



## CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Premio de la Academia de Ciencias de Cuba, 2019

### Aporte farmacométrico en el desarrollo de productos biotecnológicos cubanos

Leyanis Rodríguez Vera<sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0003-1688-7008>

Gledys Reynaldo Fernández<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1108-3679>

Eduardo M. Fernández-Sánchez<sup>1,†</sup>

Mayra Ramos Suzarte<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9058-3224>

Daniel Amaro<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7535-2321>

Roberto Menéndez<sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8917-1065>

Helena Colom<sup>4</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7259-0199>

Víctor Mangas-Sanjuan<sup>5,6</sup> <https://orcid.org/0000-0002-3388-5023>

Gilberto Castañeda<sup>7</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9149-885X>

Jorge Duconge<sup>8</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5955-3449>

Braulio Jiménez-Vélez<sup>9</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7878-769X>

Niurys de Castro Suárez<sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6762-2328>

Carmen Viada<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1604-3545>

Joaquín Solazábal<sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5451-8460>

María de los A. Bécquer<sup>10</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9106-9000>

<sup>1</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana, La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Centro de Inmunología Molecular (CIM), La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Centro de Neurociencias de Cuba, La Habana, Cuba

<sup>4</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Escuela de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

<sup>5</sup>Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología, Universidad de Valencia, Valencia, España

<sup>6</sup>Instituto Interuniversitario de Investigación de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia, España

<sup>7</sup>Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN, Ciudad de México, México

<sup>8</sup>Recinto de Ciencias Médicas de la Universidad de Puerto Rico, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Farmacia, San Juan, Puerto Rico

<sup>9</sup>Recinto de Ciencias Médicas de la Universidad de Puerto Rico, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, San Juan, Puerto Rico

<sup>10</sup>Centro para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB). Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana, La Habana, Cuba

\*Autor para correspondencia: [leyanis@ifal.uh.cu](mailto:leyanis@ifal.uh.cu)

#### RESUMEN

#### Palabras clave

eritropoyetinas pegiladas; farmacometría; farmacocinética; farmacodinámica; nimo-tuzumab; NONMEM

**Introducción.** La farmacometría es una disciplina científica vibrante que está conformada por el ciclo de excelencia: integración, innovación e impacto. Objetivo: Evaluar diferentes enfoques farmacométricos en tres productos biotecnológicos cubanos. **Métodos.** Se desarrolló un análisis farmacocinético poblacional del nimo-tuzumab en pacientes con cáncer de mama en estadio III, con escalado de dosis combinado con doxorubicina y ciclofosfamida. Se caracterizó la farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) de eritropoyetinas humanas



recombinantes (EPOhr) pegiladas ramificadas (EPOhr-PEG2-32kDa y EPOhr-PEG2-40kDa), y se comparó con los productos de referencia ior®EPOCIM y MIRCERA® en conejos Nueva Zelanda. Para el análisis de los datos se empleó la modelación de efectos mixtos no lineales (NONMEM®). **Resultados.** El mejor modelo obtenido para el nimotuzumab fue la aproximación cuasiestado estacionario del modelo completo de disposición mediado por el receptor. Este modelo permitió describir el comportamiento cinético lineal y no lineal del anticuerpo monoclonal. La dosis biológica óptima recomendada osciló entre 200 y 400 mg semanalmente. En el caso de las EPOhr se obtuvo un modelo semimecanístico PK/PD de tránsito celular. Las EPOhr-PEG2-32kDa y EPOhr-PEG2-40kDa mejoraron las propiedades PK y PD en comparación con ior®EPOCIM y MIRCERA®. La modelación con enfoque poblacional, por su carácter integrador y predictivo, fue de gran utilidad en la caracterización óptima de las propiedades PK y PD de los tres productos biotecnológicos cubanos. Además, tiene un notable impacto en la industria farmacéutica en ahorro económico y en tiempo, así como, en el ámbito regulador, en la toma de decisiones durante el proceso de investigación, desarrollo y posterior comercialización de nuevos productos.

## The Role of Pharmacometrics in the Development of Cuban Biotech-derived Drug Products

### ABSTRACT

#### Keywords

Erythropoietin-pegylated;  
Pharmacometrics; Pharmacokinetic;  
Pharmacodynamic;  
Nimotuzumab; NONMEM

**Introduction.** Pharmacometrics is a vibrant scientific discipline that involves a cycle of excellence: integration, innovation and impact. **Objectives:** To assess different pharmacometric approaches in three Cuban biotechnological products. **Methods.** A population pharmacokinetic analysis of nimotuzumab was performed in patients with stage III breast cancer. A set of doses was combined with doxorubicin and cyclophosphamide. Besides, a pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analysis of Recombinant Human Erythropoietin pegylated branched 32 kDa-PEG-rHuEPO and 40 kDa-PEG-rHuEPO was conducted and compared with reference products (ior®EPOCIM and MIRCERA®) in NZ rabbits. Data were analyzed using the nonlinear mixed-effect approach (NONMEM®). **Results.** The best model for nimotuzumab was the Quasi Steady State approximation of the full Target Mediated Drug Disposition model that best described the linear and nonlinear PK. The recommended optimal biological dose ranged between 200-400mg/week. On the other hand, a cell transit semi-mechanistic PK/PD model for characterizing EPOhr profiles was obtained. The development of new branched PEG-chains formulations of EPOhr improves its PK and PD properties, compared to that in commercially available formulations (i.e., ior®EPOCIM and MIRCERA®). Due to its integrative nature and predictive value, population modeling was very useful in the optimal characterization of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of these three Cuban biotech drug products. It had a significant impact on decision-making by both the national regulatory agency and local biopharmaceutical industry as to their research and development plans as well as the subsequent marketing strategies for these new products, with substantial economic and time savings.

