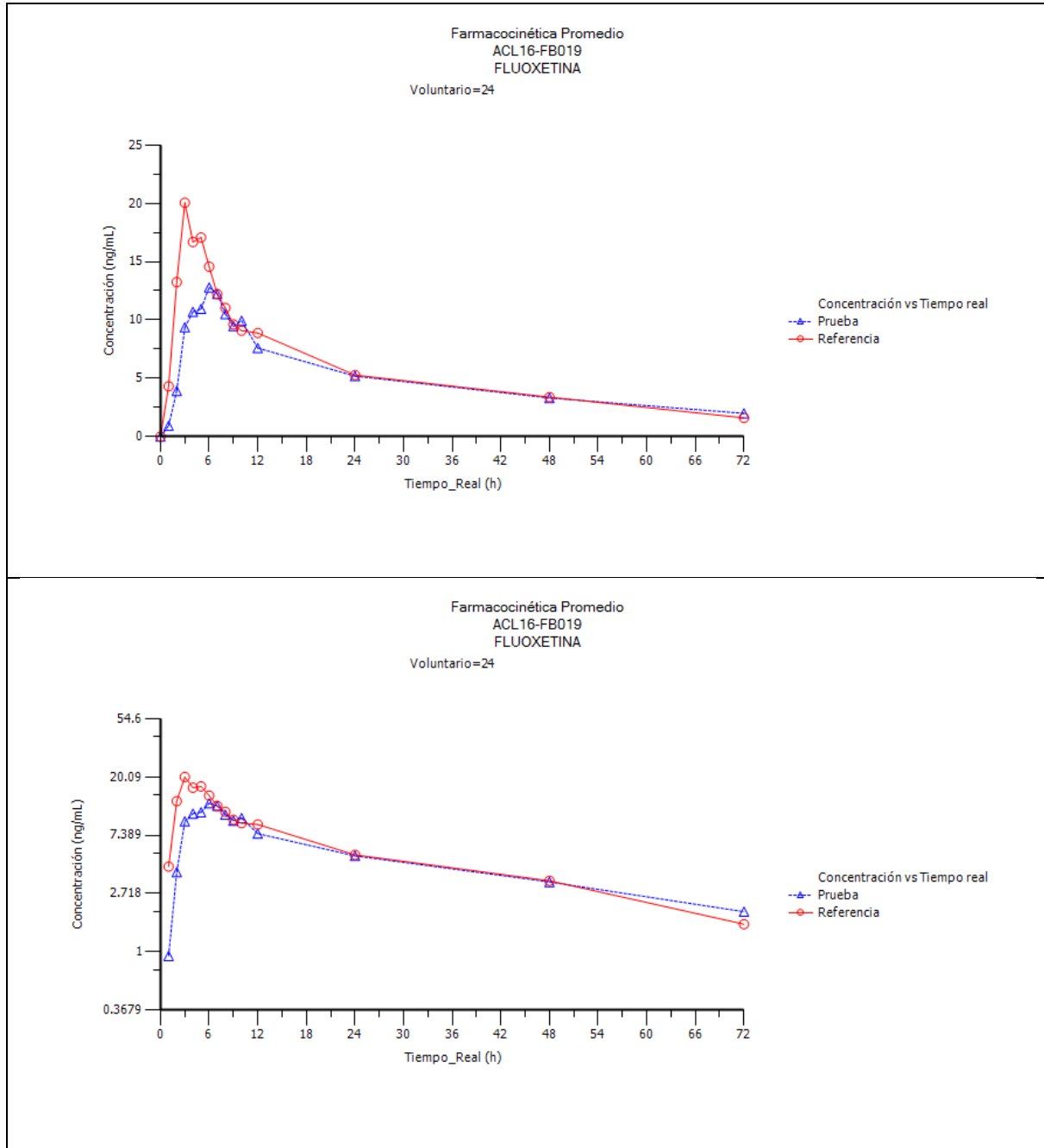


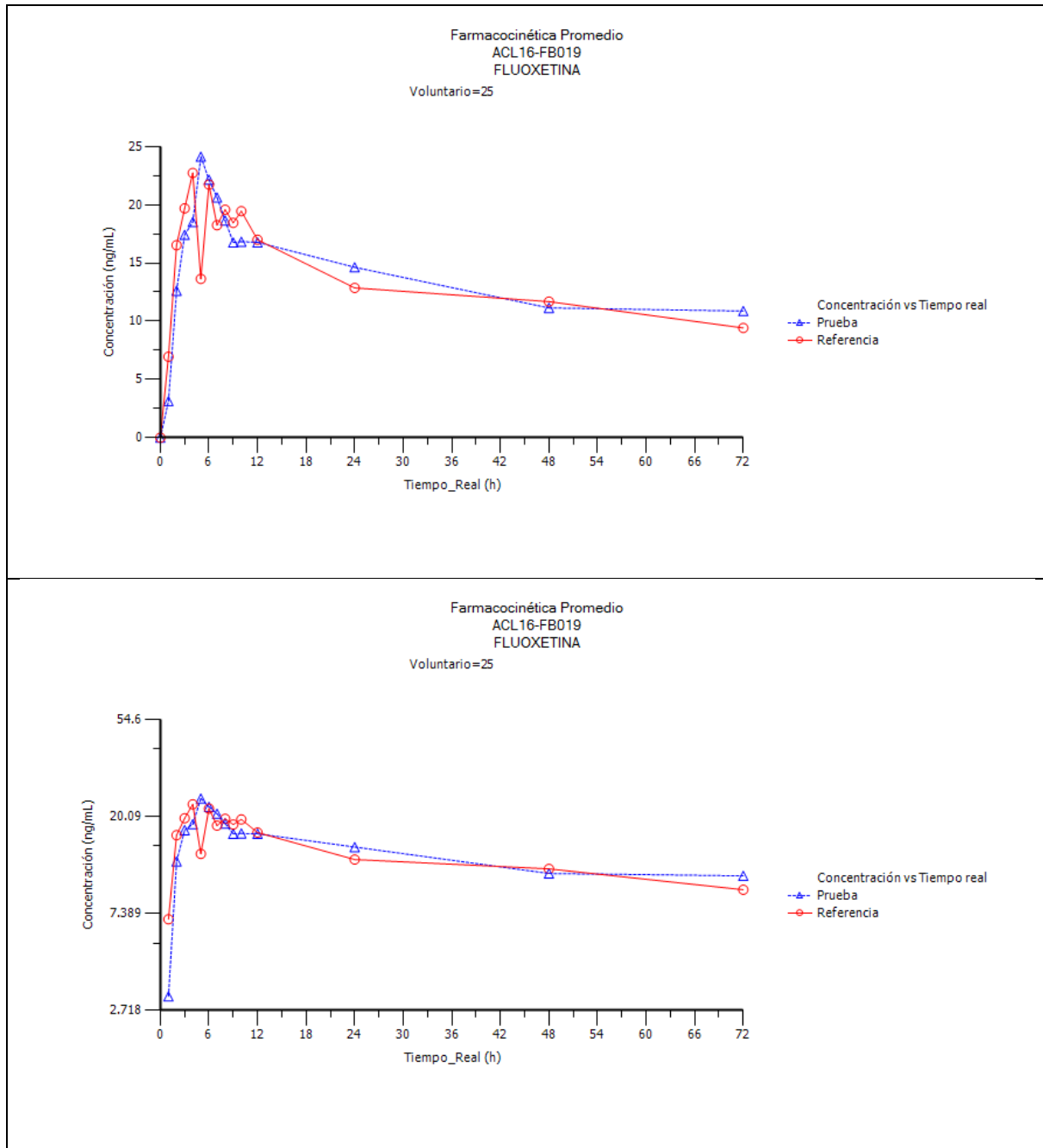


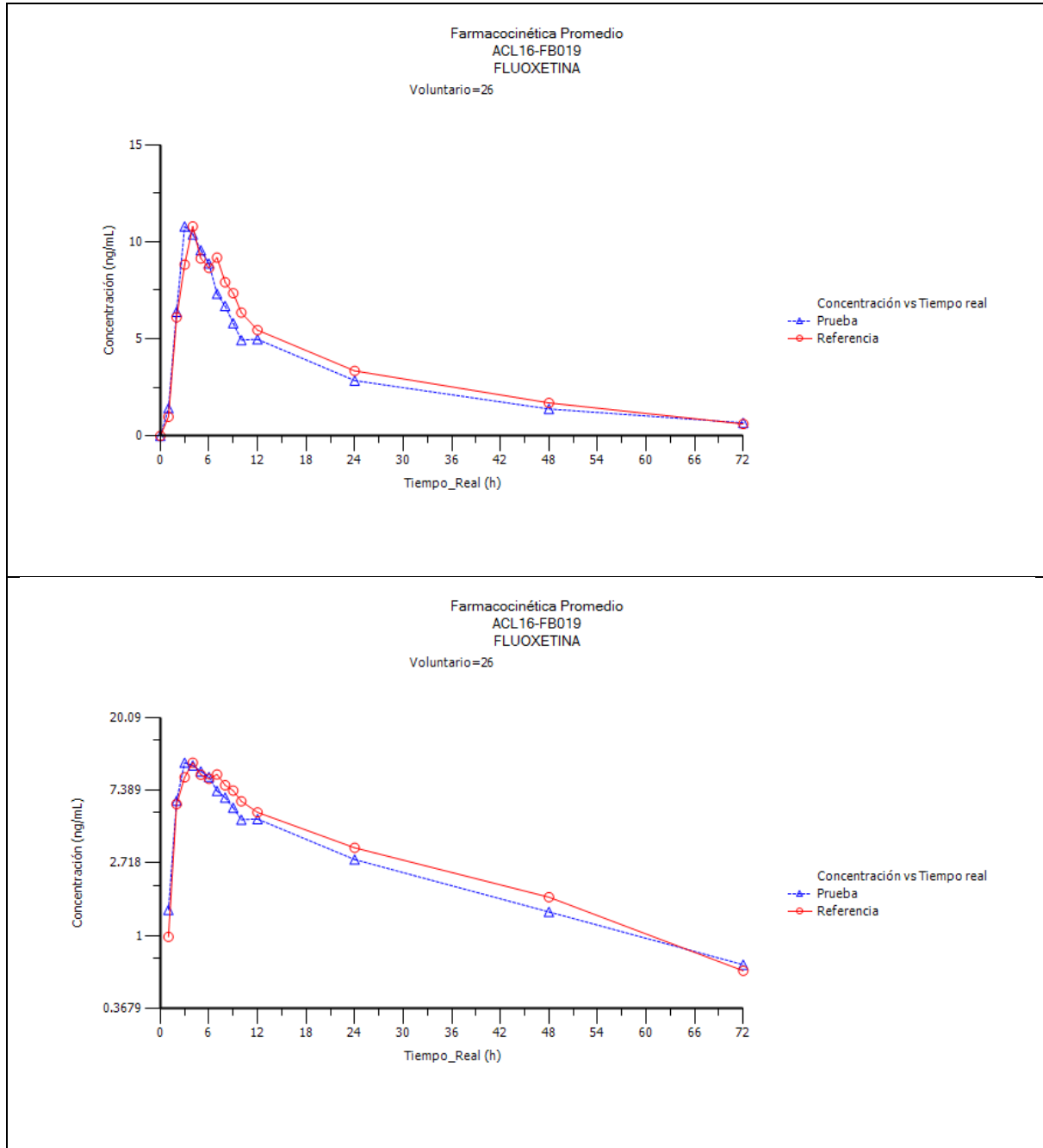












9.f. Asociación de variantes genéticas con la variable $C_{m\acute{a}x}$ (Salida de datos crudos de PLINK)

Salida de datos crudos de gPLINK con la asociación por regresión lineal múltiple del parámetro farmacocinético $C_{m\acute{a}x}$ con las variantes estudiadas con al menos dos alelos presentes. Se incluye la covariante analizada en cada regresión (TEST), el coeficiente beta (BETA), el estadístico calculado (STAT) y el valor p para evaluar su significancia.

| Gene | SNV | BP | A1 | TEST | BETA | STAT | P |
|---------|--------------------|----------|----|------|--------|--------|-------|
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1045642 | 87138645 | G | ADD | -1.773 | -1.574 | 0.132 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1045642 | 87138645 | G | Sex | 5.854 | 2.648 | 0.016 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1045642 | 87138645 | G | Age | -0.128 | -1.531 | 0.142 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1045642 | 87138645 | G | IMC | 0.110 | 0.246 | 0.808 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs2032582 | 87160618 | C | ADD | -2.271 | -2.302 | 0.033 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs2032582 | 87160618 | C | Sex | 6.140 | 3.060 | 0.006 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs2032582 | 87160618 | C | Age | -0.132 | -1.734 | 0.099 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs2032582 | 87160618 | C | IMC | 0.146 | 0.357 | 0.725 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1128503 | 87179601 | G | ADD | -2.108 | -2.179 | 0.042 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1128503 | 87179601 | G | Sex | 5.688 | 2.736 | 0.013 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1128503 | 87179601 | G | Age | -0.164 | -2.196 | 0.041 |
| ABCB1 | IlmnSeq_rs1128503 | 87179601 | G | IMC | 0.188 | 0.459 | 0.651 |
| CYP3A5 | IlmnSeq_rs776746 | 99270539 | A | ADD | -1.676 | -1.389 | 0.181 |
| CYP3A5 | IlmnSeq_rs776746 | 99270539 | A | Sex | 6.543 | 3.046 | 0.007 |
| CYP3A5 | IlmnSeq_rs776746 | 99270539 | A | Age | -0.162 | -2.034 | 0.056 |
| CYP3A5 | IlmnSeq_rs776746 | 99270539 | A | IMC | 0.169 | 0.380 | 0.708 |
| CYP3A4 | rs67666821 | 99355806 | I | ADD | 3.351 | 0.841 | 0.411 |
| CYP3A4 | rs67666821 | 99355806 | I | Sex | 6.973 | 3.175 | 0.005 |
| CYP3A4 | rs67666821 | 99355806 | I | Age | -0.172 | -2.094 | 0.050 |
| CYP3A4 | rs67666821 | 99355806 | I | IMC | 0.232 | 0.510 | 0.616 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs3735451 | 99355975 | G | ADD | -0.882 | -0.809 | 0.429 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs3735451 | 99355975 | G | Sex | 6.591 | 2.946 | 0.008 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs3735451 | 99355975 | G | Age | -0.173 | -2.111 | 0.048 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs3735451 | 99355975 | G | IMC | 0.237 | 0.520 | 0.609 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2242480 | 99361466 | G | ADD | -0.434 | -0.391 | 0.700 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2242480 | 99361466 | G | Sex | 6.766 | 2.989 | 0.008 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2242480 | 99361466 | G | Age | -0.166 | -1.951 | 0.066 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2242480 | 99361466 | G | IMC | 0.308 | 0.681 | 0.504 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2687116 | 99365943 | C | ADD | 0.313 | 0.145 | 0.886 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2687116 | 99365943 | C | Sex | 6.990 | 3.069 | 0.006 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2687116 | 99365943 | C | Age | -0.172 | -2.064 | 0.053 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2687116 | 99365943 | C | IMC | 0.305 | 0.671 | 0.510 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2740574 | 99382096 | G | ADD | -0.373 | -0.257 | 0.800 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2740574 | 99382096 | G | Sex | 6.827 | 3.014 | 0.007 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2740574 | 99382096 | G | Age | -0.171 | -2.039 | 0.056 |
| CYP3A4 | IlmnSeq_rs2740574 | 99382096 | G | IMC | 0.289 | 0.630 | 0.536 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs11188072 | 96519061 | A | ADD | -0.594 | -0.269 | 0.791 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs11188072 | 96519061 | A | Sex | 7.041 | 3.098 | 0.006 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs11188072 | 96519061 | A | Age | -0.175 | -2.086 | 0.051 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs11188072 | 96519061 | A | IMC | 0.340 | 0.719 | 0.481 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4986894 | 96522365 | G | ADD | 3.163 | 1.571 | 0.133 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4986894 | 96522365 | G | Sex | 6.675 | 3.164 | 0.005 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4986894 | 96522365 | G | Age | -0.185 | -2.346 | 0.030 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4986894 | 96522365 | G | IMC | 0.352 | 0.821 | 0.422 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs12769205 | 96535124 | G | ADD | 3.163 | 1.571 | 0.133 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs12769205 | 96535124 | G | Sex | 6.675 | 3.164 | 0.005 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs12769205 | 96535124 | G | Age | -0.185 | -2.346 | 0.030 |

| | | | | | | | |
|---------|--------------------|----------|---|-----|--------|--------|-------|
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs12769205 | 96535124 | G | IMC | 0.352 | 0.821 | 0.422 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4244285 | 96541616 | A | ADD | 3.163 | 1.571 | 0.133 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4244285 | 96541616 | A | Sex | 6.675 | 3.164 | 0.005 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4244285 | 96541616 | A | Age | -0.185 | -2.346 | 0.030 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4244285 | 96541616 | A | IMC | 0.352 | 0.821 | 0.422 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs3758581 | 96602623 | A | ADD | 2.450 | 0.595 | 0.559 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs3758581 | 96602623 | A | Sex | 6.964 | 3.142 | 0.005 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs3758581 | 96602623 | A | Age | -0.179 | -2.148 | 0.045 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs3758581 | 96602623 | A | IMC | 0.259 | 0.566 | 0.578 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4917623 | 96609568 | A | ADD | 1.751 | 1.505 | 0.149 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4917623 | 96609568 | A | Sex | 6.386 | 2.979 | 0.008 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4917623 | 96609568 | A | Age | -0.214 | -2.562 | 0.019 |
| CYP2C19 | IlmnSeq_rs4917623 | 96609568 | A | IMC | 0.272 | 0.632 | 0.535 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1799853 | 96702047 | A | ADD | -3.694 | -1.283 | 0.215 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1799853 | 96702047 | A | Sex | 7.545 | 3.432 | 0.003 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1799853 | 96702047 | A | Age | -0.160 | -1.986 | 0.062 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1799853 | 96702047 | A | IMC | 0.224 | 0.509 | 0.617 |
| CYP2C9 | rs2256871 | 96708974 | G | ADD | -0.459 | -0.110 | 0.913 |
| CYP2C9 | rs2256871 | 96708974 | G | Sex | 6.908 | 3.082 | 0.006 |
| CYP2C9 | rs2256871 | 96708974 | G | Age | -0.170 | -1.967 | 0.064 |
| CYP2C9 | rs2256871 | 96708974 | G | IMC | 0.306 | 0.672 | 0.510 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057910 | 96741053 | C | ADD | 2.450 | 0.595 | 0.559 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057910 | 96741053 | C | Sex | 6.964 | 3.142 | 0.005 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057910 | 96741053 | C | Age | -0.179 | -2.148 | 0.045 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057910 | 96741053 | C | IMC | 0.259 | 0.566 | 0.578 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057911 | 96748737 | A | ADD | 2.450 | 0.595 | 0.559 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057911 | 96748737 | A | Sex | 6.964 | 3.142 | 0.005 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057911 | 96748737 | A | Age | -0.179 | -2.148 | 0.045 |
| CYP2C9 | IlmnSeq_rs1057911 | 96748737 | A | IMC | 0.259 | 0.566 | 0.578 |
| CYP2C8 | IlmnSeq_rs11572080 | 96827030 | A | ADD | -0.802 | -0.187 | 0.854 |
| CYP2C8 | IlmnSeq_rs11572080 | 96827030 | A | Sex | 7.021 | 2.453 | 0.025 |
| CYP2C8 | IlmnSeq_rs11572080 | 96827030 | A | Age | -0.140 | -1.555 | 0.137 |
| CYP2C8 | IlmnSeq_rs11572080 | 96827030 | A | IMC | 0.236 | 0.468 | 0.645 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2069526 | 75041341 | C | ADD | 0.325 | 0.128 | 0.899 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2069526 | 75041341 | C | Sex | 7.001 | 3.030 | 0.007 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2069526 | 75041341 | C | Age | -0.175 | -2.047 | 0.055 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2069526 | 75041341 | C | IMC | 0.322 | 0.678 | 0.506 |
| CYP1A2 | ilmnseq_rs762551 | 75041917 | C | ADD | -1.906 | -1.056 | 0.304 |
| CYP1A2 | ilmnseq_rs762551 | 75041917 | C | Sex | 6.343 | 2.829 | 0.011 |
| CYP1A2 | ilmnseq_rs762551 | 75041917 | C | Age | -0.181 | -2.223 | 0.039 |
| CYP1A2 | ilmnseq_rs762551 | 75041917 | C | IMC | 0.475 | 1.010 | 0.325 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2472304 | 75044238 | A | ADD | 1.188 | 0.907 | 0.376 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2472304 | 75044238 | A | Sex | 7.261 | 3.271 | 0.004 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2472304 | 75044238 | A | Age | -0.181 | -2.199 | 0.040 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2472304 | 75044238 | A | IMC | 0.475 | 0.983 | 0.338 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2470890 | 75047426 | A | ADD | 1.188 | 0.907 | 0.376 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2470890 | 75047426 | A | Sex | 7.261 | 3.271 | 0.004 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2470890 | 75047426 | A | Age | -0.181 | -2.199 | 0.040 |
| CYP1A2 | IlmnSeq_rs2470890 | 75047426 | A | IMC | 0.475 | 0.983 | 0.338 |
| SLC6A4 | rs1042173 | 28525011 | A | ADD | 1.164 | 0.984 | 0.338 |
| SLC6A4 | rs1042173 | 28525011 | A | Sex | 6.616 | 3.002 | 0.007 |
| SLC6A4 | rs1042173 | 28525011 | A | Age | -0.174 | -2.139 | 0.046 |
| SLC6A4 | rs1042173 | 28525011 | A | IMC | 0.329 | 0.741 | 0.468 |
| SLC6A4 | IlmnSeq_rs2066713 | 28551665 | A | ADD | 0.694 | 0.390 | 0.701 |
| SLC6A4 | IlmnSeq_rs2066713 | 28551665 | A | Sex | 6.610 | 2.789 | 0.012 |
| SLC6A4 | IlmnSeq_rs2066713 | 28551665 | A | Age | -0.181 | -2.105 | 0.049 |

| | | | | | | | |
|--------|---------------------------|----------|---|-----|--------|--------|-------|
| SLC6A4 | IlmnSeq_rs2066713 | 28551665 | A | IMC | 0.329 | 0.719 | 0.481 |
| CYP2B6 | rs4802101 | 41496461 | A | ADD | 5.379 | 2.913 | 0.009 |
| CYP2B6 | rs4802101 | 41496461 | A | Sex | 7.665 | 4.085 | 0.001 |
| CYP2B6 | rs4802101 | 41496461 | A | Age | -0.182 | -2.622 | 0.017 |
| CYP2B6 | rs4802101 | 41496461 | A | IMC | 0.110 | 0.285 | 0.779 |
| CYP2B6 | seq-rs35303484 | 41497346 | G | ADD | 2.774 | 0.656 | 0.520 |
| CYP2B6 | seq-rs35303484 | 41497346 | G | Sex | 7.137 | 3.194 | 0.005 |
| CYP2B6 | seq-rs35303484 | 41497346 | G | Age | -0.194 | -2.183 | 0.042 |
| CYP2B6 | seq-rs35303484 | 41497346 | G | IMC | 0.363 | 0.791 | 0.439 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279342 | 41510127 | A | ADD | -2.751 | -1.652 | 0.115 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279342 | 41510127 | A | Sex | 7.701 | 3.594 | 0.002 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279342 | 41510127 | A | Age | -0.173 | -2.217 | 0.039 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279342 | 41510127 | A | IMC | 0.357 | 0.838 | 0.412 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803418 | 41511803 | G | ADD | -2.904 | -2.869 | 0.010 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803418 | 41511803 | G | Sex | 7.798 | 4.121 | 0.001 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803418 | 41511803 | G | Age | -0.253 | -3.369 | 0.003 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803418 | 41511803 | G | IMC | 0.274 | 0.721 | 0.480 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803419 | 41512792 | A | ADD | -2.904 | -2.869 | 0.010 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803419 | 41512792 | A | Sex | 7.798 | 4.121 | 0.001 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803419 | 41512792 | A | Age | -0.253 | -3.369 | 0.003 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs4803419 | 41512792 | A | IMC | 0.274 | 0.721 | 0.480 |
| CYP2B6 | Ilmnseq_rs3745274 | 41512841 | A | ADD | 1.137 | 0.887 | 0.386 |
| CYP2B6 | Ilmnseq_rs3745274 | 41512841 | A | Sex | 6.912 | 3.154 | 0.005 |
| CYP2B6 | Ilmnseq_rs3745274 | 41512841 | A | Age | -0.193 | -2.270 | 0.035 |
| CYP2B6 | Ilmnseq_rs3745274 | 41512841 | A | IMC | 0.276 | 0.618 | 0.544 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279343 | 41515263 | G | ADD | 1.137 | 0.887 | 0.386 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279343 | 41515263 | G | Sex | 6.912 | 3.154 | 0.005 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279343 | 41515263 | G | Age | -0.193 | -2.270 | 0.035 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs2279343 | 41515263 | G | IMC | 0.276 | 0.618 | 0.544 |
| CYP2B6 | rs2279344 | 41515483 | G | ADD | 4.935 | 3.137 | 0.005 |
| CYP2B6 | rs2279344 | 41515483 | G | Sex | 8.470 | 4.504 | 0.000 |
| CYP2B6 | rs2279344 | 41515483 | G | Age | -0.221 | -3.179 | 0.005 |
| CYP2B6 | rs2279344 | 41515483 | G | IMC | 0.376 | 1.016 | 0.322 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs8192719 | 41518773 | A | ADD | 1.137 | 0.887 | 0.386 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs8192719 | 41518773 | A | Sex | 6.912 | 3.154 | 0.005 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs8192719 | 41518773 | A | Age | -0.193 | -2.270 | 0.035 |
| CYP2B6 | IlmnSeq_rs8192719 | 41518773 | A | IMC | 0.276 | 0.618 | 0.544 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1135840 | 42522613 | C | ADD | 2.007 | 1.806 | 0.087 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1135840 | 42522613 | C | Sex | 6.466 | 3.107 | 0.006 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1135840 | 42522613 | C | Age | -0.158 | -2.043 | 0.055 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1135840 | 42522613 | C | IMC | 0.200 | 0.471 | 0.643 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs16947 | 42523943 | A | ADD | -0.257 | -0.179 | 0.860 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs16947 | 42523943 | A | Sex | 7.018 | 3.094 | 0.006 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs16947 | 42523943 | A | Age | -0.172 | -2.043 | 0.056 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs16947 | 42523943 | A | IMC | 0.233 | 0.499 | 0.624 |
| CYP2D6 | chr22-42525772:rs28371706 | 42525772 | A | ADD | 3.552 | 0.848 | 0.407 |
| CYP2D6 | chr22-42525772:rs28371706 | 42525772 | A | Sex | 7.213 | 3.248 | 0.004 |
| CYP2D6 | chr22-42525772:rs28371706 | 42525772 | A | Age | -0.200 | -2.269 | 0.035 |
| CYP2D6 | chr22-42525772:rs28371706 | 42525772 | A | IMC | 0.389 | 0.851 | 0.406 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs28371703 | 42525821 | A | ADD | 4.873 | 2.636 | 0.016 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs28371703 | 42525821 | A | Sex | 6.417 | 3.337 | 0.003 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs28371703 | 42525821 | A | Age | -0.202 | -2.789 | 0.012 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs28371703 | 42525821 | A | IMC | 0.311 | 0.800 | 0.434 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1065852 | 42526694 | A | ADD | 3.292 | 1.883 | 0.077 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1065852 | 42526694 | A | Sex | 6.945 | 3.066 | 0.007 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1065852 | 42526694 | A | Age | -0.135 | -1.505 | 0.151 |

| | | | | | | | |
|--------|--------------------|----------|---|-----|--------|--------|-------|
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1065852 | 42526694 | A | IMC | -0.035 | -0.071 | 0.945 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs72549358 | 42526775 | A | ADD | 3.011 | 0.733 | 0.472 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs72549358 | 42526775 | A | Sex | 7.167 | 3.215 | 0.005 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs72549358 | 42526775 | A | Age | -0.162 | -1.932 | 0.068 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs72549358 | 42526775 | A | IMC | 0.351 | 0.775 | 0.448 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1080985 | 42528382 | G | ADD | 0.361 | 0.287 | 0.777 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1080985 | 42528382 | G | Sex | 6.921 | 3.102 | 0.006 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1080985 | 42528382 | G | Age | -0.171 | -2.056 | 0.054 |
| CYP2D6 | IlmnSeq_rs1080985 | 42528382 | G | IMC | 0.279 | 0.603 | 0.553 |

