



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

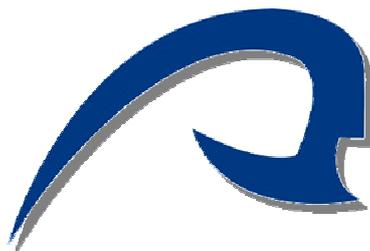
TESIS DOCTORAL

**ENSAYO CLÍNICO FASE I,
ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE
BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL**

M^ª LUISA SERRANO OLMEDA

LAS PALMAS DE GRAN CANARIA. SEPTIEMBRE 2015

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS



TESIS DOCTORAL

**ENSAYO CLÍNICO FASE I, ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE
BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL.**

M^a LUISA SERRANO OLMEDA

DIRECTORES:

Dr. D. José Antonio Ruiz Caballero.

Dra. D^a. Estrella M^a Brito Ojeda.

Dr. D. Ricardo Navarro García.

Las Palmas de Gran Canaria. Septiembre, 2015

**DON Juan Ramón Hernández Hernández
SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO DE. CIENCIAS
MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS
PALMAS DE GRAN CANARIA,**

CERTIFICA,

Que el Consejo de Doctores del Departamento en su sesión de fechade 2015 tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada

“ENSAYO CLINICO FASE I, ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL”, presentada por la doctoranda Dña: M^a LUISA SERRANO OLMEDA”, y dirigida por los doctores Don José Antonio Ruiz Caballero, Doña Estrella M^a Brito Ojeda, Don Ricardo Navarro García.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 73.2 del Reglamento de Estudios de Doctorado de esta Universidad, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a....de..... de dos mil quince.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

PROGRAMA DE DOCTORADO: Avances en Traumatología. Medicina del Deporte.
Cuidado de Heridas (Interdepartamental). (Bienio 2008/2010).

Título de la Tesis

**“ ENSAYO CLINICO FASE I, ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO
DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL ”.**

Tesis Doctoral presentada por D^a **M^a LUISA SERRANO OLMEDA.**

Dirigida por el Dr. D. **JOSÉ ANTONIO RUIZ CABALLERO.**

Dirigida por el Dra. D^a. **ESTRELLA M^a BRITO OJEDA.**

Dirigida por el Dr. D. **RICARDO NAVARRO GARCÍA.**

El/la Director/a,

El/la Director/a,

El/la Director/a,

El/la Doctorando/a,

(firma)

(firma)

(firma)

(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 30 de septiembre de 2015.

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS DOCTORAL

**ENSAYO CLÍNICO FASE I, ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE
BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL.**

M^a LUISA SERRANO OLMEDA

Estudio presentado para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria a través del programa de doctorado: *Avances en Traumatología. Medicina del Deporte Cuidados de Heridas (Interdepartamental)*. (Bienio 2008-2010).

DIRECTORES:

Dr. D. José Antonio Ruiz Caballero.

Dra. D^a. Estrella M^a Brito Ojeda.

Dr. D. Ricardo Navarro García.

Las Palmas de Gran Canaria. Septiembre, 2015

*A mis padres, mi hermana
y al motor de mi vida, Alberto, Mario y Lucía*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las Dras. Mónica Aguilar, M^a Ángeles Gálvez e Itziar De Pablo, investigadoras principal y colaboradoras del estudio, por haberme animado y ayudado a realizar este gran trabajo, acompañándome en este viaje hasta el final. También por ayudarme día a día a crecer profesional y personalmente transmitiéndome la ilusión, generosidad y tenacidad necesarias para conseguir que las grandes ideas puedan llevarse a cabo convertidas en grandes proyectos.

A mis directores de tesis.

Al Dr. José Antonio Ruiz Caballero, la Dra. Estrella M^a Brito Ojeda y el Dr. Ricardo Navarro García, por sus incansables ganas de que esta tesis se pudiese materializar, por su ilusión, su ayuda y su paciencia. Especialmente a Estrella le agradezco sus ganas y toda la ayuda y apoyo con los diferentes trámites y control de plazos que han hecho posible llegar a tiempo.

A mis compañeras del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Ramón y Cajal, la Dra. Marta Del Álamo por sus grandes aportaciones en fondo y forma en esta tesis, a Amaya Revilla, investigadora también del proyecto y Elisa Lorente, por sus aportaciones y apoyo moral que, sin duda, han servido para que este trabajo se haya llevado a cabo y que han enriquecido el resultado final.

Al Dr. Miguel Ángel Rodríguez Gandía del Servicio de Gastroenterología del Hospital Ramón y Cajal, por su paciencia y sus numerosas respuestas.

A la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal (FIBIO) por apoyar la realización de este ensayo clínico actuando como promotor del mismo y al Instituto de Investigación Sanitaria Ramón y Cajal (IRyCIS) por apoyar la investigación independiente en el centro.

A la Fundación Mutua Madrileña, por la concesión de la beca, que ha permitido realizar este estudio. Gracias por promover este tipo de ayudas que hacen que

muchos investigadores independientes puedan materializar proyectos de investigación irrealizables sin una aportación económica.