## INTRODUCCIÓN

En la última década, la farmacometría ha emergido en el mundo como una disciplina científica vibrante que se evidencia en la triada: integración, innovación e impacto. Esta triada conforma un ciclo de excelencia en el descubrimiento, desarrollo, investigación y aprobación de nuevos fármacos. Todo ello contribuye a potenciar y acelerar su desarrollo, expandiendo el espectro de evaluación desde la investigación

básica de la enfermedad hasta el mecanismo de acción de los fármacos para el uso racional de los medicamentos en el cuidado de los pacientes. <sup>(1)</sup>

Como parte del desarrollo de un nuevo producto farmacéutico se requiere de la realización de diferentes estudios en especies relevantes. En estos tipos de estudios, la farmacometría es utilizada para desarrollar modelos farmacocinéticos, farmacodinámicos, farmacocinética/farmacodinámica

(PK/PD), entre otros. Estos modelos farmacoestadísticos permiten caracterizar, comprender y predecir el comportamiento PK y PD de un medicamento, cuantificar la incertidumbre de la información sobre ese medicamento y racionalizar la toma de decisiones basada en datos durante el desarrollo de medicamentos y la farmacoterapia. El desarrollo y aplicación de modelos adecuados resulta de gran utilidad en el ámbito regulador, ya que contribuye notablemente en la toma de decisiones de relevancia dentro del desarrollo de un proyecto I + D de un nuevo producto, influyendo en el éxito durante el proceso de aprobación de solicitud de registro y posterior autorización de comercialización.<sup>(2, 3)</sup>

Por primera vez en Cuba se aplican los enfoques farmacométricos PK y PK/PD poblacionales en el desarrollo de productos biotecnológicos cubanos como el nimotuzumab y las eritropoyetinas humanas recombinantes (EPOhr) pegiladas (EPOhr-PEG2-32kDa y EPOhr-PEG2-40kDa). El objetivo general de esta investigación fue evaluar diferentes enfoques farmacométricos en productos biotecnológicos cubanos, y sus objetivos específicos, los siguientes: caracterizar la farmacocinética poblacional del esquema combinado nimotuzumab, doxorubicina y ciclofosfamida en pacientes con cáncer de mama localmente avanzado, y caracterizar la relación farmacocinética/farmacodinámica poblacional de las eritropoyetinas pegiladas ramificadas de 32 y 40 kDa en comparación con los productos de referencia ior®EPOCIM y MIRCERA®.

## MÉTODOS

### Caracterización del ensayo clínico del nimotuzumab

Se diseñó un ensayo clínico (EC) fase I, monocéntrico, abierto, no controlado, no aleatorizado, con escalado de dosis y administraciones múltiples del nimotuzumab, con número de registro público cubano de EC RPCEC00000057, que coincide con el número de registro de la OMS.<sup>(4)</sup> Este nuevo esquema terapéutico para el nimotuzumab incluyó un incremento en la cantidad de administraciones a diez. La primera administración de este anticuerpo monoclonal (AcM) se aplicó antes de la quimioterapia con el objetivo de que el efecto se iniciara sobre un tumor que expresa los receptores HER1 sin interferencias del efecto posterior de la terapia citostática, y de esta manera inducir un efecto máximo, así como también evaluar la PK del nimotuzumab en este tipo de pacientes y la terapia. Se seleccionó una muestra de 12 pacientes femeninas, cumpliendo con los correspondientes criterios de selección y de exclusión. Se utilizaron 3 pacientes en cada nivel de dosis de 50, 100, 200 y 400 mg para el AcM, según los diseños de escalado de dosis de Fibonacci modificado.

El estudio se condujo bajo los principios éticos de la declaración de Helsinki, con la aprobación del Comité de Ética

para la protección de sujetos humanos en ensayo clínico del Hospital Hermanos Ameijeiras (HHA) y el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos y Dispositivos Médicos (CECMED).

### Análisis farmacocinético poblacional del nimotuzumab

Las muestras sanguíneas se colectaron inmediatamente antes de comenzar y luego de finalizar la infusión los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 del tratamiento (ocasión 1-10). Las muestras adicionales se obtuvieron los días 1, 2, 4 y 6 después de la primera administración (ocasión 1) y los días 64, 69, 77, 83 y 89 después de comenzado el tratamiento, correspondiente a 1, 6, 14, 20 y 27 días después de la décima administración (ocasión 10). Las muestras se incubaron, se centrifugaron y se separó el sobrenadante (suero), el cual se dispensó en alícuotas de 50 µl y se congeló a -20 °C. Las concentraciones séricas del nimotuzumab se determinaron por un método de ELISA indirecto, previamente validado.

Se realizó un análisis simultáneo de todas las concentraciones séricas log-transformadas vs. tiempo para las cuatro dosis ensayadas.

### Características del estudio PK/PD de formulaciones de EPOhr

Las formulaciones experimentales de EPOhr-PEG2-32kDa y EPOhr-PEG2-40kDa fueron desarrolladas por el Centro de Inmunología Molecular (CIM), La Habana, Cuba. Las formulaciones comerciales ior®EPOCIM (concentración nominal de 10 000 UI/mL) y MIRCERA® (jeringas precargadas de 100 µg/0,3 mL) fueron proporcionadas por las firmas CIMAB S.A., y Hoffman-La Roche, respectivamente. Los lotes empleados en cada una de las formulaciones bajo estudio fueron liberados siguiendo los criterios de calidad establecidos por el CIM y acordes a la USP XXII.

Cada producto fue estudiado en conejos Nueva Zelanda (NZ) machos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales tenían su correspondiente certificado de salud y calidad. Los conejos se colocaron en jaulas individuales bajo condiciones controladas. El protocolo fue aprobado por el Comité de Cuidado y Uso Animal del Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CIEB) del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, cumpliendo con la Directiva de Cuidado de Animales de la Unión Europea<sup>(5)</sup> y las guías ARRIVE para la experimentación animal.<sup>(6)</sup>

Se formaron ocho grupos experimentales de cinco conejos cada uno, para un total de cuarenta animales. Cuatro grupos (I-IV) para el estudio farmacocinético y el resto (V-VIII)

para el estudio farmacodinámico. Al comienzo del estudio el peso de los animales estaba dentro del rango de 1,5 a 2,3 kg y la edad era de 24-28 semanas.

Para el diseño del estudio PK y PD se partió de concentraciones equivalentes de EPOhr y se administró vía bolus intravenoso de 10 µg/kg de ior@EPOCIM, MIRCERA®, EPOhr-PEG<sub>2</sub>-32kDa y EPOhr-PEG<sub>2</sub>-40kDa en la vena marginal izquierda de la oreja de cada animal de los grupos I y V, II y VI, III y VII, IV y VIII, respectivamente.