9.g. Análisis retrospectivo de estudios clínicos de bioequivalencia

Como análisis adicional del tema del presente proyecto de investigación, se realizó la integración de una base de datos de los estudios clínicos de bioequivalencia realizados en el tercero autorizado ACL, desde 2011 a marzo del 2020, donde se registraron más de 260 entradas de principios activos provenientes de 230 estudios clínicos conducidos en este centro. Se registraron las siguientes variables de cada estudio:

- Formulación: Principio activo/forma farmacéutica/dosis (mg)
- Molécula: Peso molecular/pKa/solubilidad más baja (mg/mL)/cLogP/logP/BCS (cLogP y logP) (www.tsrlinc.net/search.cfm)
- Diseño de estudio:
 - o Características del estudio: Cruzado, paralelo, piloto, replicado, ayuno, alimentación
 - o Población de estudio: Voluntarios sanos, pacientes, masculinos, femeninos, ambos
 - o Tamaño de muestra del estudio
 - o Último tiempo de muestreo registrado
- Variables de seguridad:
 - o Número de eventos adversos registrados (gravedad y severidad más alta)
- Variables farmacogenéticas de la molécula de estudio:
 - o Enzima metabolizadora principal (>80%) y enzimas secundarias (PharmGKB)
- Variables farmacocinéticas y variabilidad:
 - o $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$: variabilidad intrasujeto/variabilidad intersujeto/número de datos extremos/potencia de la prueba de bioequivalencia/efecto de periodo, secuencia o formulación en ANOVA
 - o Cociente $ABC_{0-t} / ABC_{0-\infty}$ del producto de prueba y de referencia
- Variables farmacocinéticas de eliminación de cada producto (prueba y referencia):
 - o $t_{1/2}$ /depuración (Cl)/volumen de distribución (Vd)

A partir de esta base de datos, se realizó un análisis estadístico de correlación de las variables descritas previamente, con el software IBM® SPSS® Statistics V. 25 (IBM, 2017). Adicionalmente, se calculó el coeficiente de variación intrasujeto agrupado (*pooled intrasubject*

variability) con los estudios disponibles para cada principio activo con el paquete “PowerTOST” v1.4-7, ejecutado en el entorno de R v3.3.3, usando RStudio.

9.g.i. Resultados

Del análisis estadístico realizado a partir de 230 estudios clínicos, se encontró que la forma farmacéutica más evaluada en estudios de bioequivalencia fue tableta con un 74.6%, mientras que un 11.2% fue cápsula, y 5.2% tableta de liberación modificada. El resto de las formas farmacéuticas tuvo una abundancia individual menor al 3% en cada categoría (*Fig. 14.A*). Las clases terapéuticas más probadas fueron medicamentos de áreas neurológicas, antivirales, cardiovasculares y oncológicos, con una cantidad de estudios de 62, 50, 41 y 29, respectivamente (*Fig. 14.B*).

Respecto a las características fisicoquímicas, la clase II de la BCS fue la más abundante con 36.5% de las moléculas en investigación, siguiéndoles las clases I, III y IV, esta última con menos del 10% (*Fig. 14.C*). De las 268 moléculas registradas y analizadas, un 27.6% de ellos no aplica un metabolismo por citocromos o no tiene información disponible. Sin considerar a estos fármacos para las estadísticas posteriores, el 50.5% son metabolizados por *CYP3A4*, un 12.4% por *CYP2D6*, 7.7% por *CYP2C9*, 4.1% por *CYP1A2*, mientras que el resto de los citocromos tienen una aportación individual de 1.5% o menor (*Fig. 14.D*). Adicionalmente, un 9.3% de los principios activos es metabolizado por *UDPGT* y un 1.5% por la familia de las esterasas. El 59.7% de los fármacos en investigación en esta base de datos tienen metabolitos no activos, mientras que el 39.0% de los fármacos tienen metabolitos sin actividad, y un 1.3% no tiene información disponible.

La clasificación biofarmacéutica (BCS), que categoriza solubilidad y permeabilidad para cada principio activo, se encontró que tiene influencia sobre la variabilidad intra- e intersujeto de las variables farmacocinéticas, especialmente sobre $C_{m\acute{a}x}$ (*Fig. 15.A*), explorado mediante un modelo de regresión lineal estratificado por BCS. Se encontró que los fármacos de clase II (baja solubilidad/alta permeabilidad) tienen la mayor variabilidad intrasujeto para los tres parámetros farmacocinéticos, mientras que su variabilidad intersujeto en los tres parámetros farmacocinéticos analizados incluye principios activos con variabilidades que resultan ser datos extremos, mucho mayores a las demás clases.

Respecto a la principal enzima metabolizadora reportada para cada principio activo, se encontró una influencia sobre la variabilidad intra- e intersujeto de $C_{m\acute{a}x}$ (Fig. 15.B), mediante una regresión lineal estratificada por CYP. Las moléculas metabolizadas principalmente por el CYP3A4 tienden a tener mayor variabilidad intrasujeto en $C_{m\acute{a}x}$, mientras que las moléculas metabolizadas por CYP2D6 tienden a tener mayores variabilidades intersujeto.

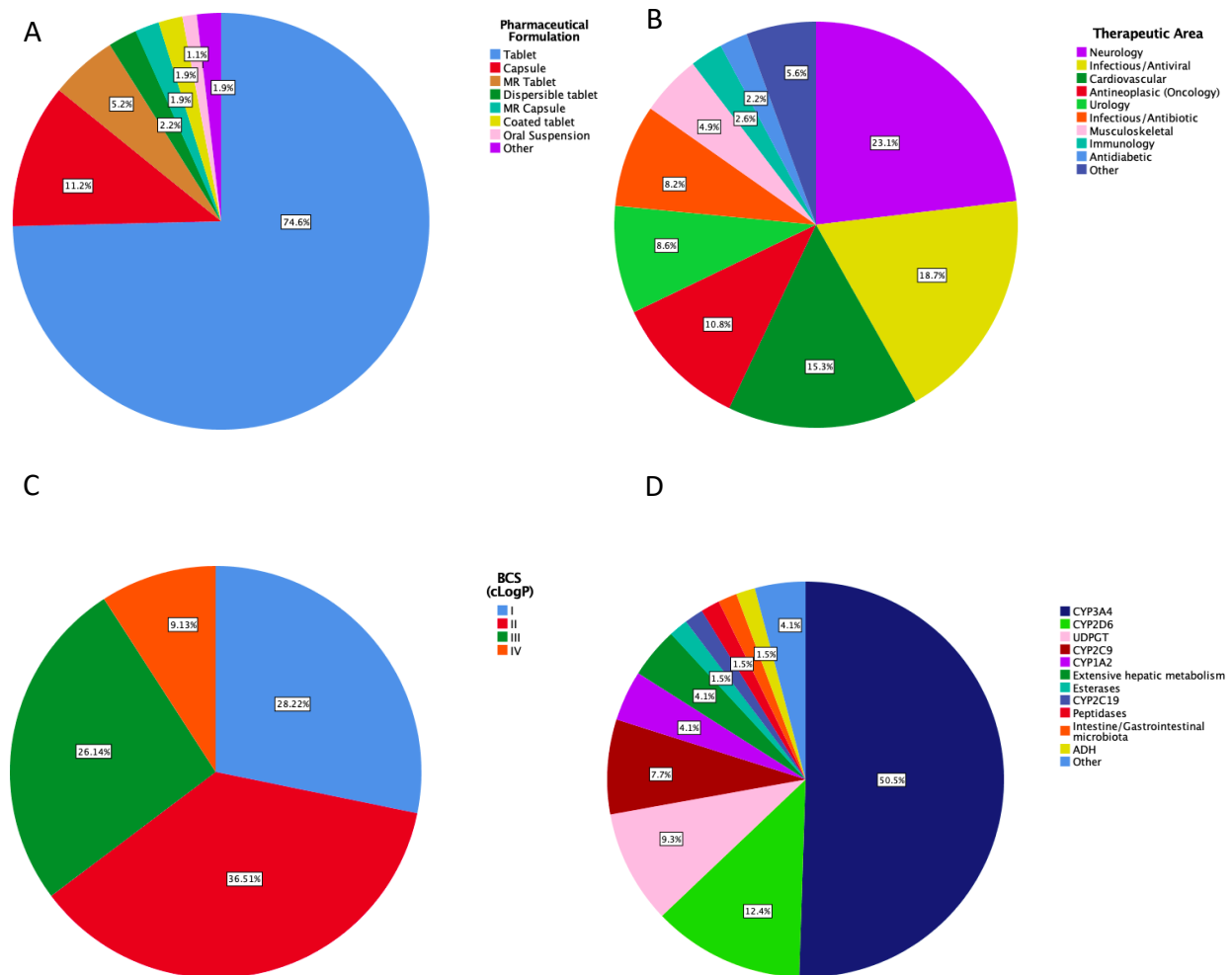


Figura 14. Características de las formulaciones de los estudios de bioequivalencia analizados.

A. Formas farmacéuticas de los medicamentos administrados. La categoría "Otros" agrupa los medicamentos en suspensiones orales e inyectables y las formulaciones de polvo seco inhalado. (MR = Liberación modificada). **B.**

Áreas terapéuticas de los principios activos administrados. La categoría "Otros" agrupa los medicamentos relacionados con las áreas clínicas de endocrinología y enfermedades gastrointestinales, manejo del dolor y hematología. **C.** Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) de los principios activos administrados, ordenados por su permeabilidad (cLogP). **D.** Principales enzimas metabólicas implicadas en la degradación de los compuestos activos individuales en este análisis. Se excluyeron aquellos principios activos que, según se informa, no sufren biotransformaciones. La categoría "Otros" agrupa 4 clases de CYP (*CYP3A5*, *CYP2B6*, *CYP2C8* y *CYP4F2*) que se reportaron como las principales enzimas metabólicas para algunos principios activos. Las monoaminooxidasas (MAO), sulfotransferasas (*SULT*), timidina fosforilasa y adenilato cinasa / nucleósido difosfato cinasa (*AK/NDK*)

también se encontraron como etapas metabólicas secundarias para algunos fármacos, junto con 6 CYP adicionales (CYP1A1, CYP2A6, CYP2C18A7, CYP2C18A7 y CYP4F12).

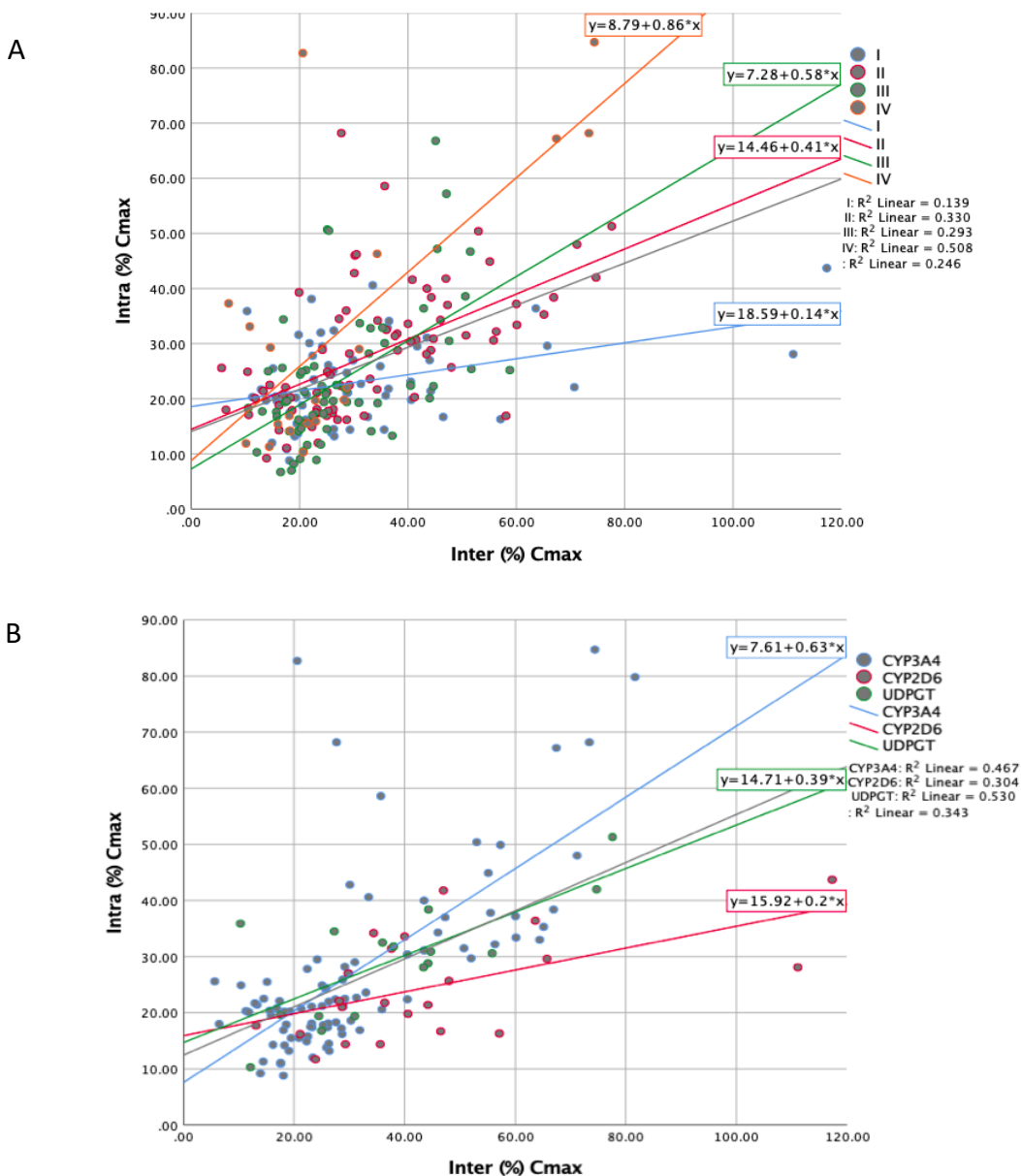


Figura 15. Variabilidad intersujeto contra intrasujeto del parámetro farmacocinético $C_{\text{máx}}$.

A. Estratificación por BCS del principio activo ($n = 226$ principios activos individuales). **B.** Estratificación por citocromo metabolizador principal ($n = 108$ principios activos individuales). La línea de ajuste en color gris representa la línea de regresión a todo el conjunto de puntos en cada gráfico.

Adicionalmente se encontró que la dosis tiene influencia negativa en la variabilidad intersujeto de los parámetros de ABC (-0.183^* para ABC_{0-t} y -0.206^* para $ABC_{0-\infty}$), basado en los coeficientes de correlación de Pearson (nivel de significancia estadística: $p < 0.05^*$ o $p < 0.001^{**}$).

La variabilidad intrasujeto de $C_{m\acute{a}x}$ correlaciona directamente con las variabilidades intra- e intersujeto de los parámetros farmacocinéticos de ABC analizados (0.513** con variabilidad intersujeto de $C_{m\acute{a}x}$, 0.758** con variabilidad intrasujeto de ABC_{0-t} , 0.381** para la variabilidad intersujeto de ABC_{0-t} , 0.700** para variabilidad intrasujeto de $ABC_{0-\infty}$ y 0.359** para variabilidad intrasujeto de $ABC_{0-\infty}$). Las variabilidades intra- e intersujeto de los parámetros farmacocinéticos tienen una correlación positiva entre ellas.

Para estimar la variabilidad intrasujeto de $C_{m\acute{a}x}$, que es el parámetro farmacocinético más variable, se ajustó un modelo predictivo de regresión lineal multivariado, resultando significativa la siguiente ecuación:

$$\text{IntraCmax (\%)} = 0.033 * MW + 0.295 * pka - 0.006 * \text{LowSol} + 1.140 * \log P$$

$$R = 0.563, R^2 = 0.317, \text{ significancia del modelo } p < 0.000.$$

Además, se ajustó un modelo para la variabilidad intrasujeto de $C_{m\acute{a}x}$ basado en su variabilidad intersujeto:

$$\text{IntraCmax (\%)} = 13.099 + 0.366 * \text{InterCmax (\%)}$$

$$R = 0.501, R^2 = 0.251, \text{ significancia del modelo } p < 0.000.$$

Finalmente, una de las contribuciones más destacables de este análisis retrospectivo es el compendio de variabilidades farmacocinéticas, calculadas a partir de las experiencias de bioequivalencia en sujetos sanos mexicanos, el cual se preparó para la publicación incluida en el *anexo 9.i*. Dicho compendio, tal cual será publicado en inglés, se presenta en el *anexo 9.h*, donde se reportan los coeficientes de variación intrasujeto agrupados (*pooled intrasubject variability*) para 69 principios activos. Adicionalmente, en el *anexo 9.i* se reporta una tabla con las variabilidades intrasujeto de 41 principios activos farmacéuticos, calculadas a partir de los datos de sujetos sanos mexicanos de solo un estudio de bioequivalencia.

9.g.ii. **Discusiones**

En el análisis estadístico exploratorio de los datos retrospectivos de estudios clínicos de bioequivalencia, realizados en el tercero autorizado con el cual se estableció la colaboración, se

podieron confirmar hallazgos reportados previamente en la literatura al respecto de variables fisicoquímicas de las moléculas (peso molecular y BCS) y su influencia sobre la variabilidad intra- e intersujeto de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y ABC.

Entre estos hallazgos, se confirma que principios activos con altas variabilidades farmacocinéticas intrasujeto se asocian con metabolismo mayoritario por *CYP3A4*, mientras que existe evidencia de asociación de alta variabilidad intersujeto para los fármacos metabolizados principalmente por *CYP2D6*, como se ha reportado anteriormente en otras etnias (Sugihara *et al.*, 2015). Adicionalmente, se generaron compendios de variabilidades farmacocinéticas a partir de las experiencias clínicas de bioequivalencia en sujetos sanos mexicanos, reportados en los *anexos 9.h* y *9.i*, los cuales podrían servir como referencia para la justificación del tamaño de muestra en protocolos de bioequivalencia a nivel nacional e internacional.

9.h. Compendio de coeficientes de variación intrasujeto (ISV) ponderados de los parámetros farmacocinéticos por principio activo

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|--|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Abacavir | 118 | 22.6 | 24.0 | 6.6 | 8.4 | 6.5 | 8.2 | 24 | |
| Alfuzosin (ER Tablet) | 73 | 24.9 | 42.3 | 24.8 | 42.1 | 24.2 | 40.9 | 28 | Fasting conditions. |
| Alfuzosin (ER Tablet) | 114 | 24.9 | 37.5 | 19.5 | 28.5 | 18.6 | 27.1 | 28 | Fed conditions. |
| Amoxicillin | 152 | 27.7 | 39.7 | 14.0 | 18.6 | 13.9 | 18.4 | 34 | |
| Anastrozole | 47 | 12.6 | 21.7 | 15.8 | 28.7 | 14.5 | 25.9 | 14 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Aripiprazole | 67 | 30 | 54.0 | 13.6 | 21.4 | 22.7 | 39.1 | 38 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Atazanavir (Capsule) | 140 | 73.4 | 119.4 | 66.6 | 107.2 | 58.8 | 93.4 | 80 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} , in fed conditions. |
| Atorvastatin | 107 | 35.8 | 57.5 | 22.1 | 33.3 | 20.3 | 30.1 | 30 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance limits for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Betahistine | 48 | 14.4 | 25.4 | 8.6 | 13.5 | 8.6 | 13.6 | 12 | |
| Bicalutamide ^d | 99 | 19.3 | 29.1 | 19.7 | 29.7 | N/A | N/A | 34 | Parallel study with male subjects and truncated PK sampling till 72 h. |
| Bisoprolol | 46 | 10.8 | 18.1 | 9.3 | 15.2 | 8.8 | 14.2 | 8 | |
| Capecitabine | 74 | 49.4 | 93.4 | 16.7 | 26.5 | 18.8 | 30.4 | 96 | Fasting and fed conditions with cancer patients. |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Carvedilol | 59 | 37.1 | 72.9 | 19.2 | 33.4 | 18.7 | 32.3 | 56 | |
| Cilostazol | 63 | 23.6 | 41.6 | 14.0 | 22.5 | 13.9 | 22.4 | 26 | |
| Cinitapride | 31 | 33.4 | 88.6 | 29.0 | 74.1 | 23.4 | 56.2 | 46 | |
| Ciprofloxacin | 47 | 14.2 | 25.1 | 12.1 | 20.7 | 11.6 | 19.7 | 12 | |
| Citicoline | 50 | 22.4 | 42.6 | 30.3 | 61.3 | 37.4 | 78.9 | 58 | Based on the quantification of the endogenous metabolite uridine with baseline circadian correction. |

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|--------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|---|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Clavulanic acid | 152 | 49.1 | 74.7 | 47.5 | 72.1 | 47.2 | 71.6 | 90 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance limits for C _{max} |
| | | | | | | | | 46 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Darunavir | 66 | 20.0 | 33.7 | 21.5 | 36.8 | 24.7 | 43.3 | 28 | Fasting and fed conditions. |
| Desvenlafaxine (ER Tablet) | 57 | 14.2 | 23.6 | 14.1 | 23.5 | 14.0 | 23.2 | 12 | Based on the quantification of the parent drug desvenlafaxine in fasting/fed conditions. |
| Duloxetine (Capsule) | 73 | 20.8 | 34.3 | 16.7 | 26.7 | 17.2 | 27.4 | 20 | |
| Dutasteride (Capsule) | 146 | 20.6 | 28.7 | 13.9 | 18.6 | 20.7 | 28.9 | 20 | Truncated PK sampling till 72 h, in fasting/fed conditions. |
| Efavirenz | 161 | 24.2 | 33.7 | 14.1 | 18.7 | 17.5 | 23.6 | 26 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Emtricitabine | 63 | 21.3 | 36.9 | 10.5 | 16.0 | 8.9 | 13.3 | 22 | Fed conditions. |
| Erlotinib | 132 | 33.2 | 50.0 | 21.1 | 30.2 | 22.0 | 31.6 | 28 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Escitalopram | 47 | 12.3 | 21.1 | 8.7 | 13.8 | 9.4 | 15.3 | 10 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Etoricoxib | 219 | 20.1 | 26.3 | 13.1 | 16.5 | 12.8 | 16.1 | 20 | |
| Ezetimibe | 439 | 31.9 | 39.3 | 21.0 | 25.3 | 29.4 | 36.2 | 44 | |
| Finasteride | 69 | 17.8 | 29.0 | 14.4 | 22.8 | 14.8 | 23.4 | 16 | |
| Fingolimod ^d (Capsule) | 94 | 19.4 | 29.6 | 19.1 | 29.1 | N/A | N/A | 34 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |
| Fluoxetine (Capsule) | 48 | 14.4 | 25.4 | 10.8 | 17.9 | 10.4 | 17.2 | 12 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Gefitinib | 131 | 39.1 | 60.1 | 25.1 | 36.7 | 25.8 | 37.8 | 64 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| | | | | | | | | 36 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Hydrochlorothiazide | 152 | 19.7 | 27.2 | 14.8 | 19.8 | 13.9 | 18.6 | 18 | |
| Imatinib | 291 | 16.8 | 20.8 | 18.5 | 23.1 | 16.7 | 20.7 | 18 | Fed conditions. |