Por último me gustaría agradecer a mi familia, especialmente a mis padres sin los que nada de esto habría sido posible, por su ayuda, por transmitirme desde pequeña lo importante que es ser constante, humilde y trabajador en esta vida, porque sé que hoy se sentirán tremendamente orgullosos de que su hija pequeña sea “Doctora”.

Espero que de alguna forma vuelvan a sentir que ese gran sacrificio y esfuerzo mereció la pena. A mi hermana Irene por ser algo más que una hermana, un ejemplo, una amiga, un apoyo incondicional, por ayudarme también, y mucho, en este proyecto. Como no, a Carmen por tantas tardes de guardia con los niños. A Alberto por ayudarme a llegar a la meta aunque el camino no pareciese fácil, a Mario y Lucía por el tiempo que os he robado.

Y como no, a mi gran amiga, Romina, por haber llegado juntas también aquí, por animarme desde el inicio a embarcarme en esta aventura que parece, por fin, clausuramos juntas, por sus ánimos, y por saber transmitirme que siempre, siempre, sale el sol.

A todos vosotros, gracias, de corazón.

M^a Luisa Serrano Olmeda

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC):	1
1.1.1. Estructura genómica del VHC	1
1.1.2. Variabilidad genética del VHC.	3
1.1.3. Ciclo vital del virus de la Hepatitis C.....	6
1.2. HEPATITIS C.....	8
1.2.1. Transmisión	8
1.2.2. Diagnóstico y evolución de la hepatitis C.	8
1.2.3. Pronóstico y prevención:.....	12
1.2.4. Inmunopatogenia de la Infección por el VHC.....	14
1.2.5. Epidemiología. Prevalencia mundial.....	15
1.3. TRASPLANTE HEPÁTICO	17
1.2.6. Historia natural de la reinfección del injerto.....	18
1.2.7. Origen de la infección y cinética viral postrasplante	19
1.2.8. Recidiva de la infección por el VHC	19
1.2.9. Factores de riesgo asociados con la recidiva del VHC.	20
I. Factores víricos.....	21
II. Factores del huésped.....	22
III. Factores del donante.....	22
IV. Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas.....	22
1.4. TRATAMIENTOS ANTIVIRALES. SITUACIÓN ACTUAL.	23
1.4.1. Introducción	23
1.4.2. Definiciones	24
1.4.3. Guías terapéuticas para diagnóstico y tratamiento de la Hepatitis C. Quién y cómo tratar.....	25
1.4.4. Clasificación de los fármacos autorizados, según mecanismo de acción	26
1.4.4.1. Antivirales de acción indirecta:.....	26
1.4.4.2. Antivirales de acción directa (AAD):.....	29
1.4.5. Terapias en Investigación	35
1.4.5.1. Proteínas del huésped como diana terapéutica.....	37
1.4.5.2. Terapias preventivas y vacunas	38
1.4.6. Terapias probadas con limitada eficacia (incluso en algún caso inefectivas).	39

1.4.7. <i>Terapias alternativas o complementarias: SILIBINA (Cardo mariano)</i>	40
1.5. PRODUCTO EN INVESTIGACIÓN: SILIBINA	40
1.5.1. <i>Estructura Química y Composición:</i>	40
1.5.2. <i>Actividad Antiviral</i>	41
1.5.3. <i>Actividad Hepatoprotectora:</i>	42
1.5.4. <i>Formulación IV (LEGALÓN SIL)®</i>	43
1.5.5. <i>Formulación Oral (SILYFIT)®</i>	44
1.5.5.1. Complejo: SILIBINA-FOSFATIDILCOLINA:.....	44
1.5.5.2. Propiedades de los fitosomas (SILIBINA-FOSFATIDILCOLINA)	45
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	49
2.1. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA: ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL.....	49
2.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
2.2.1. <i>Hipótesis</i>	55
2.2.2. <i>Objetivo Primario</i>	55
2.2.3. <i>Objetivos Secundarios</i>	56
3. MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	57
3.2. INVESTIGADORES.....	57
3.3. PROMOTOR	57
3.4. MONITOR DEL ESTUDIO	57
3.5. COMPROMISOS ÉTICOS.....	58
3.6. SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD DEL ESTUDIO	59
3.7. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES:	60
3.7.1. <i>Criterios de inclusión</i>	60
3.7.2. <i>Criterios de exclusión</i>	61
3.8. RESTRICCIONES.....	62
3.9. ABANDONOS.....	62
3.10. TRATAMIENTO.....	62
3.10.1. <i>Medicación del estudio</i>	62
3.11. RELACIÓN ENTRE LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO Y LA INGESTA	63
3.11.1. <i>Administración de líquidos</i>	63
3.11.2. <i>Actividad física</i>	64
3.12. CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO	64
3.13. MEDICACIÓN PREVIA Y CONCOMITANTE.....	64
3.14. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	64
3.15. SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES.....	65
3.16. CONTROL DE SEGURIDAD	66