En el estudio PK las muestras sanguíneas fueron colectadas a diferentes tiempos 0, 0,5, 1, 3, 6, 8, 16, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 h, excepto para el grupo que se le administró ior@EPOCIM que fueron de 0, 0,5, 1, 3, 6, 8, 16, 24, 36 h. Todas las muestras séricas fueron procesadas y cuantificadas por el kit comercial EPO ELISA de la firma ROCHE.

En el estudio PD para los grupos tratados con ior@EPOCIM y MIRCERA® las muestras sanguíneas fueron colectadas a los tiempos 0, 3, 7, 10, 21, 36, 42 días y para los grupos tratados con EPOhr-PEG<sub>2</sub>-32 y EPOhr-PEG<sub>2</sub>-40 fueron colectadas a los tiempos 0, 0,04, 0,125, 0,25, 0,33, 0,66, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 21, 36, 42 días. Las muestras de sangre (1 mL) se colocaron en tubos Eppendorf que contenían 10 µL de EDTA (10 %) como anticoagulante. Las determinaciones de eritrocitos y hemoglobina se realizaron en un analizador hematológico automático PENTRA 120. Los reticulocitos se contaron manualmente de acuerdo con los estándares de laboratorio clínico del INOR y los informes de literatura.<sup>(7)</sup>

El análisis de los datos tanto para la caracterización PK del nimotuzumab como para la caracterización PK/PD de formulaciones de EPOhr se realizó sobre la base del enfoque poblacional mediante el programa NONMEM® versión 7,<sup>(8)</sup> utilizando el método de estimación condicional de primer orden con la opción interacción (FOCEI). También se usaron Xpose 4.0<sup>(9)</sup>, PsN 5.3<sup>(10)</sup>, R-package 3.0<sup>(11)</sup> y Phoenix 6.3<sup>(12)</sup> para guiar el modelado y los pasos de evaluación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

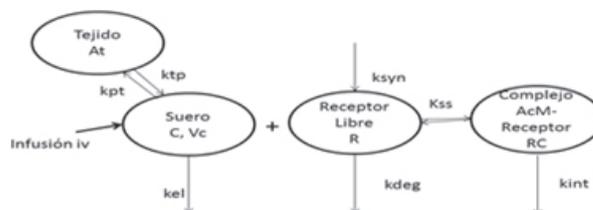
### Análisis farmacocinético poblacional del nimotuzumab

Se analizó un total de 443 concentraciones séricas, de las cuales 84 pertenecieron a la ocasión 1; 288 a las ocasiones 2-9 y 71 a la ocasión 10. Se realizó un análisis exploratorio inicial de los datos que sugirió un comportamiento no lineal en las dosis ensayadas del nimotuzumab (50- 400 mg).

La aproximación cuasiestado estacionario (QSS) del modelo de disposición mediado por el receptor (TMDD) fue retenida como el mejor modelo base. Este es un modelo más mecanístico, pues permitió estudiar el impacto de la unión

del AcM al receptor en la distribución y eliminación, o sea, en la disposición del nimotuzumab. Además, que la PK se vio afectada por la interacción del AcM con su receptor, responsable de la respuesta biológica, debido a que la cinética es un marcador auxiliar de la respuesta farmacológica.

En la figura 1 se muestra el modelo base que involucró dos compartimentos (central y periférico), el reciclado del receptor y la internalización/degradación del complejo AcM-receptor. El método no paramétrico *bootstrap* con reemplazo fue usado para evaluar la estabilidad del modelo final y construir los intervalos de confianza (IC) de los parámetros farmacocinéticos.



**Fig. 1.** Representación esquemática de la aproximación QSS del modelo de disposición mediado por el receptor. Incluye el enlazamiento del AcM-receptor en compartimento central, reciclaje del receptor y la internalización del complejo AcM-receptor.

Una vez obtenido el modelo base, se comenzó a incluir covariables con sentido fisiológico como el peso corporal, concentraciones de albúmina sérica, edad, raza, parámetros bioquímicos indicativos de la función hepática y estas fueron evaluadas sobre aclaramiento (CL), volumen de distribución central (Vc). Ninguna de estas covariables mostró efecto estadísticamente significativo sobre los parámetros PK, por lo que el modelo base fue retenido como el modelo final.

Los parámetros finales estimados por el modelo PK poblacional y el análisis *bootstrap* con sus intervalos de confianza son resumidos en la tabla 1. Como se muestra, los errores estándar de los parámetros no pudieron ser estimados debido a la matriz algorítmica singular. Esto se explica por la sobreparametrización, dada la complejidad del modelo no se pudo implementar la etapa de covarianza para estimar los errores estándar.

El volumen de distribución poblacional estimado para Vc y Vp fue de 1,43 L y 18,1 L, respectivamente. El volumen de distribución total en el estado estacionario (Vss = Vc+ Vp) fue 19,53 L, para un promedio de peso corporal de 65 kg, sugiere una distribución aparentemente limitada fuera del espacio vascular en el volumen extracelular. Este valor es alto en comparación con el del cetuximab (Vss = 5,26 L para pacientes de 60 kg)<sup>(13)</sup> y matuzumab (Vss = 5,57 L para pacientes de 71 kg),<sup>(14)</sup> que son aproximadamente iguales al volumen de plasma y