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|---|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Lamivudine | 316 | 21.5 | 26.8 | 13.3 | 16.1 | 12.9 | 15.5 | 22 | |
| Letrozole | 59 | 20.3 | 35.6 | 12.0 | 19.1 | 12.7 | 20.4 | 20 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Levetiracetam | 42 | 18.2 | 35.6 | 6.3 | 9.7 | 8.8 | 14.7 | 16 | |
| Memantine | 100 | 7.7 | 10.2 | 10.8 | 15.0 | 13.8 | 19.9 | 8 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Modafinil | 38 | 10.1 | 18.0 | 9.5 | 16.5 | 7.7 | 12.9 | 8 | |
| Nevirapine | 51 | 19.0 | 34.6 | 16.6 | 29.5 | 21.5 | 40.3 | 22 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Olanzapine | 71 | 17.7 | 28.6 | 23.8 | 40.4 | 18.7 | 30.6 | 26 | |
| Oxycodone (ER Tablet) | 38 | 23.6 | 51.2 | 12.1 | 22.3 | 12.5 | 23.2 | 26 | Fasting and fed conditions. |
| Pantoprazole (ER Tablet) | 72 | 32.6 | 58.2 | 23.9 | 40.6 | 23.4 | 39.6 | 44 | |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Piracetam | 34 | 18.3 | 39.1 | 5.1 | 7.9 | 5.3 | 8.3 | 16 | |
| Pyridostigmine | 66 | 22.2 | 38.2 | 17.7 | 29.2 | 17.2 | 28.2 | 22 | |
| Pramipexole | 134 | 14.0 | 19.0 | 11.9 | 15.9 | 11.7 | 15.6 | 12 | Fasting conditions. |
| Pregabalin (Capsule) | 50 | 15.8 | 28.0 | 5.1 | 7.2 | 5.7 | 8.2 | 12 | |
| Quetiapine | 70 | 34.9 | 63.5 | 20.5 | 34.2 | 20.2 | 33.5 | 52 | |
| Ramipril | 53 | 26.4 | 50.8 | 16.5 | 28.9 | 16.2 | 28.3 | 30 | Based on the quantification of the parent drug ramipril. |
| Rosuvastatin | 114 | 22.6 | 33.7 | 19.7 | 28.8 | 19.7 | 28.8 | 24 | |
| Sertraline | 35 | 18.0 | 37.9 | 12.6 | 24.4 | 11.4 | 21.4 | 16 | |
| Simvastatin | 235 | 39.1 | 53.4 | 42.0 | 57.7 | 42.2 | 57.9 | 72 | |
| | | | | | | | | 36 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Sulfamethoxazole | 44 | 11.1 | 19.2 | 6.4 | 9.8 | 5.8 | 8.7 | 8 | |
| Tadalafil | 85 | 17.4 | 26.8 | 16.2 | 24.7 | 18.1 | 28.0 | 16 | |
| Tamsulosin (Capsule) | 121 | 19.1 | 27.5 | 18.0 | 25.8 | 20.1 | 29.1 | 20 | Fasting and fed conditions. |

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|--------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|---|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Telmisartan | 140 | 40.4 | 61.5 | 21.5 | 30.5 | 24.1 | 34.6 | 66 | |
| | | | | | | | | 38 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Tenofovir | 66 | 22.8 | 39.5 | 20.8 | 35.4 | 19.0 | 31.8 | 24 | Fasting conditions. |
| Tenofovir | 124 | 22.0 | 32.1 | 14.8 | 20.5 | 13.3 | 18.3 | 22 | Fed conditions. |
| Tolterodine L-tartrate | 96 | 38.0 | 63.2 | 25.5 | 40.1 | 23.8 | 37.1 | 60 | Fed conditions. |
| | | | | | | | | 34 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Trifluoperazine | 54 | 22.6 | 41.9 | 16.3 | 28.4 | 15.5 | 26.7 | 24 | |
| Trimethoprim | 44 | 15.6 | 28.9 | 8.9 | 14.5 | 8.3 | 13.5 | 12 | |
| Valacyclovir | 99 | 32.4 | 52.4 | 14.5 | 21.0 | 14.8 | 21.6 | 44 | Based on the quantification of prodrug valacyclovir. |
| | 72 | 17.6 | 28.3 | 13.3 | 20.5 | 12.7 | 19.4 | 16 | Based on the quantification of the main active metabolite acyclovir. |
| Valsartan | 92 | 41.5 | 70.9 | 35.0 | 58.4 | 33.3 | 55.2 | 70 | |
| | | | | | | | | 52 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 26 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Venlafaxine (ER Capsule) | 65 | 16.5 | 27.1 | 15.3 | 24.8 | 13.5 | 21.4 | 14 | Fasting conditions. |
| Vildagliptin | 72 | 19.6 | 32.2 | 8.2 | 11.7 | 8.1 | 11.6 | 18 | |
| Zidovudine | 222 | 35.8 | 49.0 | 13.7 | 17.3 | 13.5 | 17.0 | 54 | |
| | | | | | | | | 30 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Zolmitriptan (Dispersible Tablet) | 47 | 22.2 | 43.1 | 17.7 | 32.7 | 16.9 | 31.0 | 22 | Female subjects. |

ABEL: Average Bioequivalence with Expanding Limits

df: Degrees of freedom (for the pooled ISV estimation based on two or more bioequivalence study results)

ER: Extended release

N/A: Not Applicable

*Intra-subject PK variability (IaSV) is reported for all drugs unless it is stated that another variability value is reported instead.

^a Pharmaceutical dosage form is tablet unless a different form is indicated in parenthesis.

^b Calculated with the statistical assumptions described in *Methods* section. It is strongly recommended to add to this minimal sample size a sufficient number of additional subjects according to the subjects' elimination and drop-out rate, based on the expected incidence of adverse drug reactions to the drug, and experience of the clinical research center on participant decision to abandon the clinical trial and any other protocol elimination criteria.

^c 2 x 2 crossover design in both male and female healthy volunteers in fasting conditions, unless any other design condition is commented.

^d Intersubject PK variability (IeSV) calculated from a crossover trial, or total variability from a parallel study.

9.i. Compendio de coeficientes de variación intrasujeto (ISV) de los parámetros farmacocinéticos por principio activo, derivados de estudios de bioequivalencia individuales

| Drug (Formulation) ^a | C_{max} ISV (%) | AUC_{0-t} ISV (%) | AUC_{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|---|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---|---|
| Abiraterone | 49.9 | 37.0 | 34.1 | 58 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 30 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Azithromycin | 30.5 | 18.6 | 19.7 | 40 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Bosentan | 46.3 | 29.8 | 28.6 | 48 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Celecoxib (Capsule) | 36.0 | 17.3 | 28.5 | 36 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} , with male subjects. |
| | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Cinacalcet | 38.4 | 30.8 | 28.1 | 42 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} , in fed conditions. |
| | | | | 22 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Cyclosporine (Capsule) | 17.1 | 15.8 | 16.5 | 14 | |
| Deferasirox (Dispersible tablet) | 16.8 | 12.1 | 11.7 | 14 | |
| Donepezil | 16.2 | 17.4 | 14.4 | 16 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Emtricitabine | 14.6 | 20.5 | 20.7 | 20 | Fasting conditions. |
| Entecavir ^d | 22.5 | 20.6 | 28.0 | 68 | Parallel study. |
| Exemestane | 24.4 | 15.0 | 14.5 | 28 | |
| Fexofenadine | 34.1 | 26.3 | 25.8 | 50 | |
| Fingolimod | 6.4 | 11.6 | N/A | 8 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Flunarizine | 25.7 | 18.5 | 18.4 | 30 | |
| Glimepiride | 21.7 | 11.8 | 13.0 | 22 | |
| Ibuprofen (Soft gelatin capsule) | 28.9 | 8.6 | 7.8 | 36 | |
| Irbesartan | 16.9 | 15.1 | 15.6 | 14 | |
| Ivabradine | 20.6 | 12.0 | 10.9 | 20 | Fed conditions. |
| Leflunomide ^d | 21.4 | 22.6 | N/A | 46 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |

| Drug (Formulation) ^a | C _{max} ISV (%) | AUC _{0-t} ISV (%) | AUC _{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|---|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---|
| (Coated tablet) | | | | | |
| Levofloxacin | 19.6 | 4.7 | 5.2 | 18 | |
| Lopinavir | 29.7 | 27.3 | 27.2 | 38 | |
| Lymecycline (Capsule) | 28.2 | 29.0 | 27.9 | 38 | Based on the quantification of the metabolite tetracycline. |
| Metformin | 24.2 | 15.6 | 15.1 | 26 | |
| Methotrexate | 25.6 | 24.7 | 23.6 | 30 | |
| Mirtazapine (Dispersible tablet) | 27.0 | 10.8 | 12.1 | 32 | |
| Montelukast | 31.6 | 27.1 | 26.4 | 44 | |
| Mycophenolate mofetil | 41.6 | 13.6 | 15.2 | 40 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Nitrofurantoin (Capsule) | 18.8 | 19.4 | 19.3 | 18 | |
| Olmesartan | 26.1 | 18.8 | 16.6 | 30 | |
| Ondansetron (Dispersible tablet) | 18.3 | 13.7 | 15.0 | 16 | |
| Paracetamol | 35.9 | 8.4 | 8.5 | 32 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Paroxetine | 28.1 | 31.0 | 31.3 | 42 | |
| Pramipexole | 10.5 | 11.0 | 10.7 | 8 | Fed conditions in male subjects. |
| Prazosin (Capsule) | 26.0 | 10.3 | 9.8 | 30 | |
| Ritonavir | 33.0 | 24.9 | 24.2 | 28 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Solifenacin ^d | 26.9 | 31.1 | N/A | 82 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |
| Tacrolimus (Capsule) | 28.8 | 38.2 | 37.5 | 60 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Tolterodine | 29.6 | 26.5 | 23.8 | 38 | Fasting conditions. |

| Drug (Formulation) ^a | C _{max} ISV (%) | AUC _{0-t} ISV (%) | AUC _{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|--|
| Valproate (ER tablet) | 19.6 | 26.4 | 25.7 | 32 | |
| Vardenafil | 29.0 | 20.7 | 19.8 | 38 | |
| Venlafaxine (ER capsule) | 21.4 | 13.2 | 12.9 | 22 | Based on the quantification of the parent drug, in fed conditions. |
| | 8.9 | 9.3 | 11.6 | 8 | Based on the quantification of the metabolite <i>O</i> -desmethyl venlafaxine. |

ABEL: Average Bioequivalence with Expanding Limits

ER: Extended release

N/A: Not Applicable

*Intra-subject PK variability (IaSV) is reported for all drugs unless it is stated that another variability value is reported instead.

^a Pharmaceutical dosage form is tablet unless a different form is indicated in parenthesis.

^b Calculated with the statistical assumptions described in the *Methods* section. It is strongly recommended to add to this minimal sample size a sufficient number of additional subjects according to the subjects' elimination and drop-out rate, based on the expected incidence of adverse drug reactions to the drug, and experience of the clinical research center on participant decision to abandon the clinical trial and any other protocol elimination criteria.

^c 2 x 2 crossover design in both male and female healthy volunteers in fasting conditions, unless any other design condition is commented.

^d Intersubject PK variability (IeSV) calculated from a crossover trial, or total variability from a parallel study.

9.j. Presentación en congreso PGRN Hub (2018)

Pharmacogenomics Research Network (PGRN Hub) en el marco del simposio anual de la Asociación Americana del Genoma Humano (ASHG). Octubre, 2018. San Diego, EUA.



Pharmacogenetics and comparative bioavailability study in Mexican population applied to pharmacokinetic variables assessment



Díaz-Tufinio Carlos^{1,2,3}, Palma-Aguirre José Antonio², González-Covarrubias Vanessa³

¹ Experimental Clinical Research PhD, National Autonomous University of Mexico (UNAM), Mexico City. ² Axis Clinicals Latina, Mexico. ³ Pharmacogenomics Lab, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN), Mexico.

Contact author information: cdiaztuf@gmail.com

Introduction

Massive analysis of genetic variants now-a-days is allowing researchers and healthcare professionals to take the promise of personalized pharmacological therapy and genomic medicine from the bench to the bedside. Up to date, several examples of drugs can be cited, for which a dose adjustment, hypersensitivity prediction and/or therapy substitution decision is based on individual genetic variants of patients, most of them extensively confirmed with clinical evidence. On the same track, the objective of the present work is to quantify the biological variability given by genetic factors to apply them in bioequivalence and comparative bioavailability studies for generic product testing, ultimately to control within-subject and between-subject variabilities. Moreover, the aim of this project is to establish a proof-of-concept that the genetic variation in healthy volunteers in this type of studies is relevant and possibly to extrapolate this knowledge to the pharmacological practice in real patients in a near future. Through a bioequivalence study performed after Fluoxetine Hydrochloride administration in healthy volunteers (as required by Mexican and international regulations, following Good Clinical Practices and ICH guidelines), with additional genotyping of the participant volunteers, the fact that the genetic variation in healthy volunteers in this type of studies is relevant was tested and confirmed.

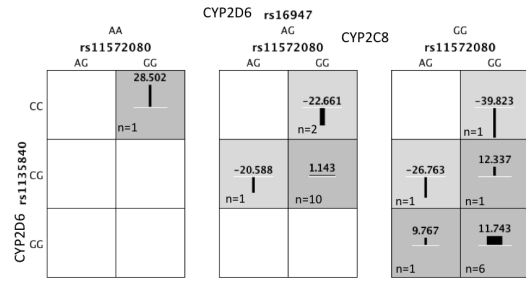
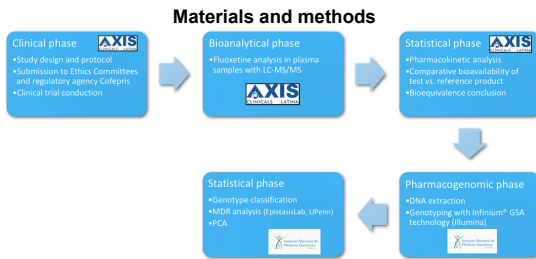


Figure 2. Multifactor dimensionality reduction (MDR, Epistasis Lab, UPenn) analysis based on the pharmacokinetic clearance (Cl) as the response variable, in order to confirm the relevant CYPs for Fluoxetine pharmacokinetics for a preliminary pharmacogenetic analysis.

related with Fluoxetine metabolism (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 & CYP3A5). More than 60 different genotypes were interesting after this selection (data not shown), and the volunteers' pharmacokinetic phenotypes were associated and studied (Fig. 2). After the statistical tests, subjects could be classified according to its metabolic profile for Fluoxetine and this classification was confirmed with the genetic information obtained, demonstrating the usefulness of the genetic profiling for bioequivalence studies when subjects' genetic idiosyncrasy could be relevant or wanted to be explored for controlling intra- and inter-subject variability (Table 1), among other clinical relevant characteristics in bioequivalence trials.



Results and discussion

Following to the calculation of the pharmacokinetic variables of test and reference products in 24 volunteers using Phoenix[®] WinNonlin[®] v8 (Fig. 1), the genetic variants were explored, analyzed and statistically correlated to other clinical and pharmacological information, mainly the calculated primary pharmacokinetics and elimination-phase variables. Genotyping was executed using the Infinium[®] Global Screening Array-24 v1.0 technology (Illumina[®]), customized to explore specifically variants related to clinical, toxicity and pharmacokinetic annotation. Out of the more than 600,000 variants reported, the exploratory analysis spotlight was on the metabolizing enzymes variants (mainly the group of CYP450 family), especially those known to be

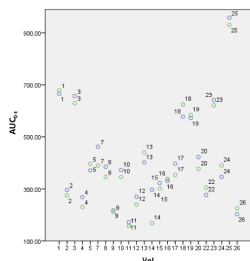


Figure 1. Pharmacokinetic variables for bioequivalence conclusion were calculated and volunteers were clustered based on its values, being AUC the clearest one for the clustering according to the metabolizing phenotype of each volunteer.

Table 1. Intra- and inter-subject variabilities of the three main pharmacokinetic parameters for bioequivalence conclusion, comparing the effect of the selection of subjects according to the genotype.

| a) Bioequivalence original results (n=24) | | | | |
|--|---------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| PK Parameter | T/R ratio (%) | Confidence interval (90%) | Intra-subject variability (%) | Inter-subject variability (%) |
| C _{max} | 103.10 | 96.05 - 110.67 | 14.4% | 29.27% |
| AUC _{0-∞} | 104.94 | 99.87 - 110.28 | 10.0% | 44.97% |
| AUC _{0-t} | 103.45 | 100.23 - 106.77 | 6.4% | 57.12% |
| b) Bioequivalence results without the identified poor metabolizer (n=23) | | | | |
| PK Parameter | T/R ratio (%) | Confidence interval (90%) | Intra-subject variability (%) | Inter-subject variability (%) |
| C _{max} | 103.28 | 95.89 - 111.23 | 14.7% | 28.37% |
| AUC _{0-∞} | 104.93 | 99.61 - 110.53 | 10.3% | 40.75% |
| AUC _{0-t} | 103.61 | 100.24 - 107.09 | 6.5% | 43.46% |

Conclusions

Future perspectives on this work are to continue exploring the relationship between phenotype and genotype in a genomic level with the information retrieved in this controlled trial, to be able to relate more variants and polymorphisms blindly with the pharmacokinetic phenotypes of the volunteers participating in this study. Based on this, a more relevant and refined statistical model is expected to be obtained integrating more genetic variables. With this, the purpose of establishing the technical and scientific basis for bioequivalence studies being safer and more controlled for Mexican and abroad regulations can be accomplished. Likewise, these type of pharmacogenetic experiences in controlled clinical trials can be a key asset for bedside pharmacological practices, specially in the field of psychiatric drugs and its effectiveness.

9.k. Artículo “Pharmacogenetic variants associated with fluoxetine pharmacokinetics from a bioequivalence study in healthy subjects” publicado en el *Journal of Personalized Medicine* (2023)

Article

Pharmacogenetic Variants Associated with Fluoxetine Pharmacokinetics from a Bioequivalence Study in Healthy Subjects

Carlos Alejandro Díaz-Tufinio ^{1,2}, José Antonio Palma-Aguirre ² and Vanessa Gonzalez-Covarrubias ^{3,*}

¹ Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Mexico City 14380, Mexico; cdiaztuf@gmail.com

² Axis Clinicals Latina, Mexico City 07870, Mexico; palma.a@axisclinical.com

³ Laboratorio de Farmacogenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City 14610, Mexico

* Correspondence: vgonzalez@inmegen.gob.mx

Abstract: Fluoxetine is one of the most prescribed antidepressants, yet it still faces challenges due to high intersubject variability in patient response. Mainly metabolized by the highly polymorphic gene *CYP2D6*, important differences in plasma concentrations after the same doses are found among individuals. This study investigated the association of fluoxetine pharmacokinetics (PK) with pharmacogenetic variants. A bioequivalence crossover trial (two sequences, two periods) was conducted with fluoxetine 20 mg capsules, in 24 healthy subjects. Blood samples for fluoxetine determination were collected up to 72 h post-dose. Subjects were genotyped and single nucleotide variants (SNV) were selected using a candidate gene approach, and then associated with the PK parameters. Bioequivalence was confirmed for the test formulation. We found 34 SNV on 10 genes with a quantifiable impact on the PK of fluoxetine in the randomized controlled trial. Out of those, 29 SNVs belong to 7 CYPs (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*), and 5 SNVs to 3 genes impacting the pharmacodynamics and efficacy of fluoxetine (*SLC6A4*, *TPH1*, *ABCB1*). Moreover, decreased/no function SNVs of *CYP2D6* (rs1065852, rs28371703, rs1135840) and *CYP2C19* (rs12769205) were confirmed phenotypically. Our research contributes to deepening the catalog of genotype-phenotype associations in pharmacokinetics, aiming to increase pharmacogenomics knowledge for rational treatment schemes of antidepressants.

Keywords: fluoxetine; pharmacokinetics; metabolism; genotyping; bioequivalence



Citation: Díaz-Tufinio, C.A.; Palma-Aguirre, J.A.; Gonzalez-Covarrubias, V. Pharmacogenetic Variants Associated with Fluoxetine Pharmacokinetics from a Bioequivalence Study in Healthy Subjects. *J. Pers. Med.* **2023**, *13*, 1352. <https://doi.org/10.3390/jpm13091352>

Academic Editor: Su-Jun Lee

Received: 26 July 2023

Revised: 17 August 2023

Accepted: 19 August 2023

Published: 1 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Depression is a common mental disorder, with 5.0% of adults affected worldwide and 5.7% among the elderly [1]. “Depression” references in scientific documents have increased exponentially since 1950, and documents mentioning “selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)” have increased at a rate of approximately 41 per year in the past 40 years [2], being the most common therapeutic class for its treatment in early ages [3].

Fluoxetine is one of the SSRI-class antidepressants, with oral formulations ranging from 20 mg to 90 mg. Its metabolism is mainly performed in the liver by the highly polymorphic *CYP2D6*. The contribution from other CYPs, such as *CYP2C19*, *CYP2C9*, and *CYP3A4*, is relevant in subjects with chronic exposure to fluoxetine since the drug inhibits its metabolism [4]. The pharmacogenomics of antidepressants is of interest given 48% therapeutic failures, 40% remission rate, and 25% frequency of adverse events [3,5]. Understanding the pharmacokinetic and pharmacodynamic genes’ contribution to SSRI function is currently an active research area, with above 900 studies reported [3]. Some of these studies have found solid clinical evidence, enough to generate regulatory guidance

for pharmacogenomic testing for treatment selection and dose adjustments, such as those of the Food and Drugs Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA).

International pharmacogenomics groups, such as the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC), have developed recommendations and calculator tools to predict the phenotype of actionable genes for CYP2D6 and CYP2C19, main cytochromes on the metabolism of antidepressants [6,7]. These tools, together with clinical evidence, allow clinicians to improve the therapeutics of antidepressants. Nevertheless, details and validation across different populations are advisable to strengthen the clinical evidence.

Bioequivalence trials can ensure quality to speed up the registration of generic medications by several regulatory agencies across the world, such as the FDA, EMA, and the Mexican regulatory agency, COFEPRIS [8]. In these studies, pharmacokinetic (PK) profiles are evaluated between test and reference formulations to compare their bioavailability, i.e., to test whether the geometric ratios of the PK parameters are—unless otherwise stated—inside an 80–125% confidence interval. Since two-sequence two-period two-formulation crossover trials are the most convenient designs for bioequivalence evaluation, intrasubject (within-subject) variability is required to estimate a sufficient sample size for assessing the confidence intervals with targeted error and statistical power.

In the world, there are 394 protocols reported in clinicaltrials.gov with the active principle fluoxetine, ranging from phase 1 to 4, 12 of them PK or bioequivalence studies [9]. In the Mexican National Registry of Clinical Trials (RNEC), there are 15 protocols registered with this drug [10]. Of those, 13 are bioequivalence/comparative bioavailability studies, the 20 mg capsule formulation being the most frequently studied. These studies, overall, had a crossover two-sequence two-period design, with a sample size ranging from 24 to 36 subjects.

In this work, we report a clinical trial with fluoxetine 20 mg capsules performed in 24 healthy Mexican volunteers, where the pharmacokinetics was evaluated in a crossover randomized study, exploring relationships with the genotype of the participants. We aimed to test bioequivalence between two fluoxetine formulations, and to associate the genotype of participant subjects with the metabolizing phenotypes (pharmacokinetics) of fluoxetine, quantifying the potential impact of selected CYPs in the metabolism of fluoxetine. So, the bioequivalence evaluation was independent from the pharmacogenetic analyses performed for exploratory purposes.

2. Methods

2.1. Bioequivalence Clinical Trial

The clinical trial was a randomized controlled, open-label, crossover 2×2 (two-sequences, two-periods) design, with a single administration per period in fasting conditions in healthy subjects. Products administered were fluoxetine hydrochloride 20 mg capsules, Apotex, Inc. Toronto, ON, Canada (test product), and Prozac[®] 20, Eli Lilly and Company (reference product). Blood sampling was performed up to 72 h after drug administration, with an 8-week washout between periods.