3.17.	FASE DE TRATAMIENTO.....	67
3.17.1.	<i>Determinaciones de laboratorio</i>	68
3.17.2.	<i>Procedimientos de recogida de datos clínicos (PA, FC y ECG)..</i>	69
3.17.3.	<i>Periodo de lavado</i>	69
3.17.4.	<i>Enmascaramiento de las determinaciones</i>	69
3.17.5.	<i>Recogida e interpretación de acontecimientos adversos</i>	70
3.18.	ANÁLISIS CINÉTICO	72
3.18.1.	<i>Tiempos de muestreo</i>	72
3.18.2.	<i>Preparación de las muestras</i>	72
3.18.3.	<i>Método analítico</i>	73
3.18.4.	<i>Análisis farmacocinético</i>	73
3.19.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
3.19.1.	<i>Determinación del tamaño de la muestra</i>	74
3.19.2.	<i>Método de aleatorización</i>	75
3.19.3.	<i>Evaluación de los datos</i>	76
3.19.3.1.	<i>Parámetros farmacocinéticos</i>	76
3.19.3.2.	<i>Evaluación de la seguridad</i>	76
3.19.3.3.	<i>Método estadístico</i>	76
3.19.3.4.	<i>Modificaciones al protocolo</i>	77
4.	RESULTADOS.....	79
4.1.	FECHAS DEL ESTUDIO	79
4.2.	INCLUSIÓN Y CALENDARIO DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO	79
4.3.	CARACTERÍSTICAS DE LOS VOLUNTARIOS INCLUIDOS	80
4.4.	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PREVIOS Y CONCOMITANTES.....	81
4.5.	CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO	82
4.6.	DESVIACIONES DEL PROTOCOLO.....	82
4.7.	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....	82
4.7.1.	<i>Niveles plasmáticos y parámetros farmacocinéticos para silibina</i> 82	
4.7.2.	<i>Gráfico de las concentraciones plasmáticas individuales</i>	83
4.8.	ANÁLISIS DE BIODISPONIBILIDAD	91
4.8.1.	<i>Concentraciones de silibina</i>	91
4.9.	TOLERABILIDAD Y SEGURIDAD	92
4.9.1.	<i>Acontecimientos adversos</i>	92
4.9.2.	<i>Análisis de seguridad</i>	93
5.	DISCUSIÓN.....	95
5.1.	FARMACOCINÉTICA.....	95
5.2.	SEGURIDAD.....	98
5.3.	OBTENCIÓN DE UNA FORMULACIÓN ORAL ADECUADA	100

5.4.	DESARROLLO CLÍNICO DE LA FORMULACIÓN ORAL	101
5.5.	ESTRATEGIA PARA LLEVAR A CABO ESTE DESARROLLO CLÍNICO	106
5.6.	ASPECTOS ECONÓMICOS	110
6.	CONCLUSIONES.....	115
7.	BIBLIOGRAFÍA	117
8.	ANEXOS	127
8.1.	ANEXO I: FARMACOCINÉTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	127
8.2.	ANEXO II: CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO, CARACTERÍSTICAS DE LOS VOLUNTARIOS INCLUIDOS , RESULTADOS DE PRUEBAS ANALÍTICAS Y REGISTROS DE CONSTANTES VITALES Y ECG	170
8.3.	ANEXO III: DOCUMENTOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO	199
8.3.1.	<i>Hoja de Información al paciente y Consentimiento Informado</i> 200	
8.3.2.	<i>Dictámen del CEIC que lo evaluó (Hospital Ramón y Cajal)</i>	206
8.3.3.	<i>Aprobación de la AEMPS</i>	208
8.3.4.	<i>Certificado de póliza de seguro.....</i>	213
8.3.5.	<i>Conformidad de la Dirección del Centro.....</i>	214
8.3.6.	<i>CONCESIÓN DE LA AYUDA POR LA MUTUA MADRILEÑA</i>	215

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS:

Tabla 1: Variabilidad genética del VHC. Clasificación según el porcentaje de homología.....	3
Tabla 2: Formulación, dosis, fecha de caducidad y lote de los fármacos en estudio.....	63
Tabla 3: Procedimientos del estudio.....	65
Tabla 4: Plan general de las extracciones de sangre.....	68
Tabla 5: Asignación aleatoria del tratamiento.....	75
Tabla 6: Fechas de ingreso en la UEC.....	79
Tabla 7: Calendario del estudio.....	80
Tabla 8: Características demográficas de los participantes.....	81
Tabla 9: Tratamientos farmacológicos concomitantes durante el desarrollo del estudio.....	81
Tabla 10: Parámetros cinéticos de silibina combinada con fosfatidilcolina por vía oral: SilyFit®.....	88
Tabla 11: Parámetros cinéticos de silibina por vía IV: Legaron SIL®.....	89
Tabla 12: Estadística descriptiva de los parámetros cinéticos de silibina calculados para las 2 pautas de tratamiento.....	90
Tabla 13: Análisis de bioequivalencia para las concentraciones de silibina.....	91
Tabla 14: Acontecimientos adversos notificados durante el estudio.....	93

FIGURAS:

Figura 1: Estructura del Virus de la Hepatitis C.....	1
Figura 2: Estructura del genoma del virus de Hepatitis C.....	2
Figura 3: Distribución geográfica mundial de los diferentes genotipos del VHC.....	4
Figura 4: Ciclo vital y replicativo del VHC.....	7
Figura 5: Historia natural de la infección por VHC.....	11
Figura 6: Prevalencia mundial de la Hepatitis C.....	17
Figura 7: SilyFit: complejo silibina-fosfatidilcolina.....	44
Figura 8: Valores de carga viral en pacientes control sin Silibina iv.....	51