**Tabla 1.** Parámetros farmacocinéticos estimados del modelo final PK poblacional y del método *bootstrap*

Parámetros (unidades)	Estimados	Resultados promedios <i>bootstrap</i> (IC 95 %)
<i>Disposición PK parámetros</i>		
CL (L·h <sup>-1</sup> )	7,03x10 <sup>-4</sup>	4,3x10 <sup>-4</sup> (8,68x 10 <sup>-5</sup> -1,39x10 <sup>-3</sup> )
V <sub>c</sub> (L)	1,43	1,38 (1,09-1,81)
VP (L)	18,5	21,47 (7,91-209,10)
CL <sub>D</sub> (L·h <sup>-1</sup> )	3,22x10 <sup>-3</sup>	3,3x10 <sup>-3</sup> (2,1x10 <sup>-3</sup> -5,1x10 <sup>-3</sup> )
K <sub>ss</sub> (µg/mL)	6,96	7,40 (1.04-150.40)
k <sub>int</sub> (h <sup>-1</sup> )	1,48x10 <sup>-1</sup>	2,26x10 <sup>-1</sup> (1,7x10 <sup>-2</sup> -2,66)
k <sub>syn</sub> (µg/mL)·h <sup>-1</sup>	1,43	1,46 (7,1x10 <sup>-1</sup> - 3,29)
k <sub>deg</sub> (h <sup>-1</sup> )	5,50	7,33 (2,05-74,21)
t <sub>1/2β</sub> (h)	483,71	-
<i>Variabilidades interpacientes*</i>		
BPV <sub>CL</sub> (%)	11,31	10,82 ( 0,64-33,54 )
BPV <sub>Vc</sub> (%)	50,00	51,03 ( 19,70-75,61 )
BPV <sub>Kss</sub> (%)	87,86	83,42 ( 39-131 )
<i>Error residual</i>		
ER <sub>aditivo sobre log-datos</sub> (%)	48,00	47,98 (33,09-69,92)
<i>Shrinkage</i>		
η-shrinkage (%)	9,55	
ε-shrinkage (%)	3,53	

El error estándar de los parámetros no fue proporcionado por el programa debido a la matriz algorítmica singular. \*BPV: Variabilidad interpaciente. ER: Error residual. BPV y RE son expresados como coeficiente de variación (%). CL: aclaramiento. Vc y Vp: volumen de distribución central y periférico, respectivamente. V<sub>ss</sub>: Volumen de distribución en el estado estacionario Vc + Vp = 19,93 L. CL<sub>D</sub>: aclaramiento distribucional. Kss: concentración del fármaco en el cual la interacción con el receptor es la mitad de la máxima o constante en estado estacionario. Kint, ksyn y kdeg: constantes de velocidad de internalización, producción y degradación del receptor, respectivamente. IC: intervalo de confianza.

consistentes con el comportamiento de IgG endógenas y de otros AcM terapéuticos.<sup>(15)</sup>

La Kss (que es un valor de concentración que caracteriza el 50 % del enlazamiento al receptor en el estado estacionario) fue estimada con un valor de 6,96 µg/mL, el cual fue superior a la constante de velocidad del equilibrio de disociación (Kd) encontrada en estudios *in vitro* para el nimotuzumab (1,5x10<sup>-4</sup> µg/mL).<sup>(16)</sup> La constante de disociación Kd = koff/kon es una medida de la afinidad entre el fármaco y el receptor en estudios *in vitro*. Sin embargo, el término Kss = Kd+ (kint/kon) es mucho más abarcador, pues incluye la constante de afinidad y la constante de velocidad de internalización del complejo y solo puede ser obtenida *in vivo*. En este estudio, se estimó

que el receptor tiene un rápido reciclado (Kdeg = 5,50 h<sup>-1</sup>, t1/2 = 7,56 min de tiempo de vida media) comparado a la escala del tiempo de otros procesos como el de internalización del complejo AcM-receptor (Kint = 0,148 h<sup>-1</sup>, t1/2 = 4,68 h) y el tiempo de vida media del nimotuzumab (483,71 h o 20,15 d). Este último fue consistente con lo reportado en la literatura para IgG1, IgG2 y IgG4 que es de 21d.<sup>(17-19)</sup>

La variabilidad interindividual estuvo asociada al CL, Vc y Kss con valores de 11,31 %, 50 % y 87,86 %, respectivamente. La variabilidad interocasión<sup>(20)</sup> no se pudo incluir en CL. Se obtuvo un valor de error residual de 48%. Los parámetros del modelo final generados del análisis *bootstrap* fueron, en muchos casos, similares al modelo desarrollado para las 12 pacientes.

El porcentaje de diferencia entre el modelo final y los datos promedios del análisis *bootstrap* fue por debajo del 17 % para todos los parámetros fijos (farmacocinética estructural) y de efectos aleatorios, con la excepción del CL (38,84 %), kdeg (33,27 %) y kint (52,63 %) en los cuales la precisión en la estimación fue baja. Todas las estimas del modelo final estuvieron dentro del intervalo de confianza (IC) del 95 % obtenido por el método *bootstrap*, por lo que la aproximación QSS del modelo TMDD se considera estable.

Los valores totales de CL del nimotuzumab (oscilaron desde 4,5x10<sup>-3</sup> L/h a 1,72x10<sup>-2</sup> L/h o equivalente desde 1,08x10<sup>-1</sup> L/d a 4,13x10<sup>-1</sup> L/d) fueron similares al CL de las IgG endógenas que es de 2,1x10<sup>-1</sup> L/d.<sup>(19)</sup> La capacidad predictiva del modelo fue evaluado a través de las técnicas chequeo visual predictivo corregido por la predicción y el chequeo predictivo posterior (PPC).

La simulación permitió predecir las concentraciones de nimotuzumab después del régimen de dosis repetido semanalmente de 50, 100, 200, 400 and 1200 mg de nimotuzumab y la escala de tiempo más extendida, correspondiente a la ocasión 10 en el estado estacionario, permitió apreciar mejor el comportamiento no lineal en este rango de dosis simulados. Se observó que a partir de la dosis de 200 mg se mantuvo ocupado el receptor (en un 50 %) durante todo el tratamiento. Valores medios de AUC y los correspondientes IC del 95 %, estimados de cada simulación fueron 6624 (767,8-17 581) µg/mL·h<sup>-1</sup>; 14121 (1685- 35 949) µg/mL·h<sup>-1</sup>; 30 685 (4017- 74732) µg/mL·h<sup>-1</sup>; 75296 (11351-167519) µg/mL·h<sup>-1</sup>; 316 633 (82 546-634 575) µg/mL·h<sup>-1</sup> para las dosis de 50, 100, 200, 400 y 1200 mg, respectivamente.

En la caracterización farmacocinética poblacional se propone el rango de dosis de 200-400 mg/semana como el rango de dosis óptima biológica porque hay una disminución en el aclaramiento total del monoclonal indicando saturación del receptor del factor de crecimiento epidérmico. La metodología ensayada permite diseñar un régimen de dosificación

del nimotuzumab para obtener la dosis óptima biológica, que integre todos los fenómenos farmacocinéticos y farmacodinámicos que conforman los mecanismos de distribución y eliminación, y preconice estadísticamente el comportamiento que ocurrirá en un número mayor de sujetos. Dicho resultado integral es un valioso aporte para incorporar a la carpeta del Registro Sanitario Internacional y de la comercialización del producto.