The sample size for the bioequivalence trial was based on an expected intrasubject variation of 18% for fluoxetine PK parameters [11], α of 0.05, and a power of 90% (β of 0.10), with 80–125% acceptance limits for the 90% confidence intervals, evaluated with Schuirmann's two one-sided *t*-tests (TOST), in compliance with standard bioequivalence analysis methodology and national regulation [8,12]. This calculation resulted in a minimum sample size of 22 + 4 subjects due to potential dropouts.

Inclusion criteria were age from 18 to 55 years, body mass index (BMI) between 18 and 27 kg/m², and clinical examination and laboratory data within normal ranges. Exclusion criteria were pregnancy or lactation; history of alcoholism, drug abuse, or heavy smoking; documented hypersensitivity to the study drug or to any drug in the same therapeutic group; receiving any medication within less than 14 days (or 7 half-lives) of the study starting date; subjects who had donated blood or had more than 450 mL of blood withdrawn 60 days before the study starting; history or evidence of medical conditions including, but not limited to, gastrointestinal, renal, hepatic, cardiovascular, and endocrine

diseases; and consumption of grapefruit juice and/or xanthine-containing beverages, such as coffee, tea, chocolate, cola soft drinks, etc., 10 h before the study start-up.

The study was conducted in a bioequivalence laboratory facility in Mexico City, Axis Clinicals Latina, authorized as a clinical and bioanalytical unit for bioavailability and bioequivalence studies according to national requirements [8]. The clinical trial protocol was reviewed by an institutional review board (IRB) authorized by COFEPRIS and the National Commission of Bioethics (CONBIOETICA); then the protocol was submitted to the federal agency COFEPRIS for its approval.

All participant volunteers met the inclusion criteria and signed written informed consent. The study was conducted under NOM-177-SSA1-2013 [8], Good Clinical Practices (GCPs) [13], International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guidelines [14], and followed the statutes of the Declaration of Helsinki and its amendments [15].

2.2. Plasma Fluoxetine Determination

The blood samples were collected in sodium heparin tubes at 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 12.0, 24.0, 48.0, and 72.0 h post-dose. Once collected, samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min between 2 and 15 °C to separate plasma. Plasma was pipetted into labeled cryogenic tubes for fluoxetine determination. Liquid–liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass/mass spectrometry (LC-MS/MS) with reverse phase column (Gemini, C18, 50 × 4.6 mm, 5 µm) was performed for fluoxetine quantification. Chromatographic conditions were 3 min run at 35 °C, with acetonitrile/ammonium formate 2 mM pH 3.5 (90:10 *v/v*) mobile phase, in turbo-electro spray ionization (ESI⁺) positive mode with multiple reaction monitoring (MRM), using paroxetine as internal standard.

2.3. Genetic and Pharmacogenomic Analyses

These analyses were funded and performed at the National Institute for Genomic Medicine (INMEGEN), with microarrays purchased from Código 46. The white blood cells' buffy coat was pooled into a cryotube for DNA extraction for each subject, using Puregene blood kit (QIAGEN®), from 3 to 4 blood samples collected for PK to avoid low concentration of genetic material or poor quality. Quantity and quality were verified with spectrophotometry and agarose gel electrophoresis. Genotyping was performed using the Infinium® Global Screening Array (GSA) 24 v1.0 microarray, including 600,000 variants with more than 22,000 customized clinically relevant genetic variants related to drug response [16].

2.4. Pharmacokinetics and Statistical Analysis

After fluoxetine determination, the formulation administered in each period for each subject was decoded according to the study randomization. Blood sampling actual times were calculated based on time deviations reported to the planned nominal sampling times. Observed plasma profiles vs. actual times were plotted and their PK parameters were calculated using non-compartmental analysis (NCA) in Phoenix® WinNonlin® version 8.1 [17]. PK parameters included maximum drug concentration (C_{max}), time to C_{max} (t_{max}), area under the curve from pre-dose to last sampling time (AUC_{0-t}), AUC from pre-dose extrapolated to infinite ($AUC_{0-\infty}$), elimination parameters such as elimination constant (K_{el}), half-life time ($t_{1/2}$), and apparent distribution volume (V_d).

Statistical analysis for bioequivalence assessment was performed using Schuirmann's two one-sided *t*-test (TOST) for test/reference geometric means ratios of C_{max} and AUC, applying the conventional acceptance criteria of 80–125% [12]. Its 90% confidence intervals were calculated following NOM-177-SSA1-2013 regulation. Outlier analysis was performed to identify subjects with extreme values, based on the studentized intrasubject residuals using bear package, BE/BA for R [18]. Analysis of variance (ANOVA) with a general linear

model (GLM) for bioequivalence crossover studies was performed [12] to evaluate period, sequence, and formulation effects.

2.5. Genotyping and Genotype-Phenotype Association

The pharmacogenetic analyses were performed for scientific research purposes, since bioequivalence was assessed for all the subjects who completed the clinical study, as described in the previous section in accordance with the national regulation [8]. Analysis of the genomic data was carried out with Illumina® GenomeStudio 2.0 software, performing quality control, normalization, and allelic discrimination of the variants of the 24 volunteers who concluded the bioequivalence study. Individual fluoxetine PK parameters were used as phenotypic variables. Multivariate association models were generated from data in plain text files with genetic information (.map and .ped), demographic variables (gender, age, weight, height, and BMI), and PK data (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, t_{max} , $t_{1/2}$), using gPLINK vs2.050. Supporting analyses were performed with IBM SPSS® 25 [19] and Phoenix® WinNonlin® v.8.1, for the identification of the relevant genetic variants and their association with fluoxetine PK [20,21].

3. Results

3.1. Bioequivalence Clinical Trial

Twenty-six healthy Mexican subjects were recruited, assessed as healthy by physical examination and blood test, and started the study. All enrolled volunteers were tested for abuse drugs and alcohol consumption before being checked into each of the study periods. Twenty-four of them completed the study because two subjects (ID numbers 6 and 21) dropped out due to personal decisions and withdrew their informed consent (Figure 1). Demographic characteristics of the 24 subjects, 20 males and 4 females, were 33.0 ± 11.1 years old (mean \pm SD), ranging from 19 to 50 years. Height was 1.65 ± 0.09 m, weight 64.8 ± 9.1 kg, and BMI 23.8 ± 2.1 kg/m². Between genders, there was no difference in age ($p = 0.855$) and BMI ($p = 0.157$), although differences in weight and height were found ($p < 0.000$). Among these four demographic variables (age, BMI, height, and weight), we found significant correlations between age and BMI, age and weight, BMI and weight, and height and weight ($p < 0.05$).

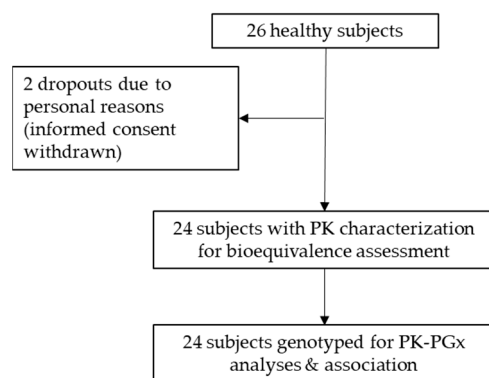


Figure 1. Study flow diagram.

A total of six adverse events in five subjects were reported, from which five events occurred under reference product dosing and one with the test product dosing. All adverse events were assessed as mild or moderate in severity. Four were classified as probably related to the drug due to occurrence around fluoxetine t_{max} (dizziness, headache, sore throat, and pharyngitis). The other two adverse events were not related to the study drug (lumbar pain at the discharge of period 1 and headache at period 2 check-in).

3.2. Plasma Fluoxetine Determination

The bioanalytical methodology for fluoxetine quantification was validated under the national regulatory agency criteria applicable to bioequivalence trials [8]. Validation param-

eters included accuracy, repeatability, reproducibility, robustness, selectivity, recovery, and stability, analyzed for both analyte (fluoxetine) and internal standard (paroxetine). The calibration curve of fluoxetine had a concentration range of 0.200–49.169 ng/mL ($r = 0.99984$), with low, medium, and high control samples at 0.598, 20.467, and 37.513 ng/mL. The coefficients of variation of the validation parameters were calculated within the acceptable regulatory values, all below 15%. The selectivity of the method was evaluated with common drugs, such as salicylic acid, metamizole, ketorolac, paracetamol, and ondansetron, demonstrating no interference with the analyte of interest.

3.3. Pharmacokinetic Parameters and Bioequivalence Testing

The average pharmacokinetic profile for each product is shown in Figure 2. In the PK analysis of fluoxetine (Table 1), comparing test and reference products, the mean t_{max} was 4.42 h and 4.25 h ($p = 0.75$), while mean C_{max} was 16.25 ng/mL and 15.92 ng/mL ($p = 0.63$). Half-life $t_{1/2}$ was 30.71 h and 31.32 h ($p = 0.42$). The averages of AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ were not statistically different ($p = 0.64$, $p = 0.56$), nor were Vd and Cl elimination parameters ($p = 0.26$, $p = 0.34$).

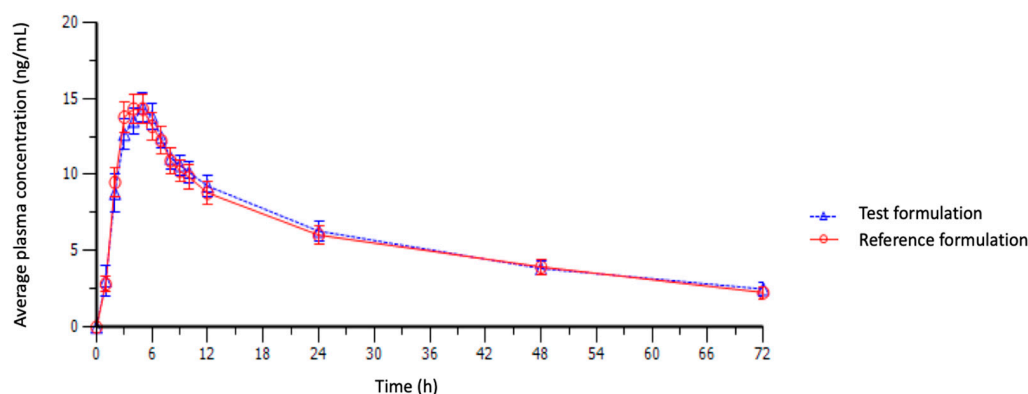


Figure 2. Mean plasma concentration–time curve of fluoxetine after an oral dose of 20 mg ($n = 24$).

Table 1. Fluoxetine pharmacokinetics (PK) parameters.

| | Test Product | | | | | Reference Product | | | | |
|----------------------------------|--------------|-------------|------------------|-----------|-----------|-------------------|-------------|------------------|-----------|-----------|
| | C_{max} | AUC_{0-t} | $AUC_{0-\infty}$ | t_{max} | $t_{1/2}$ | C_{max} | AUC_{0-t} | $AUC_{0-\infty}$ | t_{max} | $t_{1/2}$ |
| Mean | 16.25 | 411.64 | 556.06 | 4.42 | 30.71 | 15.92 | 398.19 | 542.43 | 4.25 | 31.32 |
| Geometric mean | 15.59 | 377.86 | 473.26 | 4.25 | 28.90 | 15.12 | 360.06 | 457.47 | 4.07 | 29.02 |
| Standard deviation (S.D.) | 5.02 | 184.05 | 429.46 | 1.18 | 13.78 | 4.89 | 189.55 | 436.65 | 1.19 | 17.21 |
| Standard error of the mean (SEM) | 1.02 | 37.57 | 87.66 | 0.24 | 2.81 | 1.00 | 38.69 | 89.13 | 0.24 | 3.51 |
| Minimum | 8.92 | 171.86 | 200.73 | 2.00 | 15.42 | 7.42 | 157.33 | 171.14 | 2.00 | 19.24 |
| Median | 15.31 | 371.42 | 452.21 | 5.00 | 27.04 | 16.10 | 349.68 | 442.86 | 4.50 | 27.60 |
| Maximum | 32.05 | 957.96 | 2351.79 | 6.00 | 88.86 | 23.71 | 930.62 | 2383.39 | 6.00 | 106.88 |
| Coefficient of variation (%) | 30.90 | 44.70 | 77.20 | 26.60 | 44.90 | 30.70 | 47.60 | 80.50 | 28.00 | 55.00 |

Units: C_{max} [ng/mL], AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ [h*ng/mL], t_{max} and $t_{1/2}$ [h].

Bioequivalence statistical assessment was performed with the PK data of the 24 volunteers who completed the study (Table 2), confirming bioequivalence between test and reference products, since the 90% confidence intervals of the PK parameters (C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$) were within the 80–125% limits. No statistically significant effects of sequence ($p > 0.42$), period ($p > 0.12$), and formulation ($p > 0.08$) were found in the ANOVA.

Table 2. Fluoxetine bioequivalence assessment ($n = 24$).

| Parameter | Geometric Mean | | T/R Ratio (%) | 90% Confidence Interval | Intrasubject Variability (%) | Intersubject Variability (%) | Power (%) |
|------------------|------------------|-----------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------|
| | Test (T) Product | Reference (R) Product | | | | | |
| C_{max} | 15.59 | 15.12 | 103.10 | 96.05–110.67 | 14.4% | 29.27% | 100.0% |
| AUC_{0-t} | 377.85 | 360.05 | 104.94 | 99.87–110.28 | 10.0% | 44.97% | 100.0% |
| $AUC_{0-\infty}$ | 473.25 | 457.47 | 103.45 | 100.23–106.77 | 6.4% | 57.12% | 100.0% |

Four subjects (IDs 7, 11, 14, and 24) were identified to have extreme values in the PK parameters, based on ± 2 studentized intrasubject (within-subject) residual criteria. Regarding intersubject (between-subject) variability, four volunteers had C_{max} values close to or above ± 2 S.D. (IDs 4, 9, 11, and 23), as well as two subjects in the AUC parameters (subjects 11 and 25) (Figure 3). Phenotypically, 33% of the 24 subjects who concluded the bioequivalence study (IDs 4, 7, 9, 11, 14, 23, 24 and 25) were of interest given their high intra- and/or intersubject variability on fluoxetine PK parameters.

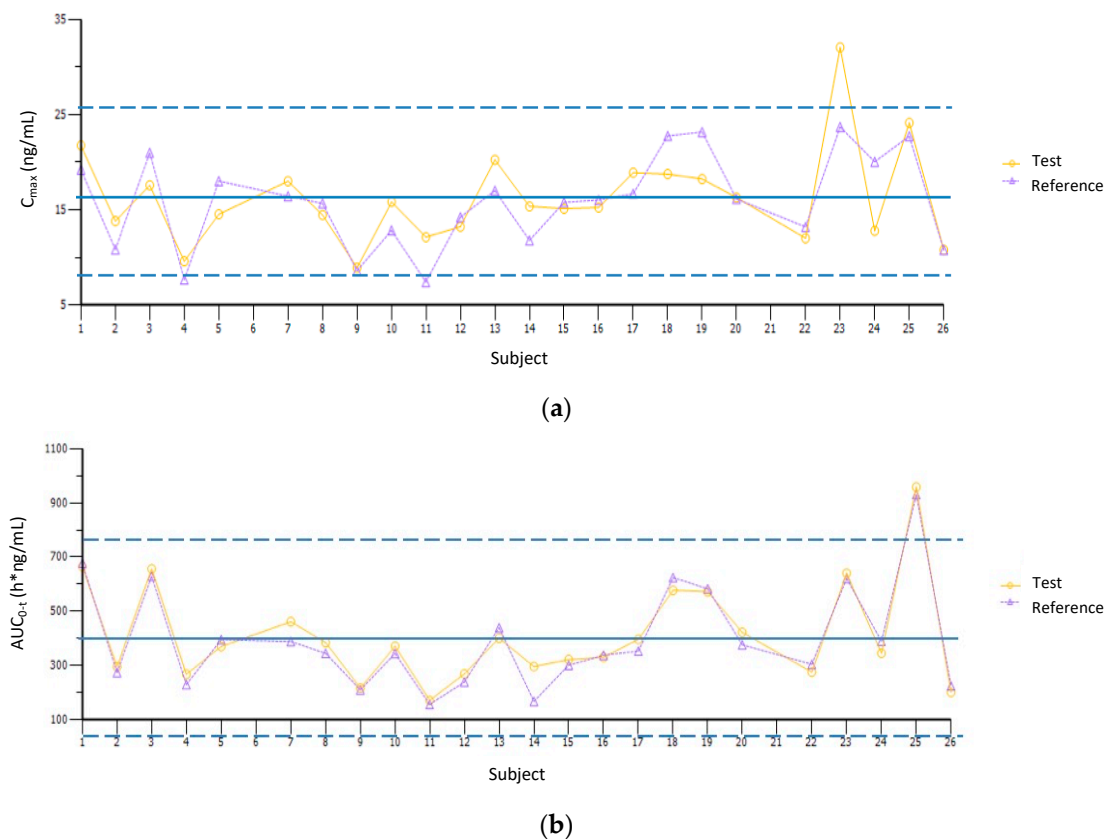


Figure 3. Individual fluoxetine PK parameters: (a) C_{max} and (b) AUC_{0-t} . The solid blue line indicates the overall mean for each parameter, while the dashed lines represent ± 2 S.D.

Mean PK profiles were different between male and female subjects, the PK parameters C_{max} ($p < 0.000$), AUC_{0-t} ($p < 0.002$), V_d ($p < 0.001$), and Cl ($p < 0.006$) being statistically different between genders. It is important to notice that the female population is under-represented in this study due to recruitment, so gender differences should be taken as rough evidence. After analyzing the PK parameters (C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, t_{max} , and $t_{1/2}$) with demographic variables, significant correlations ($p < 0.05$) were found between age and C_{max} , weight and C_{max} , weight and AUC_{0-t} , height and C_{max} , and height and AUC_{0-t} . No statistically significant correlation ($p > 0.146$) was obtained for BMI vs. any of the PK parameters. Correlation coefficients for all explored variables are shown in Table 3. Variables with the strongest correlation, C_{max} vs. weight, are plotted in Figure 4, showing a negative trend for both genders and overall.

Table 3. Demographic and PK variables correlation matrix.

| | | BMI | Age | Weight | Height | C _{max} | AUC _{0-t} | AUC _{0-∞} | t _{max} | t _{1/2} |
|--------------------------|---------------------|-----|---------|----------|----------|------------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------|
| BMI | Pearson Correlation | 1 | 0.481 * | 0.665 ** | 0.023 | -0.213 | -0.179 | -0.020 | 0.103 | 0.133 |
| | <i>p</i> | | 0.017 | 0.000 | 0.913 | 0.146 | 0.223 | 0.891 | 0.484 | 0.368 |
| Age | Pearson Correlation | | 1 | 0.323 * | -0.014 | -0.344 * | -0.250 | -0.209 | 0.252 | 0.015 |
| | <i>p</i> | | | 0.123 | 0.950 | 0.017 | 0.087 | 0.153 | 0.084 | 0.921 |
| Weight | Pearson Correlation | | | 1 | 0.758 ** | -0.496 ** | -0.359 * | -0.113 | 0.003 | 0.129 |
| | <i>p</i> | | | | 0.000 | 0.000 | 0.012 | 0.446 | 0.981 | 0.380 |
| Height | Pearson Correlation | | | | 1 | -0.483 ** | -0.340 * | -0.141 | -0.078 | 0.056 |
| | <i>p</i> | | | | | 0.001 | 0.018 | 0.339 | 0.598 | 0.705 |
| C_{max} | Pearson Correlation | | | | | 1 | 0.825 ** | 0.609 ** | -0.158 | 0.301 * |
| | <i>p</i> | | | | | | 0.000 | 0.000 | 0.285 | 0.037 |
| AUC_{0-t} | Pearson Correlation | | | | | | 1 | 0.895 ** | 0.069 | 0.676 ** |
| | <i>p</i> | | | | | | | 0.000 | 0.640 | 0.000 |
| AUC_{0-∞} | Pearson Correlation | | | | | | | 1 | 0.086 | 0.902 ** |
| | <i>p</i> | | | | | | | | 0.559 | 0.000 |
| t_{max} | Pearson Correlation | | | | | | | | 1 | 0.158 |
| | <i>p</i> | | | | | | | | | 0.282 |
| t_{1/2} | Pearson Correlation | | | | | | | | | 1 |
| | <i>p</i> | | | | | | | | | |

* Correlation significance < 0.05 (two-tailed). ** Correlation significance < 0.01 (two-tailed).

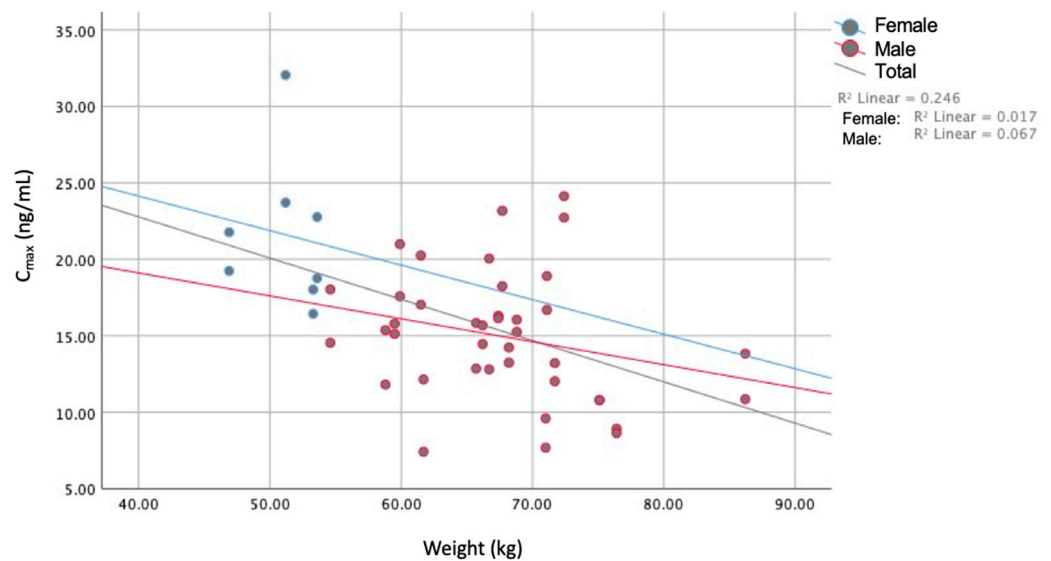


Figure 4. Weight vs. C_{max}, stratified by gender and overall.

3.4. Pharmacogenomic Analyses

The 24 subjects that completed the study were genotyped. All studied single nucleotide variants (SNV) had a call rate > 0.99 and p10GC (gene call 10th percentile) > 0.30. Using a candidate gene approach [22], we selected SNVs of enzymes implicated in drug metabolism, especially those known to be involved in the metabolism of fluoxetine. A total of 423 potential variants of eight initial cytochromes of interest were investigated in PharmGKB (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, and *CYP3A5*). From those, we found 169 coincidences in the customized microarray using a script developed in R and these were manually revised for duplicate removal. In total, 39 variants of 8 CYPs were studied: 5 for *CYP1A2*, 9 for *CYP2B6*, 1 for *CYP2C8*, 5 for *CYP2C9*, 6 for *CYP2C19*, 7 for *CYP2D6*, 5 for *CYP3A4*, and 1 for *CYP3A5*. Additionally, 15 pharmacodynamic and antidepressant response variants were explored in 4 genes: 3 for *ABCB1*, 3 for *SLC6A4*, 2 for *TPH1*, and 7 for *COMT*. Table 4 summarizes the genes and SNVs with clinical annotations and evidence levels available in the current literature [23,24].

Table 4. Genes and single nucleotide variants (SNVs) in the study with available annotations [23,24].

| Gene | SNV | Associated Haplotype | Genetic Variation | Annotated Variants | Clinical Annotations | Evidence Level (CPIC) | Classification | Related Drug | Function |
|---------|------------|----------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-----------------------|----------------|------------------|---------------|
| CYP1A2 | rs2069514 | * 1C | 3860G>A | 17 | 2 | 3 | N/A | Antipsychotic | Efficacy |
| CYP1A2 | rs2069526 | * 1K | 739T>G | 7 | 1 | 3 | Intronic | Escitalopram | Toxicity |
| CYP2B6 | rs4802101 | | 750T>C | 3 | 1 | 3 | 5' end | Cyclophosphamide | Toxicity |
| CYP2C19 | rs11188072 | | | 8 | 2 | 3 | N/A | Escitalopram | Dose |
| CYP2C8 | rs11572080 | * 3 | | 58 | 14 | 3 | Missense | Rosiglitazone | |
| CYP2C9 | rs28371686 | * 5 | 42619C>G | 23 | 5 | 1A | Missense | Phenytoin | Metabolism |
| CYP2D6 | rs1080985 | * 2A | 1496C>G | 3 | 2 | 3 | 3' end | Thioridazine | Efficacy |
| CYP2D6 | rs1135840 | * 4, * 10 | 4180G>C | 828 | 82 | 3 | Missense | Fluoxetine | |
| CYP2D6 | rs16947 | * 21 | 2851C>T | 643 | 77 | 3 | Missense | Fluoxetine | |
| CYP2D6 | rs72549358 | * 28 | | 2 | 1 | 4 | Intronic | Tamoxifen | |
| CYP3A4 | rs2687116 | | C>A | 2 | 0 | N/A | Intronic | -- | |
| ABCB1 | rs1045642 | | G>A | 580 | 100 | 3 | Missense | SSRI | Efficacy |
| ABCB1 | rs1128503 | | 1236T>C | 216 | 38 | 3 | Syno-nym | Methadone | Metabolism/PK |
| ABCB1 | rs2032582 | | 2677T>G/A | 315 | 49 | 3 | Missense | Fluoxetine | Efficacy |
| SLC6A4 | rs1042173 | | A>C | 2 | 2 | 3 | 3' UTR | Ondansetron | Efficacy |
| SLC6A4 | rs2066713 | | G>A | 1 | 1 | 3 | Intronic | Ethanol | Toxicity |
| SLC6A4 | rs25532 | | | 12 | 3 | | N/A | | |
| TPH1 | rs1799913 | | G>T | 1 | 0 | N/A | Intronic | Lithium | Efficacy |

Based on the sample of Mexican subjects participating in this trial, the minor allele frequencies (MAF) were similar to data reported for different populations in most of the SNVs studied. Excluding the SNV with MAF = 0% in our study, the following SNVs showed a difference greater than 10% with respect to the calculated populations' mean (Table 5): *ABCB1* rs2032582: 43% higher; *CYP1A2* rs2069514: 20% higher, similar to Latino/admixed American (AMR) frequency; *CYP2B6* rs4802101: 16% lower; *CYP2D6* rs108098: 13% higher, similar to AMR frequency.