Figura 9: Valores de carga viral en pacientes trasplantados tratados con Silibina iv.....	52
Figura 10: Gráfico de los valores medios de las concentraciones plasmáticas de silibina con cada una de las pautas de tratamiento a los diferentes tiempos de extracción.....	83
Figura 11: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 01.....	83
Figura 12: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 02.....	84
Figura 13: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 03.....	84
Figura 14: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 04.....	85
Figura 15: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 05.....	85
Figura 16: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 06.....	86
Figura 17: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 07.....	86
Figura 18: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 08.....	87

ABREVIATURAS

AAD= Antivirales de acción directa

AEMPS = Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

AUC = área bajo la curva concentración-tiempo

AUC_{0-∞} = área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo 0 a infinito.

AUC_{0-t} = área bajo la curva concentración-tiempo desde el tiempo 0 hasta el tiempo de la última concentración medida (t).

AUC_{t-∞} = AUC desde la última concentración medida a tiempo t hasta infinito.

BA=Biodisponibilidad Absoluta

BPCs= Normas de Buena Práctica Clínica

CEIC = Comité Ético de Investigación Clínica.

Cl = aclaramiento plasmático

cm = centímetros

Cmax = concentración máxima o pico

Cmin = concentración mínima

CRD = Cuaderno de Recogida de Datos

dl = decilitro

DS = desviación estándar

ECG = electrocardiograma

F = biodisponibilidad

FC = frecuencia cardiaca

FDA= Food and Drug Administration. American Agency

Formulación test = Legalon SIL® (Silibina 350mg)

Formulación de referencia = SilyFit® (Complejo Silibina-fosfatidilcolina, conteniendo 40 mg de silibina)

g = gramos

h = horas

HCC = Hepatitis C crónica

ICH= International Conference on Harmonisation

iv= intravenoso

kg = kilogramos

kl = kilolitros

l = litros

mg = miligramos (10^{-3} g)

min = minutos

ml = mililitros

mm = milímetros

mm Hg = milímetros de mercurio

MRT = tiempo medio de residencia

ms = milisegundos

μg = microgramos (10^{-6} g)

ng = nanogramos (10^{-9} g)

Nº = número

OMS= Organización Mundial de La Salud

pg = picogramos (10^{-12} g)

QT = intervalo comprendido entre el comienzo del complejo QRS del ECG hasta el final de la onda T.

QTc = intervalo QT corregido para la frecuencia cardiaca

RVS =Respuesta Viral sostenida

s = segundos

Tª = temperatura

TA = tensión arterial

TA s = tensión arterial sistólica

TA d = tensión arterial diastólica

Tmax = tiempo en el que se alcanza la Cmax.

Tmin = tiempo en el que se alcanza la Cmin

TH=Trasplante hepático

T_{1/2} = vida media de eliminación

U = unidad

UEC = unidad de ensayos clínicos

Vd = volumen de distribución aparente

VHC= Virus hepatitis C

Vol = voluntario

1. INTRODUCCIÓN

1.1. VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)

1.1.1. ESTRUCTURA GENÓMICA DEL VHC.

El virus de la Hepatitis C, VHC, es un virus RNA, de polaridad positiva, con un genoma de 9,5 Kb, y un tamaño que oscila entre 55 y 65 nm (Figura 1). Tiene una cápsida proteica y una envuelta. Taxonómicamente se encuentra encuadrado en los Flavivirus y presenta una serie de genotipos, subtipos y cuasiespecies (1)