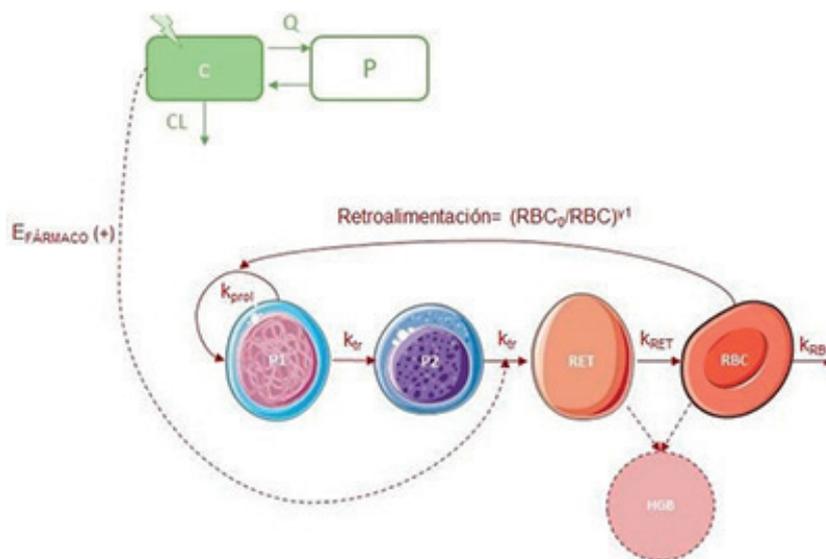
### Análisis del modelo farmacocinético/farmacodinámico poblacional de formulaciones de EPOhr

Se incluyó un número total de 266 mediciones de EPOhr en el análisis farmacocinético de 19 conejos. Para la caracterización farmacodinámica se incluyeron 799 observaciones de conteo de RET, RBC y niveles de HGB en cada tiempo en 20 conejos. Se caracterizó el curso temporal de las concentraciones de EPO en suero y luego se describieron los perfiles de tiempo de las tres lecturas de respuesta RET, RBC y HGB simultáneamente, utilizando el método de parámetros de farmacocinética poblacional <sup>(21)</sup> para vincular los perfiles PK con el modelo de respuesta obtenido.

En la figura 2 se muestra la representación esquemática del modelo final semimecanístico PK/PD de tránsito celular. Los parámetros relacionados con el sistema fisiológico típico que debe estimar el modelo son  $RET_0$ ,  $RBC_0$ ,  $F_{HGB}$ ,  $\gamma$ , y MTT. Este último es interpretado como el número de transiciones /ktr.

Los modelos de tránsito celular representan un proceso de maduración continuo de un compartimento al siguiente, que se rige por el tiempo medio de tránsito (MTT), el cual se modela como una constante de velocidad de primer orden, igual para todos los compartimentos.<sup>(22)</sup> Esta cadena de compartimentos permite capturar el retraso entre el efecto del fármaco sobre las etapas de las células precursoras y las células circulantes.<sup>(23)</sup>

El modelo incorpora dos proliferaciones (P1 y P2, de las cuales las observaciones no están disponibles), un RET, un RBC maduro y un compartimento de HGB. La proliferación de células P1 está representada por la constante de velocidad de primer orden  $k_{prol}$ . Después, las células maduran secuencialmente a través de los diferentes compartimentos (P2, RET y RBC) siguiendo los procesos de velocidad de primer orden gobernados por  $k_{tr}$ . La eliminación de RBC sigue un proceso de velocidad de primer orden también representado por el parámetro  $k_{RBC}$ . Se consideró un mecanismo de retroalimentación desencadenado por el cambio de los niveles de RBC con respecto a las condiciones al inicio ( $RBC_0$ ) y expresado como  $(RBC_0/RBC)^{\gamma}$  afectando sobre  $k_{prol}$ , donde  $\gamma$  modula la magnitud del mecanismo de retroalimentación. La fracción de HGB ( $F_{HGB}$ ) permite relacionar el perfil de tiempo continuo de HGB con la suma de las células RET y RBC. Los efectos del fármaco ( $E_{FARMACO}$ ) se incorporaron como una estimulación sobre la velocidad del proceso de maduración de P2 a RET, como una función lineal (SLP) de los niveles predichos de EPO en suero.



**Fig. 2.** Representación esquemática del modelo final semimecanístico PK/PD de tránsito celular correspondiente a etapas de proliferación y diferenciación celular de la eritropoyesis. La disposición de EPO se describió con un modelo de dos compartimentos y eliminación lineal. P1 y P2 representan a compartimentos precursoras. La proliferación de P1 está representado por una constante de velocidad de primer orden  $k_{prol}$ . Las células maduran secuencialmente a través de los diferentes compartimentos P2, RET y RBC, siguiendo procesos de velocidad de primer orden  $k_{tr}$ ,  $k_{RET}$  y  $k_{RBC}$ .  $(RBC_0/RBC)^{\gamma}$  representa el ciclo de retroalimentación considerado y  $E_{FARMACO}$  se corresponde con los efectos de los fármacos.

El proceso de disposición de las diferentes formulaciones de EPOhr se describió mejor con un modelo de dos compartimentos (central y periférico) y eliminación lineal, obteniéndose los respectivos parámetros farmacocinéticos finales estimados por PK poblacional como se resume en la tabla 2. Las diferencias en la disposición del fármaco para cada formulación se describieron mejor utilizando diferentes aclaramiento y volúmenes aparentes de distribución en el compartimento central (V1), pero igual aclaramiento intercompartimental (Q) y volumen aparente de distribución en el compartimento periférico (V2). Diferentes modelos estructurales fueron construidos asumiendo distintos parámetros para cada formulación CL y/o V1, Q y/o V2, pero ninguno de ellos proporcionó una reducción significativa del valor mínimo de función objetiva y en la gráfica de bondad de ajuste comparado con el modelo PK final seleccionado. En este la variabilidad interindividual se incluyó en CL y V1.