Table 5. Minor allele frequencies (MAF) of analyzed genes from all available (ALL), African American (AFR), East Asian (EAS), South Asian (SAS), European (EUR), Latino/admixed American (AMR) populations, from ALFA dbSNP, and the sample in this study (MXN) [25–27].

| Gene | rs | Allele | ALL | AFR | EAS | SAS | EUR | AMR | MXN |
|----------------|------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>CYP1A2</i> | rs2069526 | G | 0.071 | 0.123 | 0.084 | 0.069 | 0.024 | 0.025 | 0.063 |
| <i>CYP1A2</i> | rs2069514 | A | 0.209 | 0.313 | 0.281 | 0.080 | 0.020 | 0.362 | 0.413 |
| <i>CYP2B6</i> | rs4802101 | T | 0.246 | 0.057 | 0.340 | 0.252 | 0.414 | 0.221 | 0.083 |
| <i>CYP2C19</i> | rs11188072 | T | 0.156 | 0.246 | 0.015 | 0.136 | 0.224 | 0.120 | 0.083 |
| <i>CYP2C8</i> | rs11572080 | T | 0.046 | 0.008 | 0.001 | 0.030 | 0.118 | 0.091 | 0.065 |
| <i>CYP2C9</i> | rs28371686 | G | 0.005 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.021 |
| <i>CYP2D6</i> | rs72549358 | T | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.005 | 0.001 | 0.021 |
| <i>CYP2D6</i> | rs1080985° | C | 0.162 | 0.051 | 0.103 | 0.240 | 0.241 | 0.239 | 0.292 |
| <i>CYP2D6</i> | rs16947° | A | 0.368 | 0.568 | 0.135 | 0.357 | 0.338 | 0.332 | 0.326 |
| <i>CYP2D6</i> | rs1135840° | C | 0.404 | 0.322 | 0.292 | 0.474 | 0.460 | 0.530 | 0.438 |
| <i>CYP3A4</i> | rs2687116 | C | 0.220 | 0.721 | 0.005 | 0.045 | 0.030 | 0.102 | 0.083 |
| <i>ABCB1</i> | rs1045642 | A | 0.395 | 0.150 | 0.398 | 0.575 | 0.518 | 0.428 | 0.438 |
| <i>ABCB1</i> | rs1128503 | A | 0.416 | 0.136 | 0.627 | 0.587 | 0.416 | 0.403 | 0.458 |
| <i>ABCB1</i> | rs2032582 | T | 0.049 | 0.001 | 0.134 | 0.050 | 0.018 | 0.059 | 0.479 |
| <i>SLC6A4</i> | rs2066713 | A | 0.257 | 0.254 | 0.066 | 0.289 | 0.381 | 0.314 | 0.292 |
| <i>SLC6A4</i> | rs1042173 | C | 0.485 | 0.185 | 0.822 | 0.552 | 0.437 | 0.542 | 0.375 |
| <i>TPH1</i> | rs1799913 | T | 0.321 | 0.163 | 0.475 | 0.269 | 0.391 | 0.372 | 0.354 |
| Sample size | | | 5008 | 1322 | 1008 | 978 | 1006 | 694 | 24 |

Data from 1000Genomes_30x, with a global $n = 6404$ genomes (1786 AFR; 1170 EAS; 1202 SAS; 1266 EUR; 980 AMR).

3.5. Association of PK Parameters with Pharmacogenomic Variants

Table 6 summarizes the individual variant significant additive allele effect (ADD) on the PK parameters as response variables. Covariates gender and age were significant ($p < 0.05$) in the models for C_{max} in the SNVs for *CYP2B6*, *CYP2D6*, and *ABCB1*; age was significant ($p < 0.05$) for AUC_{0-t} and $AUC_{0-\infty}$ in the *CYP2B6* and *CYP2D6* SNV models; and gender was significant ($p < 0.05$) in *CYP2B6* SNVs for Cl , and AUC_{0-t} in *CYP2B6* and *CYP2D6* SNVs. Only significant variants are shown in Table 6; some covariates might have significance, such as age and gender in C_{max} for *CYP2C19* and *SLC6A4* SNVs, and gender in AUC_{0-t} for *CYP2C19*, *CYP1A2*, and *CYP3A4* SNVs.

We performed multiple linear regression analysis with response variables $y =$ pharmacokinetic parameter vs. x , being multiple SNVs, including demographic covariables. Supplementary Material Table S2 displays the statistically significant models ($p < 0.000$), calculated using a stepwise method with the selected SNVs. *CYP2D6* SNVs are present in all regression models, and the correlation was reduced with the inclusion of gender variable in the models for the Cl parameter, and with the introduction of height in the AUC_{0-t} model. Significant *CYP2D6* SNVs were rs1065852, rs1135840, rs28371706, and rs28371703, the latter being in all regression models with high coefficients. Four *CYP2C19* SNVs were found significant: rs11188072, rs12769205, rs4244285, and rs4917623.

Table 6. Additive allele effect (ADD) of SNVs associated with PK parameters.

| PK Parameter | Gene | Chromosome | SNV | Minor Allele | Coefficient (ADD) | p-Value |
|--------------------|----------------------|------------|-------------------|--------------|-------------------|--------------|
| C _{max} | <i>ABCB1</i> | 7 | rs2032582 | C | −2.27 | 0.033 |
| | <i>ABCB1</i> | 7 | rs1128503 | G | −2.11 | 0.042 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4802101 | A | 5.38 | 0.009 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803418 | G | −2.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803419 | A | −2.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs2279344 | G | 4.94 | 0.005 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs28371703 | A | 4.87 | 0.016 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4802101 | A | 219.30 | 0.022 |
| AUC _{0-t} | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803418 | G | −156.30 | 0.002 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803419 | A | −156.30 | 0.002 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs2279344 | G | 180.50 | 0.033 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1135840 | C | 142.00 | 0.005 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs28371703 | A | 291.80 | 0.001 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1065852 | A | 249.80 | 0.001 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4802101 | A | 568.30 | 0.020 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803418 | G | −336.90 | 0.010 |
| AUC _{0-∞} | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803419 | A | −336.90 | 0.010 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs2279344 | G | 463.50 | 0.032 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1135840 | C | 301.80 | 0.023 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs28371703 | A | 733.80 | 0.001 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1065852 | A | 783.60 | 0.000 |
| | <i>CYP2C9</i> | 10 | rs2256871 | G | −1.99 | 0.047 |
| | <i>SLC6A4</i> | 17 | rs1042173 | A | 9.89 | 0.049 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4802101 | A | 18.43 | 0.045 |
| t _{1/2} | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs2279344 | G | 16.82 | 0.035 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs28371703 | A | 23.54 | 0.006 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1065852 | A | 28.64 | 0.000 |
| | <i>ABCB1</i> | 7 | rs2032582 | C | 14.20 | 0.018 |
| Cl | <i>ABCB1</i> | 7 | rs1128503 | G | 11.77 | 0.048 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4802101 | A | −24.28 | 0.047 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803418 | G | 14.00 | 0.035 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs4803419 | A | 14.00 | 0.035 |
| | <i>CYP2B6</i> | 19 | rs2279344 | G | −22.78 | 0.031 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs28371703 | A | −26.79 | 0.022 |
| | <i>CYP2D6</i> | 22 | rs1065852 | A | −21.36 | 0.043 |

Only SNVs with $p < 0.05$ are summarized. SNVs with the lower p -value are written in bold text.

Other CYP SNVs such as *CYP1A2* rs2470890 are significant in the regression models, as well as *CYP2C9* SNVs rs1799853, rs28371686, and rs2256871. *CYP3A4* variants also seem to be relevant for PK parameters, with five different associated variants. From all the statistical models executed, out of the total 54 SNVs initially explored from 12 genes, 39 SNVs resulted in significance for 10 genes: 3 for *CYP1A2*, 6 for *CYP2B6*, 3 for *CYP2C9*, 4 for *CYP2C19*, 6 for *CYP2D6*, 5 for *CYP3A4*, 1 for *CYP3A5*, 3 for *ABCB1*, 2 for *SLC6A4*, and 1 for *TPH1*.

The *CYP2D6**10 haplotype, related to decreased *CYP2D6* function (poor drug metabolism), was found in only one volunteer (subject 25), based on *CYP2D6* rs1065852 (haplotype A/A) and rs11358490 (haplotype C/C). As shown in Table 2, t_{1/2} was three times higher (106.9 h) for this subject than the overall mean (31.02 h). AUCs and t_{1/2} were statistically different between genotypes of *CYP2D6* rs1065852 ($p < 0.001$). Stratification of subjects based on *CYP2D6* genotypes confirmed the difference in the PK profiles, based on the three SNVs found in this study (rs1065852, rs1135840, and rs28371703) (Figure 5).

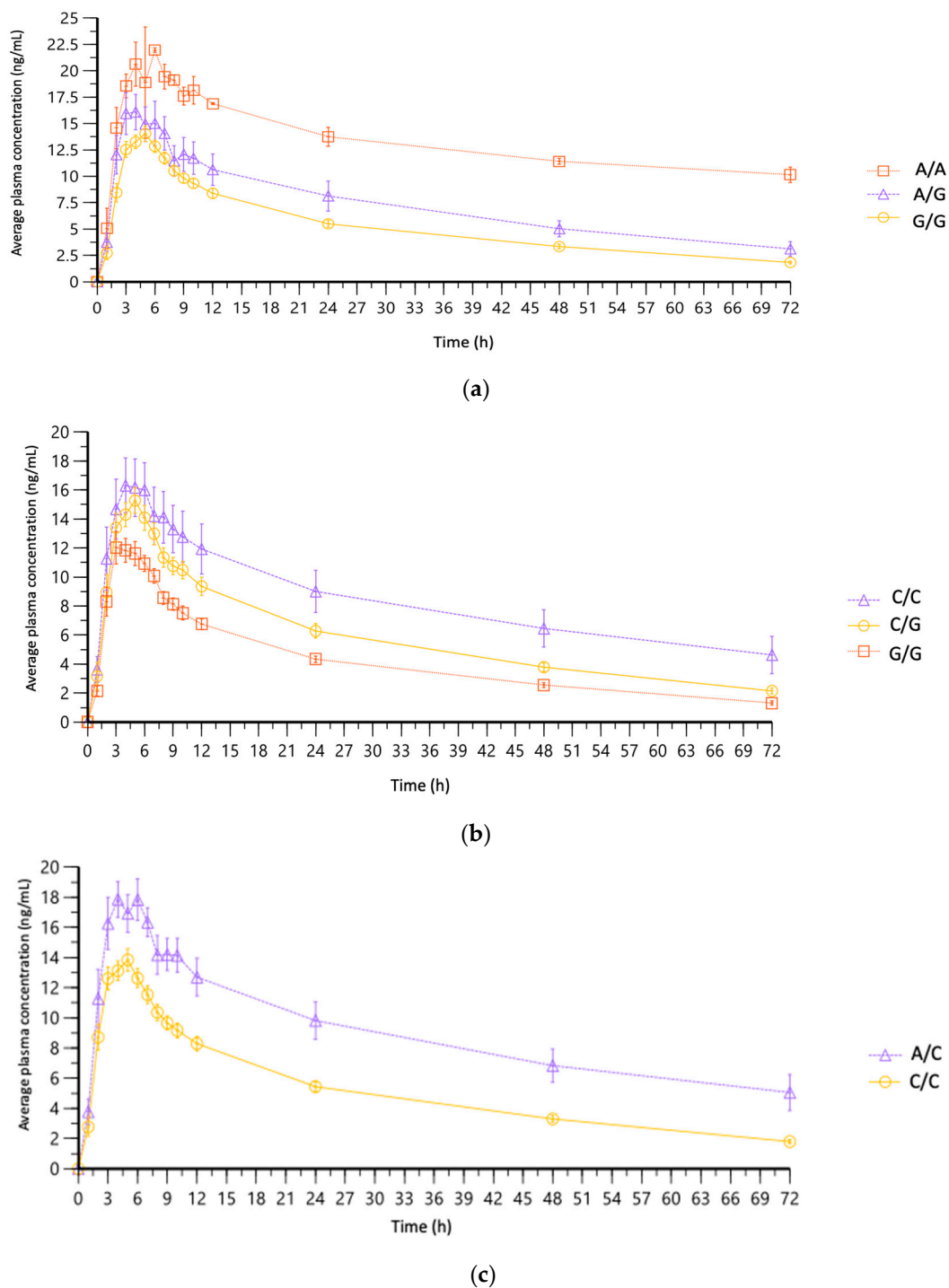


Figure 5. Mean plasma concentration–time curve of fluoxetine, stratified by *CYP2D6* genotypes: (a) rs1065852 (100C>T), associated with decreased function *CYP2D6**10 allele (A/A $n = 1$; A/G $n = 3$; G/G $n = 20$); (b) rs1135840 (4180G>C), associated with decreased function *CYP2D6**10 allele (C/C $n = 4$; C/G $n = 13$; G/G $n = 7$); (c) rs28371703 (974C>A), associated with no function *CYP2D6**4 allele (A/C $n = 4$; C/C $n = 20$).

After removing from the bioequivalence analysis the PK data of the subject with decreased *CYP2D6* function based on *CYP2D6* *10, which was an extreme outlier in the statistical analysis and identified phenotypically as a poor metabolizer of fluoxetine, there was a reduction of 4.22% in the intersubject variability in AUC_{0-t} (44.97% vs. 40.75%) and of 13.66% in $AUC_{0-\infty}$ (57.12% vs. 43.46%) (Table 7).

Table 7. Fluoxetine bioequivalence assessment after excluding the PK data of the slow-metabolizing subject ($n = 23$).

| Parameter | Geometric Mean | | T/R Ratio (%) | 90% Confidence Interval | Intrasubject Variability (%) | Intersubject Variability (%) | Power (%) |
|------------------|------------------|-----------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------|
| | Test (T) Product | Reference (R) Product | | | | | |
| C_{max} | 15.32 | 14.83 | 103.28 | 95.89–111.23 | 14.7% | 28.37% | 100.0% |
| AUC_{0-t} | 363.16 | 346.11 | 104.93 | 99.61–110.53 | 10.3% | 40.75% | 100.0% |
| $AUC_{0-\infty}$ | 441.64 | 426.27 | 103.61 | 100.24–107.09 | 6.5% | 43.46% | 100.0% |

4. Discussion

Despite having better therapeutic efficacy than first-generation and other third-generation antidepressants, the clinical response to fluoxetine is still highly variable, with 10.6% of patients discontinuing treatment for major depressive disorder due to a lack of therapeutic efficacy [28]. Because of that, pharmacological research on fluoxetine is relevant since the lack of therapeutic efficacy could derive from pharmacokinetic causes. Fluoxetine exhibits high intersubject PK variability, as confirmed in our study. Also, the exploration of different ethnicities is important for a better understanding of the pharmacogenomics of antidepressants, assessing both their pharmacokinetics and efficacy [29–31].

In this bioequivalence study in a Mexican sample, fluoxetine $t_{1/2}$ was calculated as 30.7 h and 31.3 h for the test and reference formulations, respectively. These values are lower than those reported in the international literature for the drug, ranging between 4 and 6 days [32]. Nevertheless, our obtained values match with those reported for extensive metabolizers [33]. Maximum $t_{1/2}$ values in our study sample were 88.9 and 106.9 h (3.7 and 4.5 days), corresponding to a subject with poor CYP2D6 metabolizer phenotype. Mean t_{max} was found around 1 h before the reported value, confirming a high proportion of extensive metabolizers in the sample studied, which has also been found by other researchers in the Mexican population [34].

Bioequivalence was concluded between test and reference formulations of fluoxetine 20 mg capsules with a 2×2 crossover design, in which each subject serves as its own control. Maximum intrasubject variability was 14.4% for C_{max} , so the sample size of 24 subjects was enough to achieve the minimum acceptable statistical power of 80%. Nevertheless, intersubject variability was high, up to 57.1% for $AUC_{0-\infty}$, which is also well known [35]. It has been previously reported that drugs mainly metabolized by CYP3A4 tend to have higher intrasubject PK variability, while drugs primarily metabolized by CYP2D6 show high intersubject variability in general [36], which is confirmed for fluoxetine in this study.

The quantitative impact of CYP variants is reported in this study. *CYP2D6* rs28371703 had the greatest impact on the PK parameters of fluoxetine in the regression models. One subject with homozygote allele A/A for SNV rs1065852, associated with decreased CYP2D6 function, was found in our study sample, and we confirmed that the plasmatic $t_{1/2}$ increased about three times compared with A/G and G/G alleles. This SNV frequency in our study ($1/24 = 4.2\%$) is consistent with reports in the literature, ranging from 2.8% and up to 4.3% in Caucasian, Hispanic, and Afro-American populations [37]. Together with *CYP2D6* rs11358490, this SNV is part of the *CYP2D6**10 haplotype [7], known to have decreased cytochrome function along with other gene variants [38]. Moreover, a phenotype–genotype relationship was identified for three *CYP2D6* variants, confirming the relevance of this cytochrome in fluoxetine metabolism. *CYP2C19* activity was found to be associated with differential exposure to the drug based on the genotype, as well as CYPs 1A2, 2C9, and 3A4, confirming previous findings [39]. Six *CYP2B6* SNVs were found relevant in fluoxetine metabolism. *CYP2B6* is also known to participate in antidepressant metabolism [40], so attention should be also pointed to this cytochrome when administering SSRI, as recently discussed in CPIC guidelines [41].

In this study, we identified 34 significant gene variants on 10 genes with quantifiable relevance in the pharmacokinetics of fluoxetine, with a candidate gene approach. Out of those, 29 SNVs belong to 7 CYPs (*CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*,

CYP3A4, and *CYP3A5*), and 5 SNVs to 3 pharmacodynamics (PD)- and efficacy-related genes (*SLC6A4*, *TPH1*, *ABC1*). These three genes encoding for the serotonin transporter 1, *p*-glycoprotein 1, and L-tryptophan hydroxylase 1, respectively, are directly involved in the PD of fluoxetine. These have been researched thoroughly in the past [42], aiming for a better understanding of the efficacy of antidepressants from the PD perspective. Even though they seem important in fluoxetine PK, the role of PK-related proteins in drug PD is multifactorial, and medication response still cannot be associated purely with single gene variations, as has been explored and evidenced in similar studies for other therapeutic classes [43].

Regarding the limitations of this study, it is important to note that the sample size required for bioequivalence studies is considerably smaller than that required for pharmacogenetic studies, so we recommend more research into pharmacogenetics in pharmacokinetic studies, considering pharmacogenetics as an exploratory objective. Also, further evidence should be gathered to confirm the differences in fluoxetine PK between genders, as the number of females in this study was considerably lower than males. Finally, this study was conducted in healthy volunteers to explore fluoxetine PK, without the intention of evaluating its efficacy.

With this clinical study with fluoxetine hydrochloride, we confirm that through genotyping participating subjects in bioequivalence studies, the drug exposure can be assessed, and significant reduction of the intersubject variability can be achieved in clinical trials. The latter was evidenced despite the limitation of the sample size for the pharmacogenetic analyses within the context of a bioequivalence study for determining interchangeability between two fluoxetine formulations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jpm13091352/s1>: Table S1: Individual fluoxetine PK parameters; Table S2: SNVs and demographic characteristics as predictor variables of PK parameters.

Author Contributions: Conceptualization, C.A.D.-T., J.A.P.-A. and V.G.-C.; methodology, C.A.D.-T. and J.A.P.-A.; software, C.A.D.-T.; resources, C.A.D.-T., J.A.P.-A. and V.G.-C.; writing—original draft preparation, C.A.D.-T.; writing—review and editing, C.A.D.-T., J.A.P.-A. and V.G.-C.; supervision, J.A.P.-A. and V.G.-C.; project administration, J.A.P.-A. and V.G.-C.; funding acquisition, C.A.D.-T., J.A.P.-A. and V.G.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Bioequivalence study was funded by PROTEIN, S.A. de C.V. (Apotex México), whose test formulation was evaluated. The pharmacogenomic part of this study was funded by projects granted to V.G.-C.: “Estudio farmacogenético y de biodisponibilidad comparativa para evaluación del efecto de polimorfismos relevantes en la farmacocinética de fluoxetina en voluntarios sanos mexicanos” (INMEGEN:CEI:2017/04) and “Variantes genéticas y su relación con la respuesta al tratamiento” (INMEGEN:CEI:2016/23).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by Ethics Committees at Axis Clinicals Latina (protocol code: ACL16-PC019; approval date: 25 August 2016), Mexican regulatory agency COFEPRIS (authorization code: 163300410B0384/2016; approval date: 27 September 2016), and Institutional Review Board at INMEGEN (approval code: CEI 2017/04; approval date: 30 March 2017), for the conduction of the bioequivalence and pharmacogenomic phases of this clinical trial with healthy subjects.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study, both for the bioequivalence and pharmacogenomic analyses.

Data Availability Statement: The authors declare that the data supporting the findings of this study are mostly available within the paper. Complementary data are available upon request via email to the authors.

Acknowledgments: C.A.D.-T. thanks the Mexico National Council of Humanities, Science and Technology (CONAHCYT) for the scholarship granted (CVU No. 439303) to complete the doctoral degree in Experimental Clinical Research in Health (Clinical Pharmacology), from the Medical, Dental, and Health Sciences Postgraduate Program (PMDCMOS) at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The authors greatly appreciate the work, support, and collaboration of the clinical and bioanalytical staff at Axis Clinicals Latina for the conduction and analysis of plasma concentrations of fluoxetine for the bioequivalence study. Thanks to Dulce Karina Rico-Amador and Cintia K. Guzmán-Cruz, from the Pharmacogenomics Lab, INMEGEN, for their support of the pharmacogenomic analysis in this project. The authors also thank Aurora de la Peña-Díaz for her contributions and comments to this project, and Patricia Segura-Medina for the critical review of the final version of this paper.

Conflicts of Interest: The sponsor of the bioequivalence trial had no role in the conduction of the study nor execution of this project, data collection, analysis, interpretation, or writing the paper. The authors declare no conflict of interest related to the analysis and interpretation of the results of this study.

References

1. World Health Organization (WHO). Depressive Disorder (Depression). Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression> (accessed on 5 May 2023).
2. Elsevier, B.V. Scopus. Available online: <https://www.scopus.com/home.uri> (accessed on 5 May 2023).
3. Maruf, A.A.; Greenslade, A.; Arnold, P.D.; Bousman, C. Antidepressant Pharmacogenetics in Children and Young Adults: A Systematic Review. *J. Affect. Disord.* **2019**, *254*, 98–108. [CrossRef]
4. PharmGKB Fluoxetine. Available online: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA449673> (accessed on 5 July 2023).
5. Iosifescu, D.V. Pharmacogenomic Testing for Next-Step Antidepressant Selection: Still a Work in Progress. *JAMA* **2022**, *328*, 146–148. [CrossRef] [PubMed]
6. Cicali, E.J.; Elchynski, A.L.; Cook, K.J.; Houder, J.T.; Thomas, C.D.; Smith, D.M.; Elsey, A.; Johnson, J.A.; Cavallari, L.H.; Wiisanen, K. How to Integrate CYP2D6 Phenoconversion into Clinical Pharmacogenetics: A Tutorial. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2021**, *110*, 677–687. [CrossRef] [PubMed]
7. Hicks, J.K.; Sangkuhl, K.; Swen, J.J.; Ellingrod, V.L.; Müller, D.J.; Shimoda, K.; Bishop, J.R.; Kharasch, E.D.; Skaar, T.C.; Gaedigk, A.; et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants: 2016 Update. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, *102*, 37–44. [CrossRef] [PubMed]
8. COFEPRIS. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013; Que Establece las Pruebas y Procedimientos Para Demostrar Que un Medicamento es Intercambiable. Requisitos a Que Deben Sujetarse los Terceros Autorizados Que Realicen las Pruebas de Intercambiabilidad. Requisitos Para Realizar los Estudios de Biocomparabilidad. Requisitos a Que Deben Sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias Que Realicen las Pruebas de Biocomparabilidad; Diario Oficial de la Federación (DOF). Published on 20 September 2013. Available online: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0 (accessed on 20 May 2023).
9. Clinicaltrials.gov. Studies Found for: Fluoxetine, Prozac, Reconcile. Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results/details?term=bioequivalence&intr=Prozac> (accessed on 20 August 2023).
10. COFEPRIS. Consultas de Ensayos Clínicos Registrados. Available online: <http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.asp> (accessed on 20 August 2023).
11. Moraes, M.O.; Lerner, F.E.; Corso, G.; Bezerra, F.A.F.; Moraes, M.E.A.; De Nucci, G. Fluoxetine Bioequivalence Study: Quantification of Fluoxetine and Norfluoxetine by Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *39*, 1053–1061. [CrossRef]
12. Chow, S.-C.; Liu, J.-P. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008; 760p.
13. ICH (International Council for Harmonisation). Integrated Addendum to ICH E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice E6(R2). Published on 9 November 2016. Available online: https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf (accessed on 20 May 2023).
14. ICH (International Council for Harmonisation). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Guidelines. Available online: <https://www.ich.org/products/guidelines.html> (accessed on 15 May 2023).
15. WMA. WMA Declaration of Helsinki—Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Available online: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/> (accessed on 5 July 2023).