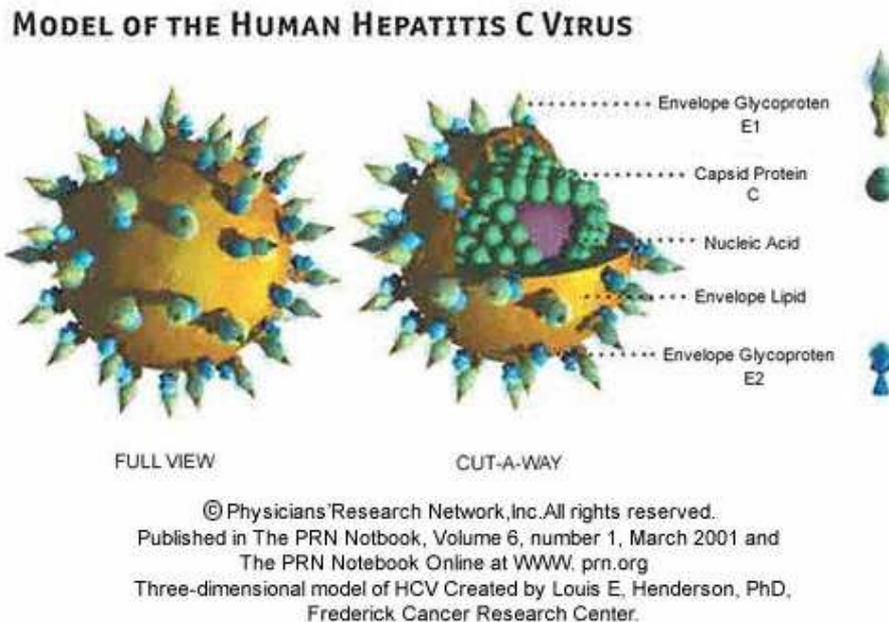
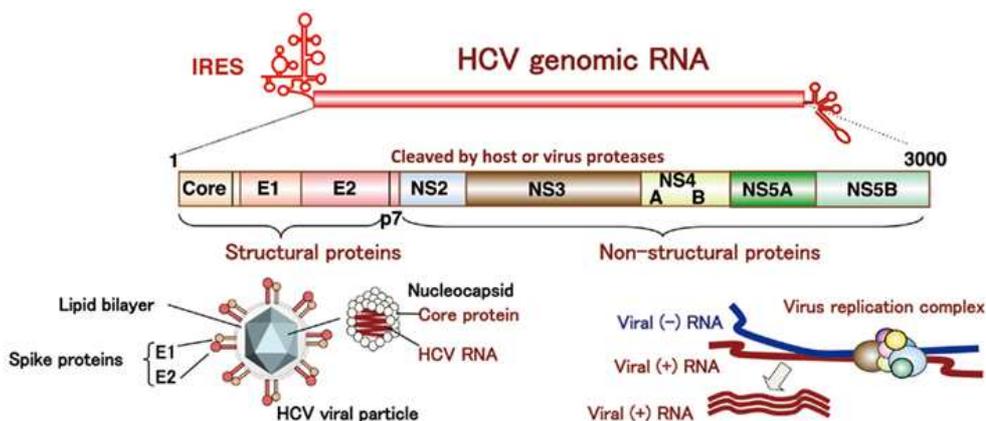


Figura 1. Estructura del Virus de la Hepatitis C.

El genoma (Figura 2) contiene un marco abierto de lectura único de, aproximadamente, 3000 aminoácidos, flanqueado por regiones no traducidas altamente conservadas, denominadas 5' y 3'UTR. De las dos, la región 5' es la mejor conservada, la que menos varía, con analogías superiores al 98%, y cuya principal función es permitir la unión del ribosoma de las células hospedadoras al RNA vírico en la estructura conocida como IRES (*internal ribosome entry sites*). Contiene tres

proteínas estructurales (core, E1, E2) y siete proteínas no estructurales o NS (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B).



Kohji Moriishi and Yashiharu Matsuura. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. Frontiers in microbiology. February 2012 doi: 10.3389/fmicb.2012.00054

Figura 2. Estructura del genoma del virus de Hepatitis C.

El marco de lectura presenta dos regiones: una estructural y otra no estructural. La primera es capaz de codificar las proteínas de la cápsida (C) y las glicoproteínas gp31 y gp70 (E1 y E2) de la envuelta. Los primeros 191 aminoácidos del extremo N-terminal de la región estructural codifican las proteínas de la cápsida. Estas proteínas tienen capacidad de unirse al ARN viral, son inmunógenas y presentan una secuencia de aminoácidos altamente conservados entre los diferentes aislados víricos y las gp31 y gp70 (E1 y E2) de la envuelta (2). A continuación, se encuentra la región hipervariable HVR2. E1 y E2 se relacionan físicamente entre sí para desempeñar un papel importante en la fijación del virus y su entrada en las células diana.

La segunda región, no estructural, codifica toda una serie de enzimas con acción proteasa, helicasa, RNA-polimerasa dependiente de RNA, etc. Dentro de esa región, es importante reseñar el papel de NS3 y, sobre todo, NS5 por presentar ésta el sitio de unión a la PKR (proteín-quinasa) celular y la zona ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón), ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento antiviral (2,3). Es importante la enorme variabilidad en la secuencia de aminoácidos de regiones HVR de E2 o NS5A. Esta variabilidad puede

generarse a través de mecanismos de selección específicos que operan en el virus y que están asociados con escape del sistema inmune. Por ejemplo, la región HVR en E2 puede ser diana de anticuerpos neutralizantes y la persistencia entonces requiere variaciones continuas de la secuencia viral para evadir la respuesta de células B.

1.1.2. VARIABILIDAD GENÉTICA DEL VHC.

De entre los virus de interés en patología humana, el Virus de la Hepatitis C es uno de los virus con un mayor grado de diversidad genética que se han estudiado hasta el momento. La heterogeneidad genética es una de las características biológicas más relevantes del VHC (4). La heterogeneidad genética que presenta puede ser intragenoma, dando lugar a las **cuasiespecies** víricas, e intergenómica, que da lugar a los **genotipos** y **subtipos** (5). Se identifican 6 genotipos principales que se denominan del 1 al 6 y los subtipos que son más de 100 determinados con las letras “a” a la “k”. (Tabla 1)

La poliproteína de cepas correspondientes a diferentes genotipos puede variar hasta un 30%, llegando a ser las diferencias de hasta un 50% en zonas más variables como las proteínas de envoltura (E1 y E2). La variabilidad genética es especialmente elevada en la porción aminoterminal de la proteína E2 ó región hipervariable 1 (HVR1). En cada genotipo se ha identificado un número variable de subtipos, que se denominan 1a, 1b, 2a, 2b, et... Algunos genotipos como el 1a, 2a y 2b están ampliamente distribuidos por todo el mundo mientras que otros, como 5a y 6a, están restringidos a determinadas áreas geográficas (Figura 3)