Se obtuvieron diferentes V1 para cada formulación, siendo mayores para los derivados de EPO-PEG lo que sugiere que estos últimos tuvieron mayor interiorización. Esto concuerda con trabajos previos de otros autores (24, 25). El valor de CL para EPOhr-PEG2-40 kDa, EPOhr-PEG2-32 kDa, ior®EPOCIM y MIRCERA® fue de  $4,34 \times 10^{-3}$  L/h;  $5,77 \times 10^{-3}$  L/h;  $1,02 \times 10^{-1}$

L/h y  $1,06 \times 10^{-2}$  L/h donde se evidencian diferencias significativas entre ellos, siendo mucho menor para los derivados pegilados. La variabilidad interindividual asociada a CL y V1 fue del 50 % y 60 % respectivamente y el valor de error residual fue del 20,5 %.

Todos los parámetros en el modelo se estimaron con adecuada precisión según lo indicado por los valores del error estándar relativo y los resultados del análisis *bootstrap* con sus intervalos de confianza reflejados también en la misma tabla 2. El modelo PK/PD integra los parámetros del sistema (MTT,  $RET_0$ ,  $RBC_0$ ,  $F_{HGB}$ ,  $\gamma$ ) y los relacionados con los derivados de EPOhr (SLP,  $\gamma^2$  y  $\gamma^3$ ) como se muestra en la tabla 3.

La maduración de la cascada hematopoyética se describió con el parámetro de MTT para todas las formulaciones y debido a problemas de convergencia este parámetro se estableció según al valor publicado en conejos de 80 d. (26) Las estimaciones de recuentos de células basales para  $RET_0$  (0,17 %) y  $RBC_0$  ( $5,91 \times 10^{12}$  L) en el modelo caracterizaron las condiciones iniciales de las células eritroides antes de la administración de la dosis y resultaron similares a otros valores publicados por otros autores (23, 27) que obtuvieron un valor de  $RBC_0$  de  $5,92 \times 10^{12}$  L en un modelo de tránsito celular. La HGB se predijo suponiendo una correlación lineal del 40 % ( $F_{HGB} = 0,4$ ) con la

**Tabla 2.** Parámetros farmacocinéticos estimados de la población de formulaciones de EPO después de la administración i.v. en conejos NZ

Parámetros (unidades)	Modelo PK final			Análisis <i>bootstrap</i> (n=1000)		
	Valor promedio	EER (%)	Shrinkage (%)	Mediana	EER (%)	IC 95 %
ER [CV (%)]	20,5	13	6	19,9	15	(14-26)
CL ior®EPOCIM (L/h)	$1,02 \times 10^{-1}$	8		$1,04 \times 10^{-1}$	9	$(0,5-1,5) \times 10^{-1}$
CL MIRCERA® (L/h)	$1,06 \times 10^{-2}$	15		$1,00 \times 10^{-2}$	14	$(0,6-1,6) \times 10^{-2}$
CL EPO- PEG-32 (L/h)	$5,77 \times 10^{-3}$	26		$5,4 \times 10^{-3}$	31	$(3,5-9,8) \times 10^{-3}$
CL EPO-PEG-40 (L/h)	$4,34 \times 10^{-3}$	28		$4,3 \times 10^{-3}$	35	$(3,0-7,1) \times 10^{-3}$
V1 ior®EPOCIM (L)	$1,94 \times 10^{-1}$	20		$1,9 \times 10^{-1}$	22	$(1,1-2,9) \times 10^{-1}$
V1 MIRCERA® (L)	$7,0 \times 10^{-1}$	12		$6,7 \times 10^{-1}$	15	$(4,9-9,1) \times 10^{-1}$
V1 EPO-PEG-32 (L)	$5,52 \times 10^{-1}$	29		$5,4 \times 10^{-1}$	2	$(3,3-7,7) \times 10^{-1}$
V1 EPO-PEG-40 (L)	$6,46 \times 10^{-1}$	34		$6,4 \times 10^{-1}$	38	$(4,2-11,9) \times 10^{-1}$
Q (L/h)	$2,24 \times 10^{-1}$	23		$2,2 \times 10^{-1}$	29	(0,13-0,33)
V2 (L)	$3,94 \times 10^{-1}$	16		$3,9 \times 10^{-1}$	17	(0,28-0,45)
VII CL [CV (%)]	50	18	2	49	19	(17-56)
CORR CL-V1 [CV (%)]	88,5	8		87	8	(65-97)
VII V1 [CV (%)]	60	12	3	48		(23-65)

ER: error residual; VII: variabilidad interindividual; EER: error estándar relativo; IC: intervalo de confianza; CV: coeficiente de variación; CL: aclaramiento; Vc y Vp: volumen de distribución central y periférico; Q: CL distributivo.

**Tabla 3.** Estimaciones farmacodinámicas poblacionales de formulaciones de EPO después de la administración i.v. en conejos NZ

Parámetros (unidades)	Modelo PD final		Análisis <i>bootstrap</i> (n=1000)		
	Valor promedio	Shrinkage (%)	Mediana	EER (%)	(IC 95 %)
ER RET [CV (%)]	23,3	5	23,9	13	(21,5-26,0)
ER RBC y HGB [CV (%)]	5,7		6,4	7	(5,7-7,0)
RET <sub>0</sub> (%)	0,17		1,73 x10 <sup>-1</sup>	16	(1,52-1,96) x10 <sup>-1</sup>
RBC <sub>0</sub> (10 <sup>12</sup> células/L)	5,91		6,00	11	(5,87-6,10)
MTT (d)	80		80	-	-
Y <sub>1</sub>	1		1	-	-
Y <sub>2</sub>	3,02		3,44	21	(2,11-3,99)
Y <sub>3</sub>	1,24		1,45	26	(0,91-2,25)
SLP <sub>ior®EPOCIM/MIRCERA®</sub> (L/UI)	1,06 x10 <sup>-3</sup>		1,08 x10 <sup>-3</sup>	36	(0,76-1,54) x10 <sup>-3</sup>
SLP <sub>PEG-EPO 32 y 40 kDa</sub> (L/UI)	1,45 x10 <sup>-3</sup>		1,43 x10 <sup>-3</sup>	11	(1,14-1,87) x10 <sup>-3</sup>
F <sub>HGB</sub>	0,4		0,4	12	(0,39-0,41)
K <sub>0</sub> (UI/L/h)	1,90 x10 <sup>-2</sup>		2,04 x10 <sup>-2</sup>	8	(0,58-3,10) x10 <sup>-2</sup>
T <sub>DUM</sub> (d)	1		1	-	-
VII RET <sub>0</sub> [CV (%)]	18	14	19	19	(14-26)
VII RBC <sub>0</sub> [CV (%)]	5	13	5	21	(2-7)
VII T <sub>DUM</sub> [CV (%)]	16	66	18	29	(11-29)
VII SLP [CV (%)]	30	15	29	13	(13-58)