16. Illumina. Infinium®Global Screening Array-24. Available online: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-global-screening.html> (accessed on 2 May 2023).
17. Certara. Phoenix WinNonlin. Available online: <https://www.certara.com/software/phoenix-winnonlin/> (accessed on 5 May 2023).
18. Lee, H.Y.; Lee, Y.J. The Data Analysis Tool for Average Bioequivalence (ABE) and Bioavailability (BA) (BEAR v2.7.7). Available online: <http://pkpd.kmu.edu.tw/bear/> (accessed on 15 May 2023).
19. IBM. SPSS Statistics. Available online: <https://www.ibm.com/products/spss-statistics> (accessed on 15 May 2023).
20. Fan, J.; Liu, H. Statistical Analysis of Big Data on Pharmacogenomics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 987–1000. [CrossRef]
21. Cruz-Correa, O.F.; León-Cachón, R.B.R.; Barrera-Saldaña, H.A.; Soberón, X. Prediction of Atorvastatin Plasmatic Concentrations in Healthy Volunteers Using Integrated Pharmacogenetics Sequencing. *Pharmacogenomics* **2017**, *18*, 121–131. [CrossRef]
22. Hodgson, K.; Mufti, S.J.; Uher, R.; McGuffin, P. Genome-Wide Approaches to Antidepressant Treatment: Working towards Understanding and Predicting Response. *Genome Med.* **2012**, *4*, 52. [CrossRef]
23. PharmGKB. The Pharmacogenomics Knowledgebase. Available online: <https://www.pharmgkb.org/> (accessed on 15 May 2023).
24. Cariaso, M.; Lennon, G. SNPedia: A Wiki Supporting Personal Genome Annotation, Interpretation and Analysis. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D1308–D1312. [CrossRef]
25. Fairley, S.; Lowy-Gallego, E.; Perry, E.; Flicek, P. The International Genome Sample Resource (IGSR) Collection of Open Human Genomic Variation Resources. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D941–D947. [CrossRef]
26. Chen, S.; Francioli, L.C.; Goodrich, J.K.; Collins, R.L.; Kanai, M.; Wang, Q.; Alfoldi, J.; Watts, N.A.; Vittal, C.; Gauthier, L.D.; et al. A Genome-Wide Mutational Constraint Map Quantified from Variation in 76,156 Human Genomes. *bioRxiv* **2022**, 485034.
27. Phan, J.; Yin, Y.; Zhang, H.; Qiang, W.; Shekman, E. Allele Frequency Aggregator (ALFA). Available online: www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/ (accessed on 5 May 2023).
28. Hertzberg, M.; Feldman, M.; Beckham, J.; Kudler, H.; Davidson, J. Lack of Efficacy for Fluoxetine in PTSD: A Placebo Controlled Trial in Combat Veterans. *Ann. Clin. Psychiatry* **2000**, *12*, 101–105. [CrossRef] [PubMed]
29. Hongkaew, Y.; Gaedigk, A.; Wilffert, B.; Ngamsamut, N.; Kittitharaphan, W.; Limsila, P.; Sukasem, C. Relationship between CYP2D6 Genotype, Activity Score and Phenotype in a Pediatric Thai Population Treated with Risperidone. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4158. [CrossRef]
30. Lesser, I.M.; Myers, H.F.; Lin, K.-M.; Bingham Mira, C.; Joseph, N.T.; Olmos, N.T.; Schettino, J.; Poland, R.E. Ethnic Differences in Antidepressant Response: A Prospective Multi-Site Clinical Trial. *Depress. Anxiety* **2010**, *27*, 56–62. [CrossRef] [PubMed]
31. Wagner, G.J.; Maguen, S.; Rabkin, J.G. Ethnic Differences in Response to Fluoxetine in a Controlled Trial with Depressed HIV-Positive Patients. *Psychiatr. Serv.* **1998**, *49*, 239–240. [CrossRef] [PubMed]
32. Micromedex. Fluoxetine Hydrochloride. Truven Health Analytics LLC. 2016. Available online: <https://www.micromedexsolutions.com/> (accessed on 1 May 2023).
33. PLM. PROZAC®20 (IPP). Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 2016. Available online: https://www.medicamentosplm.com/Home/productos/prozac_20_c%C3%A1psulas/50/101/9459/14 (accessed on 1 May 2023).
34. Sagahón-Azúa, J.; Medellín-Garibay, S.E.; Chávez-Castillo, C.E.; González-Salinas, C.G.; Milán-Segovia, R.D.C.; Romano-Moreno, S. Factors Associated with Fluoxetine and Norfluoxetine Plasma Concentrations and Clinical Response in Mexican Patients with Mental Disorders. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2021**, *9*, e00864. [CrossRef]
35. Alfaro, C.L.; Lam, Y.W.F.; Simpson, J.; Ereshefsky, L. CYP2D6 Inhibition by Fluoxetine, Paroxetine, Sertraline, and Venlafaxine in a Crossover Study: Intraindividual Variability and Plasma Concentration Correlations. *J. Clin. Pharmacol.* **2000**, *40*, 58–66. [CrossRef]
36. Sugihara, M.; Takeuchi, S.; Sugita, M.; Higaki, K.; Kataoka, M.; Yamashita, S. Analysis of Intra- and Intersubject Variability in Oral Drug Absorption in Human Bioequivalence Studies of 113 Generic Products. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 4405–4413. [CrossRef]
37. Reyes-Barron, C.; Tonarelli, S.; Delozier, A.; Briones, D.F.; Su, B.B.; Rubin, L.P.; Xu, C. Pharmacogenetics of Antidepressants, A Review of Significant Genetic Variants in Different Populations. *Clin. Depress.* **2016**, *2*, 1000109. [CrossRef]
38. Caudle, K.E.; Sangkuhl, K.; Whirl-Carrillo, M.; Swen, J.J.; Haidar, C.E.; Klein, T.E.; Gammal, R.S.; Relling, M.V.; Scott, S.A.; Hertz, D.L.; et al. Standardizing CYP 2D6 Genotype to Phenotype Translation: Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin. Transl. Sci.* **2020**, *13*, 116–124. [CrossRef]
39. Deodhar, M.; Rihani, S.B.A.; Darakjian, L.; Turgeon, J.; Michaud, V. Assessing the Mechanism of Fluoxetine-Mediated CYP2D6 Inhibition. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 148. [CrossRef]
40. Hesse, L.M.; Venkatakrishnan, K.; Court, M.H.; von Moltke, L.L.; Duan, S.X.; Shader, R.I.; Greenblatt, D.J. CYP2B6 Mediates the in vitro Hydroxylation of Bupropion: Potential Drug Interactions with Other Antidepressants. *Drug Metab. Dispos.* **2000**, *28*, 1176–1183.
41. Bousman, C.A.; Stevenson, J.M.; Ramsey, L.B.; Sangkuhl, K.; Hicks, J.K.; Strawn, J.R.; Singh, A.B.; Ruaño, G.; Mueller, D.J.; Tsermpini, E.E.; et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6, SLC6A4, and HTR2A Genotypes and Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2023**, *114*, 51–68. [CrossRef]

42. Niitsu, T.; Fabbri, C.; Bentini, F.; Serretti, A. Pharmacogenetics in Major Depression: A Comprehensive Meta-Analysis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2013**, *45*, 183–194. [[CrossRef](#)]
43. Abbas, B.; Sabri, N.A.; El-Khouly, A.A. Association between Food/UGT2B7 Polymorphisms and Pharmacokinetics/Pharmacodynamics Properties of Indapamide in Healthy Humans. *Biomedicines* **2023**, *11*, 1501. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

- 9.l. **Artículo “Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population” aceptado y en proceso editorial en el *Clinical Pharmacology in Drug Development Journal* (Octubre 2023)**

Clinical Pharmacology in Drug Development

Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Clinical Pharmacology in Drug Development</i> |
| Manuscript ID | CPD-23-0099.R1 |
| Manuscript Type: | Commentary |
| Date Submitted by the Author: | 04-Oct-2023 |
| Complete List of Authors: | Díaz-Tufinio, Carlos; Tecnológico de Monterrey - Campus Ciudad de Mexico, School of Engineering and Sciences González-Covarrubias, Vanessa; Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Laboratorio de Farmacogenómica Palma-Aguirre, José; Axis Clinicals Latina |
| Keywords: | Bioequivalence, Pharmacokinetics, Variability, Biostatistics, Pharmacogenetics, Drug Metabolism, Pharmaceutical R&D |
| Abstract: | <p>Bioequivalence trials allow the testing of generic formulations, speeding up the development of new therapeutic alternatives. Given the characteristics of these trials, such as the conduction in controlled conditions with healthy participants, the design of these randomized clinical trials is critical for their conclusion. In this project, we aimed to collect and catalog pharmacological information from 230 bioequivalence clinical trials, encompassing 123 different active substances (parent drug and/or its metabolites), their physicochemical properties, and pharmacogenetic characteristics, providing also a compendium of their pharmacokinetic (PK) intra-subject and inter-subject variabilities in Mexican population. Also, we sought to explore potential relationships among the pharmacological parameters and study design variables to generate quantitative models to correlate them with the PK variability. These analyses provide scientific evidence to support future comparative bioavailability and bioequivalence trials, by suggesting experimental designs and sample size.</p> <p>The information provided in this paper, based on randomized controlled clinical trials, is reliable evidence that aims to back up adequate bioequivalence trial design and the calculation of appropriate sample sizes, based on internationally accepted statistical requirements. Finally, from the bedside perspective, these data - together with clinically annotated genetic variants and drug pharmacological information - could support clinicians' decision-making for improving the usage of medication in the real-world setting.</p> |
| | |

1
2
3
4 **Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence**
5 **trials in Mexican population**
6
7

8 Carlos Alejandro Díaz-Tufinio^{1,2}, Vanessa Gonzalez-Covarrubias³, José Antonio Palma-Aguirre,
9 *PhD*¹ *

10
11
12
13 ¹ Axis Clinicals Latina, Mexico City, Mexico; palma.a@axisclinical.com (J.A.P.A.)

14 ² Tecnológico de Monterrey, School of Engineering and Sciences, Mexico City, Mexico;
15 cdiaztof@gmail.com (C.A.D.T.)

16
17 ³ Laboratorio de Farmacogenómica, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN),
18 Mexico City, Mexico; vgonzalez@inmegen.gob.mx (V.G.C.)
19
20

21
22 *Corresponding author: palma.a@axisclinical.com
23
24

25 Address: Av. Ing. Basilio Romo Anguiano 225, Guadalupe Insurgentes, Gustavo A. Madero,
26 07870, Mexico City, Mexico.
27
28
29
30

31 **Word count:** 4,016
32
33

34 **Aggregate number of figures and tables:** 1 (Supplementary material: 5)
35
36
37

38 **Number of references:** 23
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51

52 **Keywords:** pharmacokinetics, intra-subject variability, bioequivalence, sample size,
53 biopharmaceutical classification system, pharmacogenomics.
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Biomedical data from controlled randomized clinical trials (RCT), from both early pharmacological phase stages and bioequivalence testing, is a valuable resource for obtaining the primary pharmacological characteristics of the studied drugs. Insights on drug safety, and its efficacy to some extent, might be explored as secondary endpoints. The clinical and analytical laboratories for pharmaceutical products' interchangeability evaluation in Mexico are trustful sources of pharmacokinetic information, given that the thorough internal Quality Management Systems (QMS), regulatory requirements, and sponsor audits, contribute to the generation of standardized experimental data, from the design of the trial to its final statistical analysis.

Bioequivalence studies aim to assess the interchangeability between pharmaceutical products by comparing reference vs. test drug pharmacokinetic (PK) parameters - C_{max} and AUC - with slightly different evaluation methodologies among countries¹. These studies are conducted mainly with healthy participants, so it is possible to control the experimental design with strict schedules, dosing, meals, and sampling times, as well as demographic and clinical variables of the participant subjects. Since these sources of variation are controlled and blocked in the statistical analysis, the PK variability of the tested drugs can be estimated with high confidence with the pharmacological data derived from these trials.

Drug PK variability, defined as a coefficient of variation (CV%), can be split into an intra-subject (IaSV) and an inter-subject (IeSV) component, to quantify the within- and among individuals PK variation, respectively. These values are usually reported in the drug technical assessment documentation of regulatory agencies, such as those from the Center of Drug Evaluation and Research (CDER) of the Federal Drug Administration (FDA) and the European Public Assessment Reports (EPAR) of the European Medicines Agency (EMA). Nevertheless, these data might vary

1
2
3 among different formulations, study designs, clinical trial conduction, geographical regions, and
4 tested populations, due to potential ethnic differences in drug absorption and metabolism¹, partly
5 explained by the genetic background. This last explains why bioequivalence testing is mandatory
6 to be conducted regionally as a regulatory requirement in several countries.
7
8
9

10
11 Therefore, the authors consider that it is important to compile and promote access to clinical and
12 PK data derived from RCTs for bioequivalence purposes, respecting sponsors' confidentiality,
13 non-disclosure agreements, and protecting sensitive information from the participants. These data
14 could be useful by contributing to future studies' designs, by justifying sufficient sample sizes,
15 blood sampling, and appropriate statistical criteria. Also, the derived information could be used as
16 an aid to identify potential drug safety issues based on rates of adverse events experienced in
17 healthy participants.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 In the last decade, *post-hoc* analyses have combined randomized clinical trials' information in
30 experimental controlled settings to analyze specific² and massive amounts of drug data³⁻⁸ for
31 scientific or regulatory purposes. For instance, Ramirez, *et al.* (2010), investigated the
32 physicochemical characteristics of 80 active substances in 124 bioequivalence trials and associated
33 them with a potential outcome in a hypothetical bioequivalence trial (pass/fail) based on previous
34 results. In another report, Sugihara, *et al.* (2015), analyzed the PK IaSV and IeSV derived from
35 113 clinical trials with 74 active ingredients. Their observations led to support that the PK variation
36 could be associated with the metabolizing enzymes or genetic profiles⁷. Similarly, Hammami, *et*
37 *al.* (2017), compiled the results of 42 products in bioequivalence testing for the Saudi market⁸.
38 These reports point toward the scientific and clinical benefit of collecting, classifying, and
39 analyzing bioequivalence data in meta-analyses.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In this report, we aimed to collect and catalog pharmacological information from 230
4 bioequivalence clinical trials, encompassing 123 different active substances (parent drug and/or
5 its metabolites), physicochemical properties, and pharmacogenetics. A compendium of PK IaSV
6 and IeSV in Mexican population, as well as sample size suggestions and study designs for 110
7 medicinal active ingredients derived from our data, are provided in this work (Supplemental Tables
8 S1 and S2). This report provides scientific evidence to support future comparative bioavailability
9 and bioequivalence trials, following national and international regulatory guidelines.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **METHODS**

23
24 All clinical protocols compiled in this study were reviewed by the Ethics Committee and
25 Institutional Review Board (IRB) of Axis Clinicals Latina (ACL), authorized by the National
26 Commission of Bioethics (CONBIOETICA) and the Mexican national regulatory agency, Federal
27 Commission for the Protection against Sanitary Risk (COFEPRIS). After this approval, all
28 protocols followed federal authorization by the Commission of Sanitary Authorization (CAS),
29 COFEPRIS. The general information of each protocol was uploaded to the Mexican National
30 Registry of Clinical Trials (<http://siipris03.cofepris.gob.mx/RegNacEnsClinicos/>), a regional
31 website similar to <https://clinicaltrials.gov/> database for trials performed in Mexico. The studies
32 were conducted under national and international Good Clinical Practice (GCP) guides, according
33 to the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for
34 Human Use (ICH) guidelines, and the statutes of the Declaration of Helsinki and further
35 amendments. All volunteers were recruited according to the inclusion criteria for each protocol
36 and signed written informed consent, approved by the IRB and COFEPRIS. Relevant national and
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 international regulatory guidelines, their dates, and websites, are listed in the section “Pertinent
4 regulatory sources” after the references of this work.
5
6
7

8 We compiled data from 230 pharmacokinetic or bioequivalence studies, conducted from 2012 to
9 2020 at ACL, a research center in Mexico City that conducted around 30 to 40 pharmacological
10 trials per year in the analyzed period. This facility is licensed as a Clinical and Bioanalytical Unit,
11 so-called *third party* by the Mexican regulation, which conducts independent bioavailability and
12 bioequivalence studies according to the national requirement based on the Official Mexican Law
13 NOM-177-SSA1-2013, issued by COFEPRIS.
14
15
16
17
18
19
20
21

22 A total of 7,880 individuals for the 230 analyzed clinical trials were recruited, most of them in
23 healthy conditions as confirmed by a physical examination, blood, and urine tests, except for 3
24 studies conducted with special populations (cancer patients) for capecitabine and leuprolide
25 formulations.
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **Pharmacokinetic and statistical analyses**

36
37 Curated databases and software used in this project, their dates, and websites, are listed in the
38 section “Curated databases and software used” after the references of this work. The PK
39 parameters were calculated with Phoenix[®] WinNonlin[®] software, using a non-compartmental
40 model with the blood/plasma drug concentrations as input. The parameters included the maximum
41 observed plasmatic/blood concentration (C_{max}), the area under the curve from time 0 to last
42 sampling time t (AUC_{0-t}), area under the curve from time 0 extrapolated to infinite ($AUC_{0-\infty}$),
43 time to maximum concentration (t_{max}), half-life time ($t_{1/2}$), elimination rate constant (Ke), and body
44 clearance (Cl_B). A 90% confidence interval of the log-transformed data was used to assess the
45 bioavailability between the test and reference products. The statistical comparison for
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 bioequivalence of C_{\max} and AUC between both products was performed using Schuirmann's two
4 one-sided t-test (TOST)⁹⁻¹¹. Conventional acceptance criteria (80 - 125% limits) were applied to
5 assess bioequivalence unless a widened interval for C_{\max} was justified and approved in the
6 statistical analysis plan for highly variable drugs (HVD). A drug might be considered in this group
7 if its PK variability is greater than 30%^{12,13}, such as some statins, antilipemic agents, angiotensin
8 II receptor blockers antihypertensives (*i.e.*, valsartan and telmisartan), and antiretrovirals (*i.e.*,
9 lamivudine and zidovudine), among others.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Descriptive & comparative statistical analysis database**

23 We compiled over 50 variables from the 230 analyzed studies, and these were classified as follows:
24

- 25 - Clinical trial characteristics: study design, sample size, and participants' population
26 (healthy subjects or patients).
27
- 28 - Drug physicochemical properties: pharmaceutical form and dose, molecular weight, pKa,
29 solubility, logP, biopharmaceutical classification (BCS), and therapeutic class/group.
30
- 31 - PK parameters & drug metabolism data: t_{\max} , $t_{1/2}$, K_e , Cl_B , and its metabolizing enzymes.
32 These last were retrieved from curated data sources, such as DrugBank, IBM Micromedex
33 Clinical Knowledge Suite, and PharmGKB.
34
- 35 - Statistical outcomes: intra-subject (within-subject) and inter-subject (between-subject)
36 coefficient of variation (IaSV and IeSV, respectively), statistically significant sources of
37 variation of the study as per the Analysis of Variance (ANOVA), number of outlier values
38 detected, and bioequivalence result.
39
- 40 - Safety data: number and severity of adverse drug reactions (ADR) per evaluated
41 formulation (test and reference).
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 We performed statistical analyses using SPSS version 25 to characterize the effect on the PK
4 variability (IaSV and/or IeSV) of variables such as drug properties (physicochemical,
5 pharmacokinetic, and/or pharmacogenetic), and the clinical study design. Statistical methods
6 included paired-sample t-test, ANOVA, and χ^2 test for testing variable associations.
7
8
9
10
11
12
13
14

15 **Pooled variability and prospective sample size estimation**

16
17
18 Pooled coefficients of variation of the PK parameters allow for a reliable estimation of the sample
19 size required for a trial. The calculation of the pooled IaSV¹⁴, for those drugs with at least two
20 entries in our database, was performed with *PowerTOST* v1.4-7, ran in R v3.3.3, using *RStudio*
21 version 1.0.143.
22
23
24
25
26

27 These PK variabilities were considered as supporting information for sample size determination
28 with the classical estimation methodologies for bioequivalence testing^{10,11}. The calculation was
29 performed in *bear* library v.2.7.8, based on the PK parameter with the highest variability for a
30 drug, considering a test/reference ratio between 95-105%, a minimum target power of 80% (type
31 II error $\beta = 0.02$), $\alpha=0.05$ (type I error), and acceptance limits for bioequivalence of 80-125% in a
32 2x2 crossover trial design, unless different statistical acceptance criteria and study design are
33 specified in the column “*Comments on the proposed study design*”. If the reference-scaled average
34 bioequivalence (RSABE) statistical criteria is suggested with replicated studies, the average
35 bioequivalence with expanding limits (ABEL) method for the 90% confidence interval calculation
36 is applied, as recommended by the EMA¹⁵.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 **RESULTS**

Bioequivalence trial designs and drugs' therapeutic classes

We analyzed data from 230 studies, with 38 of them (16.5%) studying formulations with two or more active substances, or with parent drugs and metabolite(s) analyzed. In total, 268 individual analytes (123 different chemical entities) were evaluated. Out of the total number of studies, 174 (75.7%) included both male and female subjects, 53 studies (23.0%) were conducted with males only, and 3 studies (1.3%) with female population. This last due to drug safety risks that might be increased per gender, as certain oncological and psychiatric drugs, *i.e.*, imatinib, gefitinib, letrozole, anastrozole, alfuzosin, tamsulosin, dutasteride, olanzapine, mirtazapine, pramipexole, and bosentan.

Tablet was the most frequent pharmaceutical drug formulation evaluated ($n = 200$, 74.6%) (Supplemental Figure S1.A). Drugs were classified into 14 different therapeutic areas, being neurological, antiviral, cardiovascular, antineoplastic, urologic, and antibiotic agents the main ones, with at least 22 individual molecules in each category (Supplemental Figure S1.B). Most study designs were pivotal ($n = 223$, 97.0%), while 3.0% of them ($n = 7$) were pilot, meaning these last were performed only to explore the trial design, sampling time points, and/or drug PK variability. The most common design was a crossover, 2-sequences, 2-periods (2 x 2), trial for 92.6% of the studies ($n = 213$), 3.9% were parallel designs ($n = 9$), 3.0% were pharmacokinetic 1-period studies ($n = 7$), and less than 1% of the studies ($n = 1$) were fully replicated with 2-sequences, 4-periods. Time sampling truncation for PK analysis up to 72 h was done for 14.0% of the analytes ($n = 37$), which implies that the elimination constant calculation can be omitted, and hence bioequivalence was concluded based only on C_{\max} and AUC_{0-72} for these active ingredients.

1
2
3 Eighty-six percent of the studies (n= 198) were conducted under fasting conditions, while 13.9%
4 of them (n = 32) were done in fed conditions, due to special requirements for particular drugs
5 and/or pharmaceutical forms, such as extended-release formulations.
6
7

8
9
10 From all the studies reported in this work, 257 individual drugs were tested for bioequivalence
11 purposes, excluding pilot and pharmacokinetic trials. Out of them, 87.2% (n = 223) resulted to be
12 bioequivalent based on C_{\max} parameter, 91.1% (n = 234) based on AUC_{0-t} , and 89.5% (n = 230)
13 on $AUC_{0-\infty}$.
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23 **Variability compendium as supportive evidence for sample size estimation in** 24 **bioequivalence trial design** 25

26
27 In this paper, we provide a list of pooled coefficients of variations for 69 drugs (Supplemental
28 Table S1), calculated with robust validated statistical methodologies^{9,14}, based on at least 2
29 crossover studies performed with Mexican volunteers. The degrees of freedom (*df*), calculated as
30 the sum of the pooled volunteers who completed the clinical trial minus the number of periods of
31 each study for a drug, is reported, as well as the 80% confidence upper limit for the pooled ISV,
32 and a minimal sample size, estimated as accepted scientifically by international regulatory
33 agencies. Additionally, a compendium of 41 drugs is reported (Supplemental Table S2) with the
34 variability obtained from a single bioequivalence study for each active ingredient, aiming to
35 support the planning and design of future clinical trials. IaSV is reported in both tables unless a
36 note indicates that the IeSV is reported, based on one-period parallel trial designs.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Drug physicochemical properties and its relationship with drug metabolism

The Biopharmaceutical Classification System (BCS) categorizes drugs into four groups, according to their intestinal permeability and aqueous solubility³: class I (high permeability and high solubility), class II (high permeability, low solubility), class III (low permeability, high solubility), and class IV (low permeability, low solubility)¹⁶. In our study, 241 active ingredients had a defined BCS class, 36.5% of them belonged to class II (n = 88) followed by classes I and III, while class IV drugs were the least represented with 9.1% (n = 22) (Supplemental Figure S1.C).