	% homología	Símbolo	Origen
Genotipo	66-69	1-6	Heterogeneidad del virus
Subtipo	77-78	Letra minúscula	Virus relacionados dentro del mismo genotipo
Cuasiespecies	90-99	-	Mutaciones virales en el individuo durante la replicación

Tabla 1: Variabilidad genética del VHC. Clasificación según el porcentaje de homología (6)

El genotipo 1a se localiza predominantemente en el norte de Europa y América del Norte, y el 1b predomina en el sur y este de Europa y Japón. El genotipo 2 es menos común que el genotipo 1, y se encuentra más frecuentemente en Europa que en América del Norte. El genotipo 3 es endémico en el sureste de Asia. El genotipo 4 es característico del este medio de Egipto y el centro de África. El genotipo 5 es casi exclusivo del sur de África. El genotipo 6 está distribuido principalmente en Asia. La distribución en la población española infectada muestra un predominio muy acentuado del genotipo 1, especialmente del 1b, que representa más del 70% de todos los casos. El segundo en cuanto a frecuencia es el genotipo 3 con una frecuencia entre el 12 y el 17% de los casos. Los genotipos 2 y 4 se dan con una frecuencia mucho menor, en el 1 y 3% el genotipo 2 y entre el 2 y 7% el genotipo 4. La variabilidad genética viral genera diferentes respuestas frente a la terapia (6)

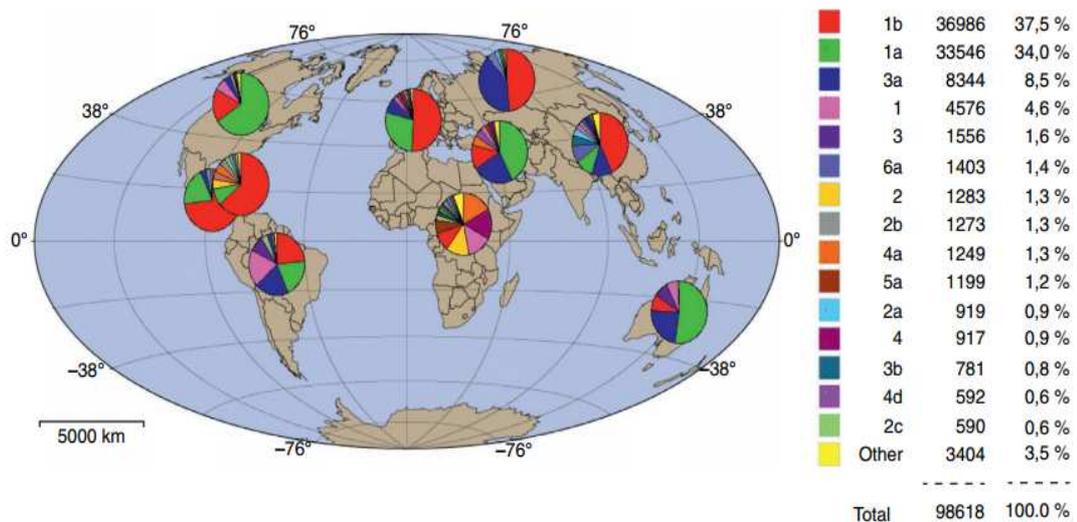


Figura 3. Distribución geográfica mundial de los diferentes genotipos del VHC. Se observa la distribución geográfica en las distintas regiones de las secuencias con diferentes genotipos del VHC. Puede apreciarse el predominio del genotipo 1b en el sur y este de Europa y en Japón, mientras que el genotipo 1a se ubica en el norte de Europa y América. A la derecha de la figura se muestra el porcentaje total de cada genotipo; los genotipos 1a y 1b abarcan más del 70% del total (6)

La elevada cinética de replicación viral y la baja fidelidad de la enzima responsable de la replicación (la RNA polimerasa dependiente de RNA) son los dos principales factores que explican la elevada variabilidad genética de este virus. El virus tiene una vida media de 2,5 h en sangre y existe una alta producción diaria de partículas virales (10¹²) en los pacientes con infección crónica; la cinética de replicación viral es, por lo

tanto, superior incluso a la del VIH. En segundo lugar, la enzima que se encarga de la replicación tiene una tasa de error aproximada de 10^{-4} (7). De este modo, será fácil comprender que la población que infecta a un individuo es una mezcla muy heterogénea de genomas muy relacionados entre sí, con una homología superior al 98%, y que se denominan **cuasiespecies**, siendo responsables de la variabilidad intragenoma (1). La cuasiespecie predominante sería aquella que contara con mayor capacidad replicativa en el huésped. Durante la infección, el número y la composición de mutantes en la población viral cambian constantemente en relación con los cambios de su entorno, lo que constituye una gran ventaja adaptativa para el virus. Cuando el conjunto replicativo está bien adaptado a su entorno, las mutaciones nuevas tienden a ser deletéreas y a disminuir la capacidad general de replicación de los genomas que lo portan. Cuando, por el contrario, el conjunto replicativo no está bien adaptado, las nuevas mutaciones pueden ser ocasionalmente ventajosas, empujando a la selección a una nueva distribución en el espacio de secuencias virales.