T<sub>DUM</sub>: duración del proceso de orden cero; ER: error residual; VII: variabilidad interindividual; EER: error estándar relativo; IC: intervalo de confianza; CV: coeficiente de variación.

suma de RET y RBC, que muestra la interdependencia de los tres puntos finales farmacológicos y la posibilidad de derivar HGB en función de las observaciones de RET y RBC. La estimación del parámetro  $\gamma_1$  dio como resultado una diferencia no significativa de 1 ( $p > 0,01$ ). Se observó una disminución inicial en las observaciones de RBC y HGB, probablemente asociada a un muestreo excesivo y pérdida de sangre dentro de las primeras 24 h, y se describió con una eliminación de orden cero de  $1,90 \times 10^{-2}$  UI/L/h de RBC con una duración de 24 h. Diferentes factores de amplificación para ior®EPOCIM ( $\gamma_2 = 3,11$ ) y formulaciones de EPO-PEG ( $\gamma_3 = 1,34$ ) se incorporaron en el modelo, para caracterizar los niveles máximos de RET durante el proceso de transducción.

Los efectos eritropoyéticos a dosis única por vía i.v. de las formulaciones derivadas de EPOhr se caracterizaron de forma adecuada al aplicar un modelo de efectos lineales con un valor de  $1,6 \times 10^{-3}$  L/UI para las formulaciones comerciales (ior®EPOCIM y MIRCERA®) y  $1,45 \times 10^{-3}$  L/UI para las formulaciones pegiladas ramificadas. Este parámetro indica la relación entre el efecto eritropoyético con la concentración sérica de los diferentes derivados de EPOhr, lo que sugiere que las formula-

ciones pegiladas ramificadas al tener un mayor valor de SLP presentan un mayor efecto eritropoyético a un menor valor de concentración con respecto a ior®EPOCIM y MIRCERA®.

En relación con los efectos aleatorios se observó que la variabilidad interindividual estuvo asociada a RET<sub>0</sub>, RBC<sub>0</sub>, T<sub>DUM</sub> y SLP con valores del 18 %, 5 %, 16 % y 30 % respectivamente. Además, se obtuvieron dos valores de error residual 23 % para RET y 5,7 % para RBC y HGB, ya que las determinaciones se ejecutaron por diferentes técnicas hematológicas.

En las tablas 2 y 3 se reflejan los resultados del *bootstrap* (n = 1000) del modelo seleccionado. Todos los parámetros se estimaron con buena precisión, según lo indicado por los valores del EER y el análisis *bootstrap*. Todos los estimados del modelo estuvieron dentro del intervalo de confianza del 95 %, por lo que el modelo PK/PD de tránsito celular se considera estable.

Con el fin de evaluar el impacto de las diferentes formulaciones pegiladas en humanos, se realizó un escalado alométrico determinístico utilizando los parámetros PK poblacionales en conejos, escalados por el peso corporal. Se utilizaron los exponentes estándar 0,75 para el CL y 1 para el volumen

aparente de distribución. Los parámetros PK en humanos tuvieron un comportamiento similar al observado en conejos, pero con valores mayores ya que el humano metaboliza más lentamente que el conejo. En ambas especies se evidenció la disminución del CL y aumento del tiempo de vida media de las EPO-PEG donde MIRCERA® presentó valores de 115 h lo cual es consistente con Locatelli y col para estudios en voluntarios sanos que reportaron un  $t_{1/2}$  de 133 h. <sup>(28)</sup> En el caso de los productos ramificados EPOhr- 32 y 40 mostraron un  $t_{1/2}$  de 166 y 300 h respectivamente que equivale a 7 y 13 días.