For the PK parameters C_{\max} and AUC, we assessed the association between the BCS class and the bioequivalence result using χ^2 testing. We observed that the BCS class is associated with the result of the study for AUC_{0-t} ($p = 0.022$) and $AUC_{0-\infty}$ ($p = 0.002$), being not significant for C_{\max} ($p = 0.059$). Further exploration of this association shows that drugs from classes I and III had higher rates of bioequivalent results for AUC, meanwhile, drugs in classes II and IV had higher rates of non-bioequivalent studies based on their individual PK parameters.

Of the 268 drug records studied, 74 (27.6%) of them are reported to be not enzymatically metabolized, as retrieved from curated databases, such as PharmGKB¹⁷. This group includes abacavir, entecavir, emtricitabine, lamivudine, tenofovir, zidovudine, amoxicillin, azithromycin, clavulanate, memantine, piracetam, pramipexole, anastrozole, capecitabine, metformin, and hydrochlorothiazide. Out of the remaining 194 drug records, 50.5% of them (n = 98) are substrates of CYP3A; followed by CYP2D6 substrates (12.4%, n = 24), including aripiprazole, venlafaxine, duloxetine, and fluoxetine; and CYP2C9 substrates (7.7%, n = 15), such as valsartan, losartan, irbesartan, and rosuvastatin. UGT enzyme contributes to the metabolism of 9.3% (n = 18) of the drugs, such as desvenlafaxine, telmisartan, ezetimibe, and bicalutamide (Supplemental Figure

1
2
3 S1.D). Monoaminoxidases (MAO), sulfotransferases (SULT), thymidine phosphorylase, and
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

S1.D). Monoaminoxidases (MAO), sulfotransferases (SULT), thymidine phosphorylase, and
adenylate kinase/nucleoside diphosphate kinase (AK/NDK) were found to participate in secondary
metabolic steps for some drugs, together with 6 additional CYPs (CYP1A1, CYP2A6, CYP3A7,
CYP2E1, CYP2C18, and CYP4F12).

The elimination parameters ($t_{1/2}$, Cl_B , and extrapolated AUC%) demonstrated no statistical
difference when comparing test product vs. reference drug, assessed by paired-sample two-tailed
t-tests (Supplemental Table S3). This confirms an overall similarity of the PK elimination variables
between formulations tested in these bioequivalence trials.

IaSV/IeSV and its relationship with drug metabolism

In this analysis, an active ingredient might have more than one trial conducted, while some IaSV
values were not able to be estimated due to a one-period study design. We calculated and analyzed
the IaSV of 250 individual drugs. The frequency distributions of the IaSV for the three main PK
parameters (C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$) are right-skewed, suggesting that some drugs have an
IaSV greater than the overall average (Figure 1). We classified 30.0% of the drugs ($n = 75$) as
HVD based on its C_{max} , given an IaSV > 30%, while 10.8% ($n = 27$) are HVD for AUC_{0-t} , and
12.1% ($n = 30$) for $AUC_{0-\infty}$.

The variability analysis, stratified by the main metabolic enzyme of each drug according to its
reported pathways¹⁷, evidenced that the IeSV for C_{max} , AUC_{0-t} , and $AUC_{0-\infty}$, as well as $t_{1/2}$ for
reference products, had significant differences among 16 enzymatic substrates (Supplemental
Table S4). Remarkably, drugs metabolized mainly by CYP2D6 have a trend for higher IeSV
compared with other metabolic groups (difference compared to all groups mean: 13.9% for C_{max} ,

1
2
3 23.1% for AUC_{0-t} , and 22.7% for $AUC_{0-\infty}$). Peptidase-substrate drugs, and those reported to have
4
5 an extensive hepatic metabolism, exhibit higher $t_{1/2}$ for the reference products (difference
6
7 compared to all groups mean: 81.7 h and 81.5 h, respectively).
8
9

10 11 12 13 **Safety profiles between test and reference products in bioequivalence trials** 14

15
16 Regarding the adverse drug reactions (ADR) reported during the conducted trials, all of them were
17
18 not serious, with mild to moderate severity, and all the subjects experiencing ADRs recovered
19
20 without sequelae, assessed by validated algorithms¹⁸. The most frequent ADRs included dizziness,
21
22 nausea, headache, diarrhea, and vomiting.
23

24
25 Based on the rate of ADR per recruited subject (ADR/n), the drugs under study that presented the
26
27 highest ADR/n incidence belonged to the neurological field: Aripiprazole, with an average of 4.4
28
29 ADR/n in three studies conducted; pramipexole, with 3.0 ADR/n in two studies; quetiapine, with
30
31 2.8 ADR/n in two studies; mirtazapine, with 2.7 ADR/n in one study; olanzapine, with 2.3 ADR/n
32
33 in two studies; and escitalopram, with an incidence of 2.1 ADR/n in one study. From the 268
34
35 studies analyzed, 6.7% (n = 18) of them reported zero ADRs, while 84.3% of them (n = 226)
36
37 reported less than one ADR/n.
38
39

40
41 The frequency of ADRs had no statistically significant difference when comparing test vs.
42
43 reference formulations ($p = 0.257$; $df = 266$).
44
45
46
47
48

49 **DISCUSSION** 50

51
52 Based on ACL research center's experience in the analyzed years, the trend in generic drug
53
54 development and testing in Mexico was confirmed to be consistent with the national health
55
56
57
58
59
60

1
2
3 problems in Mexico, according to death causes and Years Lived with Disability (YLD) due to
4 some disease (IHME, 2023), before COVID-19 appearance in early March 2020 in Mexico. An
5 increasing trend, not adjusted by age, has been faced in the last decade in depression and
6 Alzheimer's disease (neurological disorders), ischemic heart disease, and stroke (cardiovascular
7 diseases), as well as in the number of HIV and other viral infections (infectious/antiviral category).
8 Only in these three therapeutic areas (neurology, cardiovascular and infectious diseases), 57.1%
9 of the products tested for bioequivalence with generic approval intention in the pharmaceutical
10 market in this clinical research center is comprised.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 Regarding the BCS of drugs in solid oral dosage forms, drugs in classes I and III had a higher
23 number of bioequivalent results in these clinical trials analyzed, confirming the fact that the
24 solubility of active ingredients is a critical physicochemical characteristic for generic drug
25 development¹⁹. Moreover, if the drug is known to be highly soluble, classes I and III, the
26 bioequivalence might be assessed only with an *in vitro* dissolution profile, with special
27 considerations. This waiver of the *in vivo* clinical trial (*biowaiver*) is acceptable only for lower
28 dose strengths once the highest one was confirmed to be bioequivalent with an *in vivo* trial, as
29 accepted by several regulations around the world²⁰. In another scenario, drugs in classes II and IV
30 can be more challenging to attain bioequivalence, confirmed in this analysis, since a limited
31 solubility and/or limited permeability is a major issue for the *in vivo* liberation, absorption, and
32 distribution.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 We confirmed in these analyses that not only the formulation and the drug's physicochemical
48 variables are relevant for the PK parameters and its variability, but also the pharmacogenomic
49 aspects are. CYP3A4-substrate drugs tend to exhibit a higher IaSV for C_{max} , whereas CYP2D6
50 substrates tend to have higher IeSV, which supports previous findings reported in studies with
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Japanese healthy volunteers⁷. Other metabolic enzymes, such as peptidases and other CYP450,
4 impact differently in the drug PK behavior, as evidenced in the PK elimination parameters in this
5 study.
6
7
8
9

10 The PK variability has been in the spotlight for years back since drug manufacturers are now
11 interested in providing this drug information on its labels¹. The main reason is that to achieve an
12 adequate personalized therapy, both the differences among individuals (*i.e.*, IeSV) and the within-
13 individual variation (IaSV) in PK parameters are relevant to be explored. These last might cause
14 important drug plasma concentration differences following the same exposures²², thus impacting
15 response on the same subject on different days, mainly in long-term treatments with different
16 generic formulations. This is critically important when assessing the interchangeability of
17 formulations in the real market, especially with narrow therapeutic index (NTI) drugs, such as
18 warfarin, lithium, or phenytoin.
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 IaSV data can be derived from controlled randomized clinical trials, such as phase I or
32 bioequivalence studies. Even though the fully replicated 4-period crossover trials are the best
33 source for the calculation of the PK IaSV for an active ingredient²¹, the 2x2 crossover designs
34 provide trustworthy data for a good approximation of these variability values. These estimates are
35 useful for further study designs and sample size calculations for bioequivalence trials, pursuing
36 optimum, efficient, and better clinical trial designs, as far as reliable values of the IaSV are
37 available for a specific active ingredient, pharmaceutical form, study conditions, and ethnicity to
38 evaluate, linked to the genetics.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 Furthermore, as reported in this study, one out of three tested drugs were classified as HVD for
51 C_{max} . Drugs considered as HVD¹² are challenging for their bioequivalence testing, so the trial needs
52 to be planned accordingly, with extensive supporting evidence on its high variability²³. Some of
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 these caveats include the need for big sample sizes, low statistical power (< 80%) in the results,
4 and/or high risk of exceeding the bioequivalence boundaries of 80% - 125% due to the high
5 variability. Given that, the bioequivalence acceptance limits might be widened, justifying direct
6 expansion of the limits to 75-133%, or through partial or full replicated trial designs conduction,
7 with additional RSABE statistical requirements^{12,15}.

8
9
10 Nevertheless, some drugs might be inconsistently considered as HVD, as in some clinical trials
11 their within-subject PK variability can be estimated below 30%. Factors influencing the difference
12 in variability calculation can range from the characteristics of the formulation, an extensive first-
13 pass drug metabolism, metabolic differences among ethnicities, and even the design and
14 conduction of the *in vivo* bioequivalence trial itself¹, such as blood sampling times, fasting/fed
15 conditions, selection of the study population, and sample size, among others.

16
17
18 Our analysis showed that C_{max} had the highest variabilities (both IaSV and IeSV), compared to the
19 AUCs parameters, as it is well-known and documented³. As an informative compendium of PK
20 variabilities for over a hundred drugs in Mexican healthy volunteers, Supplemental Tables S1 and
21 S2 provide these data and additional trial design suggestions. These tables are considered a source
22 of reliable information for clinical researchers in this field, supporting pharmacological evidence
23 in a genetically diverse ethnicity, such as the Mexican population.

24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 **CONCLUSIONS**

47
48 The data provided in this work, based on randomized controlled clinical trials, is reliable evidence
49 that aims to back up adequate bioequivalence trial design for future studies, with a calculation of
50 appropriate sample sizes based on internationally accepted statistical requirements. Finally, from
51 the bedside perspective, this data - together with relevant clinically annotated genetic variations

1
2
3 and drug pharmacological information - could support clinicians' decision-making for improving
4
5 the usage of medication in the real-world setting.
6
7
8
9

10 **ACKNOWLEDGMENTS**

11
12
13 C.A.D.T. thanks the Mexico National Council of Humanities, Science and Technology
14
15 (CONAHCyT) for the scholarship granted (CVU No. 439303) to complete the doctoral degree in
16
17 Experimental Clinical Research in Health (Clinical Pharmacology), from the Medical,
18
19 Odontological, and Health Sciences Postgraduate Program (PMDCMOS), National Autonomous
20
21 University of Mexico (UNAM).
22
23
24

25 The authors greatly appreciate the collaboration of the clinical, bioanalytical, and management
26
27 staff at Axis Clinical Latina for the conduction and analysis of the bioequivalence study compiled
28
29 in this article.
30
31

32 The authors also thank Aurora de la Peña-Díaz for her contributions and comments to this project,
33
34 and José Antonio Huertas Miranda for the critical review of the final version of this paper.
35
36
37
38
39

40 **CONFLICT OF INTERESTS**

41
42 The sponsors of the bioequivalence trials compiled in this work had no intervention in the
43
44 conduction of the studies, as well as they had no contribution on the data collection, analysis,
45
46 interpretation, or writing of this paper.
47
48
49

50 The authors declare no conflicts of interest related to the analysis and interpretation of the results
51
52 of this project.
53
54
55
56
57
58
59
60

FUNDING

C.A.D.T. received a doctoral scholarship (CVU No. 439303) from the Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) to complete the doctoral degree in Experimental Clinical Research in Health (Clinical Pharmacology), from the Medical, Odontological, and Health Sciences Postgraduate Program (PMDCMOS), National Autonomous University of Mexico (UNAM).

Part of this study was funded by CONACYT-FOSSIS No.272795 granted to V.G.C.

REFERENCES

1. Van Peer A. Variability and impact on design of bioequivalence studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(3):146-153.
2. Zhang H, Li Q, Zhu X, et al. Association of Variability and Pharmacogenomics With Bioequivalence of Gefitinib in Healthy Male Subjects. *Front Pharmacol*. 2018;9:849.
3. Ramirez E, Laosa O, Guerra P, et al. Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to the Biopharmaceutic Classification System. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;70(5):694-702.
4. Chung I, Oh J, Lee S, Jang IJ, Lee Y, Chung JY. Retraction and Republication: A post hoc analysis of intra-subject coefficients of variation in pharmacokinetic measures to calculate optimal sample sizes for bioequivalence studies. *Transl Clin Pharmacol*. 2018;26(1):48.
5. Grimstein M, Yang Y, Zhang X, et al. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Regulatory Science: An Update From the U.S. Food and Drug Administration's Office of Clinical Pharmacology. *J Pharm Sci*. 2019;108(1):21-25.
6. Hellriegel ET, Bjornsson TD, Hauck WW. Interpatient variability in bioavailability is related to the extent of absorption: implications for bioavailability and bioequivalence studies. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60(6):601-607.
7. Sugihara M, Takeuchi S, Sugita M, Higaki K, Kataoka M, Yamashita S. Analysis of Intra- and Intersubject Variability in Oral Drug Absorption in Human Bioequivalence Studies of 113 Generic Products. *Mol Pharm*. 2015;12(12):4405-4413.
8. Hammami MM, De Padua SJS, Hussein R, et al. Generic-reference and generic-generic bioequivalence of forty-two, randomly-selected, on-market generic products of fourteen

- 1
2
3 immediate-release oral drugs. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2017;18(1):78.
4
5
6 9. Chow SC, Liu JP. *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. 3rd
7 ed. CRC Press; 2008:760.
8
9 10. Julious SA. Tutorial in biostatistics. Sample sizes for clinical trials with Normal data. *Stat*
10 *Med*. 2004;23:1921-1986.
11
12 11. Hauschke D, Steinijans VW, Diletti E, Burke M. Sample size determination for
13 bioequivalence assessment using a multiplicative model. *J Pharmacokinet Biopharm*.
14 1992;20(5):557-561.
15
16 12. Endrenyi L, Tothfalusi L. Bioequivalence for highly variable drugs: regulatory agreements,
17 disagreements, and harmonization. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2019;46(2):117-126.
18
19 13. Ocaña J, Muñoz J. Controlling type I error in the reference-scaled bioequivalence
20 evaluation of highly variable drugs. *Pharm Stat*. Published online June 12, 2019.
21
22 14. Ahmed SE. A Pooling Methodology for Coefficient of Variation. *Sankhyā: The Indian*
23 *Journal of Statistics, Series B (1960-2002)*. 1995;57(1):57-75.
24
25 15. Tothfalusi L, Endrenyi L. An Exact Procedure for the Evaluation of Reference-Scaled
26 Average Bioequivalence. *AAPS J*. 2016;18(2):476-489.
27
28 16. Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank
29 database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1074-D1082.
30
31 17. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, et al. Pharmacogenomics knowledge for
32 personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-417.
33
34 18. Shukla AK, Jhaj R, Misra S, Ahmed SN, Nanda M, Chaudhary D. Agreement between
35 WHO-UMC causality scale and the Naranjo algorithm for causality assessment of adverse
36 drug reactions. *J Family Med Prim Care*. 2021;10(9):3303-3308.
37
38 19. Bego M, Patel N, Cristofolletti R, Rostami-Hodjegan A. Proof of Concept in Assignment of
39 Within-Subject Variability During Virtual Bioequivalence Studies: Propagation of Intra-
40 Subject Variation in Gastrointestinal Physiology Using Physiologically Based
41 Pharmacokinetic Modeling. *AAPS J*. 2022;24(1):21.
42
43 20. Mishra V, Gupta U, Jain NK. Biowaiver: an alternative to in vivo pharmacokinetic
44 bioequivalence studies. *Pharmazie*. 2010;65(3):155-161.
45
46 21. Kang WH, Lee JY, Chae JW, et al. Population Pharmacokinetic Method to Predict Within-
47 Subject Variability Using Single-Period Clinical Data. *Pharmaceuticals* . 2021;14(2).
48
49 22. Lechat P, Kir F, Marquet P, Woillard JB. Within-subject pharmacokinetic variability has a
50 strong influence on individual exposure ratios in bioequivalence studies, hence on drug
51 formulation interchangeability. *Eur J Clin Pharmacol*. Published online September 22,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 2023.
4

- 5
6 23. Davit BM, Conner DP, Fabian-Fritsch B, et al. Highly variable drugs: observations from
7 bioequivalence data submitted to the FDA for new generic drug applications. *AAPS J.*
8 2008;10(1):148-156.
9

10 11 12 **PERTINENT REGULATORY SOURCES**

- 13 ● COFEPRIS. Consulta de Ensayos clínicos registrados ante COFEPRIS. Registro
14 Nacional de Estudios Clínicos (RNEC). Accessed 2019.
15 [16 http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.as](http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.asp)
17 [18 p](http://siipris03.cofepris.gob.mx/Resoluciones/Consultas/ConWebRegEnsayosClinicos.asp)
- 19 ● COFEPRIS. Información correspondiente a Terceros Autorizados publicada por la
20 Comisión de Autorización Sanitaria. Documentos Terceros Autorizados CAS. Published
21 July 12, 2023. Accessed July 29, 2023.
22 [23 https://www.gob.mx/cofepris/documentos/documentos-terceros-autorizados-cas](https://www.gob.mx/cofepris/documentos/documentos-terceros-autorizados-cas)
- 24 ● COFEPRIS. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que Establece Las Pruebas
25 Y Procedimientos Para Demostrar Que Un Medicamento Es Intercambiable. Requisitos a
26 Que Deben Sujetarse Los Terceros Autorizados Que Realicen Las Pruebas de
27 Intercambiabilidad. Requisitos Para Realizar Los Estudios de Biocomparabilidad.
28 Requisitos a Que Deben Sujetarse Los Terceros Autorizados, Centros de Investigación O
29 Instituciones Hospitalarias Que Realicen Las Pruebas de Biocomparabilidad. Diario
30 Oficial de la Federación; 2013. Accessed June 9, 2019.
31 [32 http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013)
- 33 ● CONBIOETICA (Comisión Nacional de Bioética). Acuerdo por el que se emiten las
34 Disposiciones Generales para la Integración y Funcionamiento de los Comités
35 Hospitalarios de Bioética y se establecen las unidades hospitalarias que deben contar con
36 ellos, de conformidad con los criterios establecidos por la Comisión Nacional de
37 Bioética. Diario Oficial de la Federación. Published October 31, 2012. Accessed July 29,
38 2023.
39 [40 https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5276106&fecha=31/10/2012#gsc.tab=](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5276106&fecha=31/10/2012#gsc.tab=0)
41 [42 0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5276106&fecha=31/10/2012#gsc.tab=0)
- 43 ● Food and Drugs Administration (FDA). Waiver of In Vivo Bioavailability and
44 Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a
45 Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry. U.S. Department of
46 Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Food
47 and Drug Administration; 2017.
- 48 ● ICH (International Council for Harmonisation). General Considerations for Clinical
49 Trials- E8. ICH; 1997.
- 50 ● ICH (International Council for Harmonisation). Guideline for Good Clinical Practice
51 E6(R1). ICH; 1996.

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Efficacy/E6/E6_R1_Guideline.pdf

- ICH (International Council for Harmonisation). International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use Guidelines. ICH. <https://www.ich.org/products/guidelines.html>
- WMA (World Medical Association). Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. The World Medical Association-WMA. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

CURATED DATABASES AND SOFTWARE USED

- Certara. Phoenix WinNonlin.; 2011-2018. <https://www.certara.com/software/pkpd-modeling-and-simulation-2/phoenix-winnonlin-2/>
- IBM. IBM Micromedex Clinical Knowledge Suite. IBM. <http://truenhealth.com/Products/Micromedex/Product-Suites/Clinical-Knowledge>
- PharmGKB. The Pharmacogenomics Knowledgebase. PharmaGKB. Published 2016. <https://www.pharmgkb.org/>
- IBM. IBM SPSS Statistics. <https://www.ibm.com/products/spss-statistics>
- Schütz H. Successfully Overcoming Sample Size Challenges in BE Studies. Presented at: Bioequivalence and Bioavailability; May 19, 2010; Ljubljana, Slovenia. <https://bebac.at/lectures/LJ2010-CD2.pdf>
- Labes D, Schutz H, Lang B. PowerTOST. Power and Sample Size Based on Two One-Sided T-Tests (TOST) for (Bio)Equivalence Studies. R; 2018. <http://github.com/Detlew/PowerTOST>
- Lee YJ. Bear (BE/BA for R); 2009. <http://pkpd.kmu.edu.tw/bear/>
- Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Global Burden of Disease (GBD). Global Burden of Disease (GBD). Published online 2017. Accessed 2019. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>

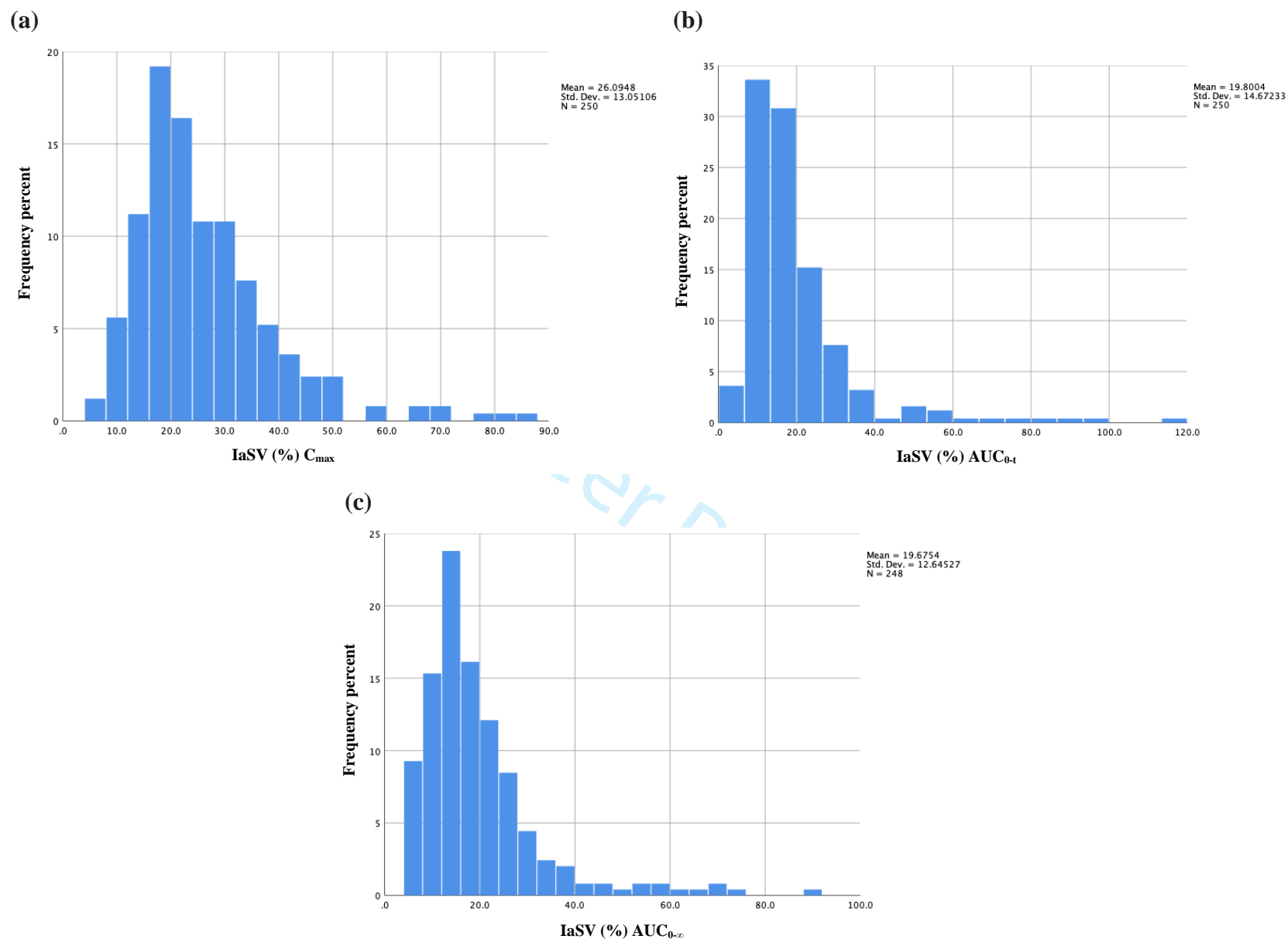


Figure 1. Intra-subject PK variability (IaSV) frequency distributions of the pharmacokinetic parameters of 123 different active ingredients: **(a)** C_{max} , **(b)** AUC_{0-t} , and **(c)** $AUC_{0-\infty}$. Analytes and/or metabolites could be represented several times given that some active ingredients were studied in more than one trial in this database.

Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*

Table S1. Pooled PK coefficients of variation (%)*, based on two or more bioequivalence studies for each active ingredient.

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|--|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Abacavir | 118 | 22.6 | 24.0 | 6.6 | 8.4 | 6.5 | 8.2 | 24 | |
| Alfuzosin (ER Tablet) | 73 | 24.9 | 42.3 | 24.8 | 42.1 | 24.2 | 40.9 | 28 | Fasting conditions. |
| Alfuzosin (ER Tablet) | 114 | 24.9 | 37.5 | 19.5 | 28.5 | 18.6 | 27.1 | 28 | Fed conditions. |
| Amoxicillin | 152 | 27.7 | 39.7 | 14.0 | 18.6 | 13.9 | 18.4 | 34 | |
| Anastrozole | 47 | 12.6 | 21.7 | 15.8 | 28.7 | 14.5 | 25.9 | 14 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Aripiprazole | 67 | 30 | 54.0 | 13.6 | 21.4 | 22.7 | 39.1 | 38 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Atazanavir (Capsule) | 140 | 73.4 | 119.4 | 66.6 | 107.2 | 58.8 | 93.4 | 80 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} , in fed conditions. |
| Atorvastatin | 107 | 35.8 | 57.5 | 22.1 | 33.3 | 20.3 | 30.1 | 30 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance limits for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Betahistine | 48 | 14.4 | 25.4 | 8.6 | 13.5 | 8.6 | 13.6 | 12 | |
| Bicalutamide ^d | 99 | 19.3 | 29.1 | 19.7 | 29.7 | N/A | N/A | 34 | Parallel study with male subjects and truncated PK sampling till 72 h. |
| Bisoprolol | 46 | 10.8 | 18.1 | 9.3 | 15.2 | 8.8 | 14.2 | 8 | |
| Capecitabine | 74 | 49.4 | 93.4 | 16.7 | 26.5 | 18.8 | 30.4 | 96 | Fasting and fed conditions with cancer patients. |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Carvedilol | 59 | 37.1 | 72.9 | 19.2 | 33.4 | 18.7 | 32.3 | 56 | |
| Cilostazol | 63 | 23.6 | 41.6 | 14.0 | 22.5 | 13.9 | 22.4 | 26 | |
| Cinitapride | 31 | 33.4 | 88.6 | 29.0 | 74.1 | 23.4 | 56.2 | 46 | |
| Ciprofloxacin | 47 | 14.2 | 25.1 | 12.1 | 20.7 | 11.6 | 19.7 | 12 | |
| Citicoline | 50 | 22.4 | 42.6 | 30.3 | 61.3 | 37.4 | 78.9 | 58 | Based on the quantification of the endogenous metabolite uridine with baseline circadian correction. |
| Clavulanic acid | 152 | 49.1 | 74.7 | 47.5 | 72.1 | 47.2 | 71.6 | 90 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance limits for C _{max} |
| | | | | | | | | 46 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Darunavir | 66 | 20.0 | 33.7 | 21.5 | 36.8 | 24.7 | 43.3 | 28 | Fasting and fed conditions. |

Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|--|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|---|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Desvenlafaxine (ER Tablet) | 57 | 14.2 | 23.6 | 14.1 | 23.5 | 14.0 | 23.2 | 12 | Based on the quantification of the parent drug desvenlafaxine in fasting/fed conditions. |
| Duloxetine (Capsule) | 73 | 20.8 | 34.3 | 16.7 | 26.7 | 17.2 | 27.4 | 20 | |
| Dutasteride (Capsule) | 146 | 20.6 | 28.7 | 13.9 | 18.6 | 20.7 | 28.9 | 20 | Truncated PK sampling till 72 h, in fasting/fed conditions. |
| Efavirenz | 161 | 24.2 | 33.7 | 14.1 | 18.7 | 17.5 | 23.6 | 26 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Emtricitabine | 63 | 21.3 | 36.9 | 10.5 | 16.0 | 8.9 | 13.3 | 22 | Fed conditions. |
| Erlotinib | 132 | 33.2 | 50.0 | 21.1 | 30.2 | 22.0 | 31.6 | 28 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Escitalopram | 47 | 12.3 | 21.1 | 8.7 | 13.8 | 9.4 | 15.3 | 10 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Etoricoxib | 219 | 20.1 | 26.3 | 13.1 | 16.5 | 12.8 | 16.1 | 20 | |
| Ezetimibe | 439 | 31.9 | 39.3 | 21.0 | 25.3 | 29.4 | 36.2 | 44 | |
| Finasteride | 69 | 17.8 | 29.0 | 14.4 | 22.8 | 14.8 | 23.4 | 16 | |
| Fingolimod ^d (Capsule) | 94 | 19.4 | 29.6 | 19.1 | 29.1 | N/A | N/A | 34 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |
| Fluoxetine (Capsule) | 48 | 14.4 | 25.4 | 10.8 | 17.9 | 10.4 | 17.2 | 12 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Gefitinib | 131 | 39.1 | 60.1 | 25.1 | 36.7 | 25.8 | 37.8 | 64 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| | | | | | | | | 36 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Hydrochlorothiazide | 152 | 19.7 | 27.2 | 14.8 | 19.8 | 13.9 | 18.6 | 18 | |
| Imatinib | 291 | 16.8 | 20.8 | 18.5 | 23.1 | 16.7 | 20.7 | 18 | Fed conditions. |
| Lamivudine | 316 | 21.5 | 26.8 | 13.3 | 16.1 | 12.9 | 15.5 | 22 | |
| Letrozole | 59 | 20.3 | 35.6 | 12.0 | 19.1 | 12.7 | 20.4 | 20 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Levetiracetam | 42 | 18.2 | 35.6 | 6.3 | 9.7 | 8.8 | 14.7 | 16 | |
| Memantine | 100 | 7.7 | 10.2 | 10.8 | 15.0 | 13.8 | 19.9 | 8 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Modafinil | 38 | 10.1 | 18.0 | 9.5 | 16.5 | 7.7 | 12.9 | 8 | |
| Nevirapine | 51 | 19.0 | 34.6 | 16.6 | 29.5 | 21.5 | 40.3 | 22 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Olanzapine | 71 | 17.7 | 28.6 | 23.8 | 40.4 | 18.7 | 30.6 | 26 | |

Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|--|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Oxycodone (ER Tablet) | 38 | 23.6 | 51.2 | 12.1 | 22.3 | 12.5 | 23.2 | 26 | Fasting and fed conditions. |
| Pantoprazole (ER Tablet) | 72 | 32.6 | 58.2 | 23.9 | 40.6 | 23.4 | 39.6 | 44 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | |
| Piracetam | 34 | 18.3 | 39.1 | 5.1 | 7.9 | 5.3 | 8.3 | 16 | |
| Pyridostigmine | 66 | 22.2 | 38.2 | 17.7 | 29.2 | 17.2 | 28.2 | 22 | |
| Pramipexole | 134 | 14.0 | 19.0 | 11.9 | 15.9 | 11.7 | 15.6 | 12 | Fasting conditions. |
| Pregabalin (Capsule) | 50 | 15.8 | 28.0 | 5.1 | 7.2 | 5.7 | 8.2 | 12 | |
| Quetiapine | 70 | 34.9 | 63.5 | 20.5 | 34.2 | 20.2 | 33.5 | 52 | |
| Ramipril | 53 | 26.4 | 50.8 | 16.5 | 28.9 | 16.2 | 28.3 | 30 | Based on the quantification of the parent drug ramipril. |
| Rosuvastatin | 114 | 22.6 | 33.7 | 19.7 | 28.8 | 19.7 | 28.8 | 24 | |
| Sertraline | 35 | 18.0 | 37.9 | 12.6 | 24.4 | 11.4 | 21.4 | 16 | |
| Simvastatin | 235 | 39.1 | 53.4 | 42.0 | 57.7 | 42.2 | 57.9 | 72 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| | | | | | | | | 36 | |
| Sulfamethoxazole | 44 | 11.1 | 19.2 | 6.4 | 9.8 | 5.8 | 8.7 | 8 | |
| Tadalafil | 85 | 17.4 | 26.8 | 16.2 | 24.7 | 18.1 | 28.0 | 16 | |
| Tamsulosin (Capsule) | 121 | 19.1 | 27.5 | 18.0 | 25.8 | 20.1 | 29.1 | 20 | Fasting and fed conditions. |
| Telmisartan | 140 | 40.4 | 61.5 | 21.5 | 30.5 | 24.1 | 34.6 | 66 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 38 | |
| | | | | | | | | 18 | |
| Tenofovir | 66 | 22.8 | 39.5 | 20.8 | 35.4 | 19.0 | 31.8 | 24 | Fasting conditions. |
| Tenofovir | 124 | 22.0 | 32.1 | 14.8 | 20.5 | 13.3 | 18.3 | 22 | Fed conditions. |
| Tolterodine L-tartrate | 96 | 38.0 | 63.2 | 25.5 | 40.1 | 23.8 | 37.1 | 60 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 34 | |
| | | | | | | | | 18 | |
| Trifluoperazine | 54 | 22.6 | 41.9 | 16.3 | 28.4 | 15.5 | 26.7 | 24 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |

Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*

| Drug (Formulation) ^a | df | C _{max} | | AUC _{0-t} | | AUC _{0-∞} | | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|--------------------------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--|---|
| | | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | Pooled ISV | 80% upper ISV limit | | |
| Trimethoprim | 44 | 15.6 | 28.9 | 8.9 | 14.5 | 8.3 | 13.5 | 12 | |
| Valacyclovir | 99 | 32.4 | 52.4 | 14.5 | 21.0 | 14.8 | 21.6 | 44 | Based on the quantification of prodrug valacyclovir. |
| | 72 | 17.6 | 28.3 | 13.3 | 20.5 | 12.7 | 19.4 | 16 | Based on the quantification of the main active metabolite acyclovir. |
| Valsartan | 92 | 41.5 | 70.9 | 35.0 | 58.4 | 33.3 | 55.2 | 70 | |
| | | | | | | | | 52 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 26 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Venlafaxine (ER Capsule) | 65 | 16.5 | 27.1 | 15.3 | 24.8 | 13.5 | 21.4 | 14 | Fasting conditions. |
| Vildagliptin | 72 | 19.6 | 32.2 | 8.2 | 11.7 | 8.1 | 11.6 | 18 | |
| Zidovudine | 222 | 35.8 | 49.0 | 13.7 | 17.3 | 13.5 | 17.0 | 54 | |
| | | | | | | | | 30 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Zolmitriptan (Dispersible Tablet) | 47 | 22.2 | 43.1 | 17.7 | 32.7 | 16.9 | 31.0 | 22 | Female subjects. |

ABEL: Average Bioequivalence with Expanding Limits

df: Degrees of freedom (for the pooled ISV estimation based on two or more bioequivalence study results)

ER: Extended release

N/A: Not Applicable

*Intra-subject PK variability (IaSV) is reported for all drugs unless it is stated that another variability value is reported instead.

^a Pharmaceutical dosage form is tablet unless a different form is indicated in parenthesis.

^b Calculated with the statistical assumptions described in *Methods* section. It is strongly recommended to add to this minimal sample size a sufficient number of additional subjects according to the subjects' elimination and drop-out rate, based on the expected incidence of adverse drug reactions to the drug, and experience of the clinical research center on participant decision to abandon the clinical trial and any other protocol elimination criteria.

^c 2 x 2 crossover design in both male and female healthy volunteers in fasting conditions, unless any other design condition is commented.

^d Inter-subject PK variability (IeSV) calculated from a crossover trial, or total variability from a parallel study.

Table S2. PK coefficient of variation (%)^{*} for drugs, based on a single bioequivalence study for each active ingredient.

| Drug (Formulation) ^a | C _{max} ISV (%) | AUC _{0-t} ISV (%) | AUC _{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|--|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---|
| Abiraterone | 49.9 | 37.0 | 34.1 | 58 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 30 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Azithromycin | 30.5 | 18.6 | 19.7 | 40 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Bosentan | 46.3 | 29.8 | 28.6 | 48 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Celecoxib (Capsule) | 36.0 | 17.3 | 28.5 | 36 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} , with male subjects. |
| | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Cinacalcet | 38.4 | 30.8 | 28.1 | 42 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} , in fed conditions. |
| | | | | 22 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Cyclosporine (Capsule) | 17.1 | 15.8 | 16.5 | 14 | |
| Deferasirox (Dispersible tablet) | 16.8 | 12.1 | 11.7 | 14 | |
| Donepezil | 16.2 | 17.4 | 14.4 | 16 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Emtricitabine | 14.6 | 20.5 | 20.7 | 20 | Fasting conditions. |
| Entecavir ^d | 22.5 | 20.6 | 28.0 | 68 | Parallel study. |
| Exemestane | 24.4 | 15.0 | 14.5 | 28 | |
| Fexofenadine | 34.1 | 26.3 | 25.8 | 50 | |
| Fingolimod | 6.4 | 11.6 | N/A | 8 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Flunarizine | 25.7 | 18.5 | 18.4 | 30 | |
| Glimepiride | 21.7 | 11.8 | 13.0 | 22 | |
| Ibuprofen (Soft gelatin capsule) | 28.9 | 8.6 | 7.8 | 36 | |
| Irbesartan | 16.9 | 15.1 | 15.6 | 14 | |
| Ivabradine | 20.6 | 12.0 | 10.9 | 20 | Fed conditions. |
| Leflunomide ^d (Coated tablet) | 21.4 | 22.6 | N/A | 46 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |
| Levofloxacin | 19.6 | 4.7 | 5.2 | 18 | |

Díaz-Tufinio, CA, *et al.*

2023.

Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.

| Drug (Formulation) ^a | C _{max} ISV (%) | AUC _{0-t} ISV (%) | AUC _{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|----------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---|
| Lopinavir | 29.7 | 27.3 | 27.2 | 38 | |
| Lymecycline (Capsule) | 28.2 | 29.0 | 27.9 | 38 | Based on the quantification of the metabolite tetracycline. |
| Metformin | 24.2 | 15.6 | 15.1 | 26 | |
| Methotrexate | 25.6 | 24.7 | 23.6 | 30 | |
| Mirtazapine (Dispersible tablet) | 27.0 | 10.8 | 12.1 | 32 | |
| Montelukast | 31.6 | 27.1 | 26.4 | 44 | |
| Mycophenolate mofetil | 41.6 | 13.6 | 15.2 | 40 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 18 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Nitrofurantoin (Capsule) | 18.8 | 19.4 | 19.3 | 18 | |
| Olmesartan | 26.1 | 18.8 | 16.6 | 30 | |
| Ondansetron (Dispersible tablet) | 18.3 | 13.7 | 15.0 | 16 | |
| Paracetamol | 35.9 | 8.4 | 8.5 | 32 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Paroxetine | 28.1 | 31.0 | 31.3 | 42 | |
| Pramipexole | 10.5 | 11.0 | 10.7 | 8 | Fed conditions in male subjects. |
| Prazosin (Capsule) | 26.0 | 10.3 | 9.8 | 30 | |
| Ritonavir | 33.0 | 24.9 | 24.2 | 28 | 2x2 crossover with 75-133% acceptance criteria for C _{max} . |
| | | | | 20 | Full replicated crossover (2 sequences x 4 periods) with ABEL only for C _{max} . |
| Solifenacin ^d | 26.9 | 31.1 | N/A | 82 | Parallel study with truncated PK sampling till 72 h. |
| Tacrolimus (Capsule) | 28.8 | 38.2 | 37.5 | 60 | Truncated PK sampling till 72 h. |
| Tolterodine | 29.6 | 26.5 | 23.8 | 38 | Fasting conditions. |
| Valproate (ER tablet) | 19.6 | 26.4 | 25.7 | 32 | |
| Vardenafil | 29.0 | 20.7 | 19.8 | 38 | |

Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*

| Drug (Formulation) ^a | C _{max} ISV (%) | AUC _{0-t} ISV (%) | AUC _{0-∞} ISV (%) | Minimum sample size ^b | Comments on the study design ^c |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|--|
| Venlafaxine (ER capsule) | 21.4 | 13.2 | 12.9 | 22 | Based on the quantification of the parent drug, in fed conditions. |
| | 8.9 | 9.3 | 11.6 | 8 | Based on the quantification of the metabolite <i>O</i> -desmethyl venlafaxine. |

ABEL: Average Bioequivalence with Expanding Limits

ER: Extended release

N/A: Not Applicable

*Intra-subject PK variability (IaSV) is reported for all drugs unless it is stated that another variability value is reported instead.

^a Pharmaceutical dosage form is tablet unless a different form is indicated in parenthesis.

^b Calculated with the statistical assumptions described in the *Methods* section. It is strongly recommended to add to this minimal sample size a sufficient number of additional subjects according to the subjects' elimination and drop-out rate, based on the expected incidence of adverse drug reactions to the drug, and experience of the clinical research center on participant decision to abandon the clinical trial and any other protocol elimination criteria.

^c 2 x 2 crossover design in both male and female healthy volunteers in fasting conditions, unless any other design condition is commented.

^d Inter-subject PK variability (IeSV) calculated from a crossover trial, or total variability from a parallel study.

Díaz-Tufinio, CA, *et al.*

2023.

*Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.***Table S3.** Elimination phase PK parameters $t_{1/2}$, Cl_B , and estimated AUC ratio ($AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$) comparisons between test and reference products.

| Test vs. Reference comparison | Paired Differences | | | | | t | df | p-value (two-tailed) |
|-------------------------------|--------------------|------|------|--------|-------|-------|-----|----------------------|
| | Mean | SD | SEM | 95% CI | | | | |
| | | | | Lower | Upper | | | |
| $t_{1/2}$ | -0.5 | 16.7 | 1.0 | -2.6 | 1.5 | -0.51 | 258 | 0.61 |
| Cl_B | -3.8 | 43.1 | 2.7 | -9.1 | 1.5 | -1.41 | 256 | 0.16 |
| $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ | -0.1% | 4.1% | 0.3% | -0.6% | 0.4% | -0.47 | 257 | 0.64 |

*CI: Confidence Interval**df: Degrees of freedom**SD: Standard Deviation**SEM: Standard Error of the Mean*

Table S4. Drug PK variability (IaSV and IeSV) and elimination phase parameters comparisons by main metabolic enzyme.

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | p-value ^a |
|--|-----------------------|----------------|-----|-------------|------|----------------------|
| IaSV C_{max} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 1967 | 15 | 131 | 0.76 | 0.72 |
| | Within Groups | 40445 | 234 | 173 | | |
| | Total | 42412 | 249 | | | |
| IeSV C_{max} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 8862 | 15 | 591 | 2.21 | 0.01** |
| | Within Groups | 64298 | 241 | 267 | | |
| | Total | 73160 | 256 | | | |
| IaSV AUC_{0-t} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 3747 | 15 | 250 | 1.17 | 0.29 |
| | Within Groups | 49857 | 234 | 213 | | |
| | Total | 53604 | 249 | | | |
| IeSV AUC_{0-t} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 22854 | 15 | 1524 | 3.20 | 0.00*** |
| | Within Groups | 115746 | 243 | 476 | | |
| | Total | 138600 | 258 | | | |
| IaSV AUC_{0-∞} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 4505 | 15 | 300 | 1.99 | 0.02* |
| | Within Groups | 34991 | 232 | 151 | | |
| | Total | 39496 | 247 | | | |
| IeSV AUC_{0-∞} * Main metabolic enzyme | Between Groups | 25419 | 15 | 1695 | 4.03 | 0.00*** |
| | Within Groups | 101388 | 241 | 421 | | |
| | Total | 126807 | 256 | | | |
| t_{1/2} (Reference) * Main metabolic enzyme | Between Groups | 97147 | 15 | 6477 | 1.91 | 0.02* |
| | Within Groups | 833333 | 246 | 3388 | | |
| | Total | 930481 | 261 | | | |
| Cl_B (Reference) * Main metabolic enzyme | Between Groups | 1411970 | 15 | 94131 | 0.49 | 0.94 |
| | Within Groups | 46694599 | 244 | 191371 | | |
| | Total | 48106568 | 259 | | | |

^a **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001*df*: Degrees of freedom

Díaz-Tufinio, CA, *et al.*

2023.

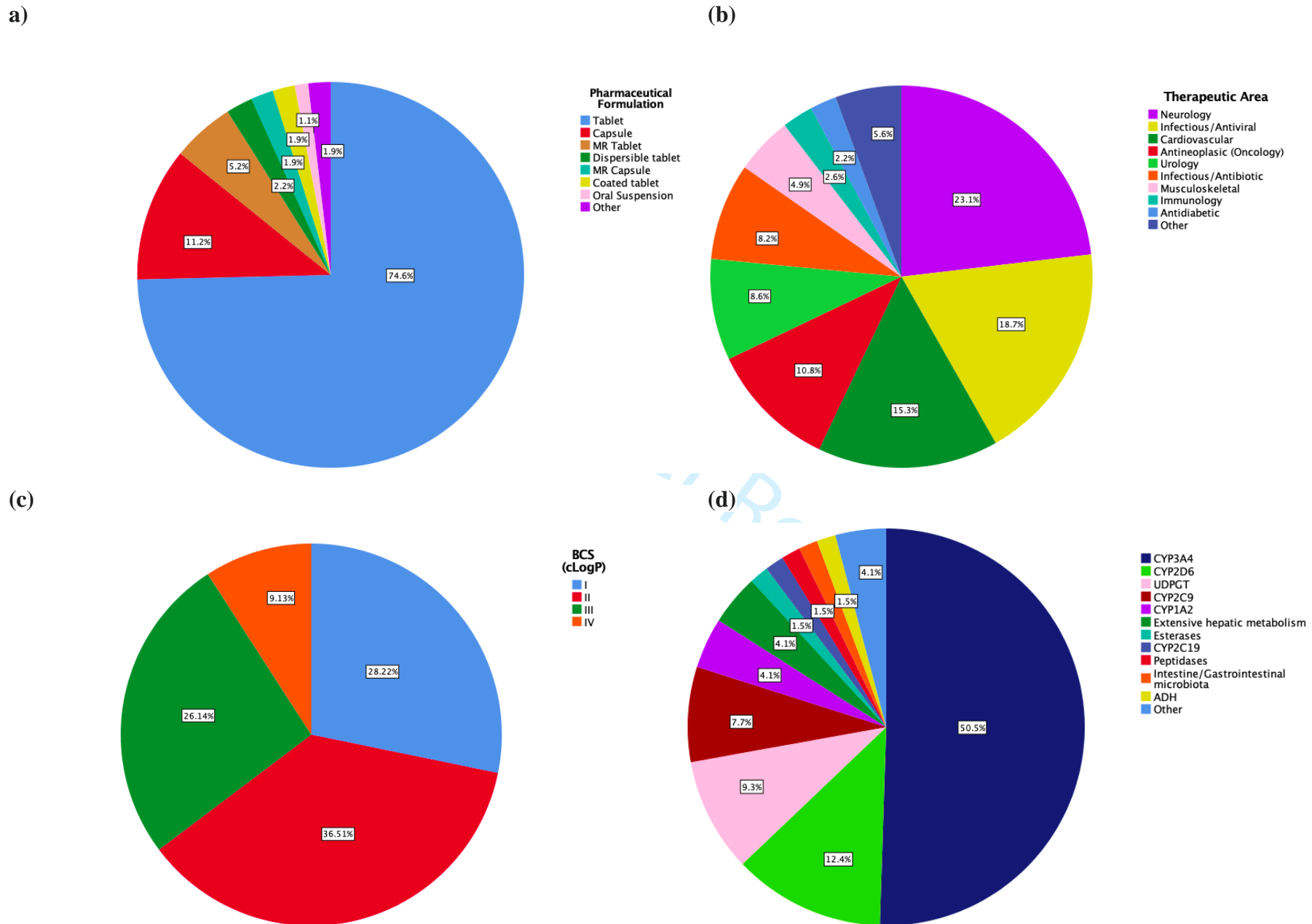
Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.

Figure S1. Formulation and drug characteristics of the bioequivalence trials assessed in this study: (a) Pharmaceutical formulations of the medicinal products administered. Category “Other” groups medications in oral, injectable suspensions, and inhaled dry-powder formulations. (MR = Modified release). (b) Therapeutic areas of the evaluated products. Category “Other” groups medicinal products related to Endocrinology & Gastrointestinal

1 Díaz-Tufinio, CA, *et al.* 2023. *Pharmacological parameters and pharmacokinetic variability derived from bioequivalence trials in Mexican population.*
2 diseases, Pain management, and Hematology areas. (c) Biopharmaceutical Classification System (BCS), based on cLogP permeability values. (d) Main
3 metabolic enzymes involved in the degradation of the drugs. Drugs reported not to suffer from biotransformations were excluded from this plot.
4 Category “Other” groups four CYPs (CYP3A5, CYP2B6, CYP2C8, and CYP4F2).
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

For Peer Review