La variabilidad genética, sin embargo, no parece ser igual en todas las áreas del genoma, hay unas partes del genoma que están bien conservadas, mientras que otras muestran distintos grados de variabilidad. En la región codificante, los genes de envoltura E1 y E2, sobre todo la secuencia de este último, conocida como región hipervariable 1 (HVR-1), muestran la mayor variación genética, por lo que ha sido utilizada para la identificación de las distintas variantes virales o cuasiespecies de los individuos infectados con el VHC, mientras que el gen de la proteína core es el más altamente conservado. La región 5'-NTR y porciones de 3'-NTR también están conservadas.

La región HVR-1 es, probablemente, el mayor epítipo de neutralización del VHC y las mutaciones que se acumulan en esta región permiten al virus evitar la neutralización contribuyendo al establecimiento de infecciones persistentes, y en la respuesta deficiente al tratamiento con IFN. La aparición de anticuerpos contra la secuencia predominante de la HVR1 da lugar a la aparición de una nueva cuasiespecie con una secuencia en HVR1 que no es reconocida por los anticuerpos previos (8). También hay datos que apoyan la aparición de mutantes que escapan a la respuesta inmune celular ejercida por linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a epítopos localizados en regiones

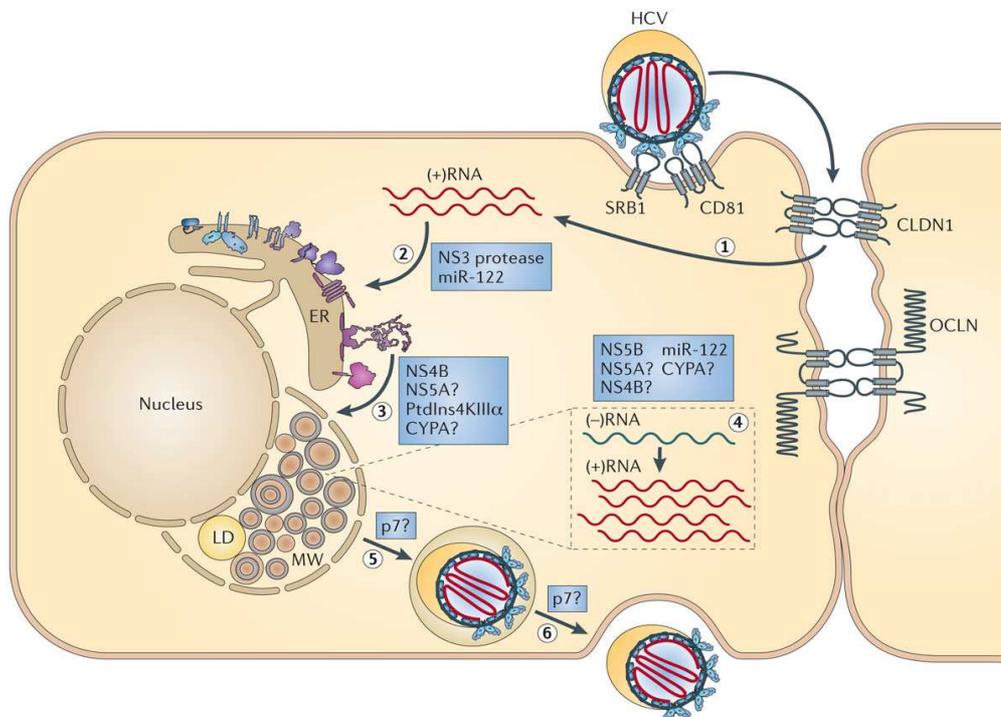
conservadas como la proteína NS3 (9). Así, la diversidad de las cuasiespecies del VHC puede, por tanto, contribuir al desarrollo de cronicidad durante la infección debido a los rápidos cambios que suceden en las proteínas de la envoltura viral como mecanismo de escape a la presión inmune ejercida por el huésped. Sin embargo, el escape inmunitario no parece ser el único mecanismo que utiliza el virus para persistir del huésped.

Existen pacientes infectados por más de un genotipo o subtipo, lo que se denomina infección mixta. En un mismo paciente sólo se han descrito por el momento variantes intragenoma, y no variantes intergenoma, lo que quiere decir que no se ha demostrado el cambio de genotipo o de subtipo (10). Según esto, si tenemos en cuenta la tasa de mutación anual del VHC, podemos deducir que para que en un mismo hospedador se pudiera originar el cambio de subtipo desde el virus parental deberían pasar al menos 50-60 años. Todo esto puede cambiar en el futuro, si se confirman los datos recientes que describen el primer caso de recombinación intergenotipo en el VHC (7).