## Conclusiones

El presente trabajo evaluó diferentes enfoques farmacométricos como la aproximación cuasiestado estacionario del modelo completo TMDD para el nimotuzumab y el modelo semimecánico PK/PD de tránsito celular para eritropoyetinas humanas recombinantes. Estos modelos permitieron describir de forma cuantitativa y mecánica la farmacocinética y farmacodinamia de estos productos biotecnológicos y proponer la dosis óptima biológica. La aplicación de estos modelos tiene gran impacto tanto en la industria farmacéutica como en el ámbito regulador ya que permiten economizar recursos y tiempo; así como contribuir en la toma de decisiones durante el proceso de investigación, desarrollo y posterior comercialización de futuros medicamentos. Este aporte farmacométrico en la caracterización de productos biotecnológicos cubanos crea una pauta para seguir desarrollando esta disciplina en nuestro país, desde la academia hasta el marco regulatorio.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los colaboradores: Dr.C. Jorge L. Soriano, Dra. Maite Lima, Dr. Noide Batista y Lic. Robin García del Departamento de Oncología del Hospital Hermanos Ameijeiras; MSc. Yamila Colom, Haydee Gil, Mabel Respass, Madelin Cruz y Yisel Martínez del Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología; MSc. Karine E. Rodríguez Fernández del Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM); MSc. Anabel Lavastida Linares del Centro de Inmunología Molecular; MSc. Juan C. Polo, MSc. Yisel Blanco Hernández, Lic. Betsy Fernández Sáez, Lic. Anaelys R. Maceo Sinabele del Instituto de Farmacia y Alimentos; DrC. Carlos O. Jacobo Cabral del CINVESTAV-IPN, México; Dr.C. Iñaki Trocóniz de la Universidad de Navarra, Pamplona, España; DrC. Marival Bermejo de la Universidad Miguel Hernández, Elche, España; Dr.C. Mirjam Trame del Instituto para las Investigaciones Biomédicas, Novartis, USA; Dr.C. Helgi Helene Jung Cook de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México; Concepción Péraire de la Universidad de Barcelona, España.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams P, Ette E, editors. Pharmacometrics: impacting drug development and Pharmacotherapy Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sns, Inc.; 2007.
2. Pfiste M, D'Argenio aD. The emerging scientific Discipline of pharmacometrics. *The Journal of clinical.* 2010;(50):6S.
3. Owen JS, Fiedler-Kelly J. Introduction to population pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis with nonlinear mixed effects models: John Wiley & Sons; 2014.
4. Advanced breast cancer with monoclonal antibody hR3 in combination with doxorubicin and cyclophosphamide. Phase I. [Internet]. 2008 [cited 2014 /9/18]. Available from: <http://rpcec.sld.cu/trials/RPCEC00000057-En>
5. Commission E. Caring for animals aiming for better science of the European Union. In: Directive 2010/63/EU on Protection of Animals Used for Scientific Purposes 2010.
6. McGrath J, Drummond G, McLachlan E, Kilkenny C, Wainwright C. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *British journal of pharmacology.* 2010;160(7):1573-6.
7. Bain BJ, Bates I, Laffan MA. Dacie and Lewis Practical Haematology: Elsevier Health Sciences; 2017.
8. Bauer R. Introduction to NONMEM 7.3. 0. NONMEM users guide. 2015.
9. Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* 1999;58:51-64.
10. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson EN. PsN-Toolkit- a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* 2005;79:241-57.
11. Team RC. R: A language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2013.
12. Pharsight. Phoenix 64 WinNonlin software version 6.3. St. Louis Missouri 2005-2012.
13. Dirks NL, Nolting A, Kovar A, Meibohm B. Population pharmacokinetics of cetuximab in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:267-78.
14. Kuester K, Kovar A, Lüpfer C, Brockhaus B, Kloft C. Refinement of the population pharmacokinetic model for the monoclonal antibody matuzumab: external model evaluation and simulations. *Clin Pharmacokinet.* 2009;48(7):477-87.
15. Fournier MN, Seidman AD, Schwartz MK, Ghani F, Thiel R, Norton L, et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2005;16:234-9.
16. Crombet T, Casaco A, Iznaga N. h-R3. *Drugs of the Future.* 2003;28:847-53.
17. Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, Rose RH, Chetty M. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet.* 2013;52:83-124.
18. Shi S. Biologics: an update and challenge of their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab.* 2014;15:271-90.
19. Dirks NL, Meibohm B. Population pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49:633-59.

20. Karlsson MO, Sheiner LB. The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1993;21:735-50.
21. Zhang L, Beal SL, Sheiner LB. Simultaneous vs. sequential analysis for population PK/PD data I: best-case performance. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2003;30(6):387-404.
22. Friberg LE, Henningsson A, Maas H, Nguyen L, Karlsson MO. Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *Journal of clinical oncology.* 2002;20(24):4713-21.
23. Budha NR, Kovar A, Meibohm B. Comparative performance of cell life span and cell transit models for describing erythropoietic drug effects. *The AAPS journal.* 2011;13(4):650-61.
24. Jolling K, Ruixo JJP, Hemeryck A, Piotrovskij V, Greway T. Population pharmacokinetic analysis of pegylated human erythropoietin in rats. *Journal of pharmaceutical sciences.* 2004;93(12):3027-38.
25. Allon M, Kleinman K, Walczyk M, Kaupke C, Messer-Mann L, Olson K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of darbepoetin alfa and epoetin in patients undergoing dialysis. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2002;72(5):546-55.
26. Woo S, Jusko WJ. Interspecies comparisons of pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin. *Drug Metabolism and Disposition.* 2007;35(9):1672-8.
27. Ait-Oudhia S, Scherrmann J-M, Krzyzanski W. Simultaneous pharmacokinetics/pharmacodynamics modeling of recombinant human erythropoietin upon multiple intravenous dosing in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2010a;334(3):897-910.
28. Locatelli F, Reigner B. CERA: pharmacodynamics, pharmacokinetics and efficacy in patients with chronic kidney disease. *Expert opinion on investigational drugs.* 2007;16(10):1649-61.
4. Adquisición de fondos: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte y Daniel Amaro.
5. Investigación: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte, Daniel Amaro, Helena Colom, Víctor Mangas, Joaquín Solazábal, María de los A. Bécquer y Niurys de Castro Suárez.
6. Metodología: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte, Daniel Amaro, Roberto Menéndez, Helena Colom, Víctor Mangas, Jorge Duconge
7. Administración del proyecto: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte y Daniel Amaro.
8. Recursos: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte, Daniel Amaro, Helena Colom, Víctor Mangas, Gilberto Castañeda, Jorge Duconge y Braulio Jiménez
9. Software: ---
10. Supervisión: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte y Daniel Amaro.
11. Validación: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte, Daniel Amaro, Joaquín Solazábal, María de los A. Bécquer y Niurys de Castro Suárez
12. Visualización: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte y Daniel Amaro.
13. Redacción – borrador original: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Víctor Mangas, Helena Colom,
14. Redacción – revisión y edición: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte, Daniel Amaro, Roberto Menéndez, Helena Colom, Víctor Mangas, Gilberto Castañeda, Jorge Duconge, Braulio Jiménez, Joaquín Solazábal y Niurys de Castro Suárez.

Recibido: 9 de mayo de 2020

Aprobado: 30 de julio de 2020

**Conflictos de interés.** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

#### Contribución científica

1. Conceptualización: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Mayra Ramos Suzarte y Daniel Amaro.
2. Curación de datos: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández
3. Análisis formal: Leyanis Rodríguez Vera, Gledys Reynaldo Fernández, Eduardo M. Fernández-Sánchez, Carmen Viada, Víctor Mangas, Helena Colom, Jorge Duconge

**Financiación.** Estos estudios fueron financiados por la Red de Macro Universidades de América Latina y el Caribe, en una estancia predoctoral de Leyanis Rodríguez-Vera RMU/OBSV/021/2013 y de Gledys Reynaldo-Fernández CRAI/027-79/2016. Otras fuentes de financiamiento fueron el Proyecto ALMA MATER 2012 y los convenios institucionales UH-CIM y UH-INOR.