1.1.3. CICLO VITAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C.

El VHC se replica preferentemente en el citoplasma de los hepatocitos, pero también es capaz de infectar a otras células como las células dendríticas (11) y células B (12). En el suero el VHC se puede encontrar libre, unido a inmunoglobulinas o asociado a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL) siendo esta última la forma infectiva más plausible. Las glicoproteínas de la envuelta viral son capaces de unirse a múltiples proteínas de membrana que podrían servir como receptores. Entre estas proteínas se encuentra el receptor de LDL, el receptor scavenger de clase B tipo I (SR-BI) (13), la molécula de adhesión intercelular 3 no integrina específica de células dendríticas (Dc-SIGN, CD209) (14) y la tetraspanina (CD81) (15). Tras la posible endocitosis mediada por receptor se produciría la fusión de la envuelta viral con la membrana de los endosomas en un proceso mediado por glicoproteínas de la envuelta y dependiente del PH (16). Esto indica que la entrada se produce pasando por vesícula que, probablemente, maduraran a endosomas donde se producirá la fusión de la envuelta viral con la membrana endosomal y liberación del

genoma viral al citoplasma, en donde se traducirá y replicará, cerrando así su ciclo vital. (Figura 4)



De: Ralf Bartenschlager, Volker Lohmann & Francois Penin. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection *Nature Reviews Microbiology* 11, 482–496 (2013) doi:10.1038/nrmicro3046

Figura 4: Ciclo vital y replicativo del VHC. Tras la unión inicial del virus de la hepatitis C (VHC) a (SRB1) y CD81, la partícula interacciona con las proteínas Claudín 1 (CLDN1) y ocludina (OCLN) y finalmente entra en las células por endocitosis mediada por receptor (**paso 1**). El ARN viral se libera en el citoplasma y comienza a traducirse en el RE rugoso, dando lugar a una poli proteína que se traducirán en las proteínas maduras (**paso 2**). Las proteínas virales, junto con distintos factores de la célula hospedadora, inducen la formación de un compartimento membranoso (formado por múltiples vesículas de simple, doble y multi membrana, así como pequeños cúmulos de lípidos (LDS) (**paso 3**). La replicación del ARN se produce dentro de la red membranosa a través de una copia de sentido negativo (-) RNA que sirve como una plantilla para la producción de cantidades excesivas de RNAs de sentido positivo (+) RNA (**paso 4**). El ensamblaje de las partículas de VHC probablemente se inicia en las proximidades de los cúmulos de lípidos, en donde la proteína del núcleo y el ARN viral se acumulan. La envuelta viral se adquiere por gemación a través de la membrana del ER por gemación. Esta unión parece que, de alguna forma, es un mecanismo que funcionaría como un interruptor: apagando el proceso de traducción/replicación y encendido el de ensamblaje (**paso 5**). Finalmente, el virión es liberado mediante la ruta de secreción mediada por el aparato de Golgi. Luego estas se liberan por exocitosis (**paso 6**).

1.2. HEPATITIS C

1.2.1. TRANSMISIÓN

El VHC se transmite a través del contacto con la sangre de una persona infectada (transmisión por vía parenteral). La mayoría de los casos de infección suele ser por:

- Compartir agujas y jeringuillas, práctica en muchos casos asociada a la adicción a drogas de uso parenteral (ADVP)
- Reutilizar agujas por mala praxis médica.
- Transmisión sexual (poco frecuente): normalmente no es una enfermedad de transmisión sexual ya que no se transmite a través del semen como en el caso de la hepatitis B o el VIH-SIDA. Sin embargo en caso de tener llagas genitales o sangrado activo el riesgo aumenta.
- Transmisión de madre a hijo en el nacimiento
- Transfusiones de sangre y trasplantes
- Otros posibles comportamientos de riesgo incluyen hacerse tatuajes o perforaciones en el cuerpo.
- Causas desconocidas: hasta un 5% de los pacientes tienen factores de riesgo que no se han podido identificar.

1.2.2. DIAGNÓSTICO Y EVOLUCIÓN DE LA HEPATITIS C.

Debido a las características del virus es importante diferenciar el diagnóstico del VHC entre la infección aguda y crónica (OMS, Julio 2015):

Dado que la infección aguda con el VHC es generalmente asintomática, su diagnóstico precoz es muy infrecuente. En las personas que desarrollan una infección crónica por el VHC, esta puede no estar diagnosticada porque se mantiene asintomática hasta décadas después, cuando los síntomas producen un daño hepático de secundario a grave.

La infección con el VHC se diagnostica en dos etapas:

- La detección de anticuerpos anti-VHC mediante un examen serológico revela que la persona está infectada con el virus.
- Si el examen es positivo se debe realizar una prueba que detecte el ARN del VHC para confirmar la infección crónica, dado que entre el 15 y el 25% de las personas infectadas con el VHC eliminan espontáneamente la infección mediante una respuesta inmunitaria fuerte, sin necesidad de tratamiento. Aunque ya no estén infectadas, los análisis serológicos de esas personas revelarán la presencia de anticuerpos anti-VHC. Se toman como pruebas confirmatorias pruebas moleculares como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite comprobar si hay virus presente. Esta prueba se basa en utilizar técnicas moleculares para aumentar la cantidad de material genético (ARN) del virus de la hepatitis C que existe en una muestra de sangre. Cuando la prueba de PCR es positiva, la persona está infectada por el virus de la hepatitis C.

Una vez que se haya diagnosticado la hepatitis C crónica a un paciente se deberá evaluar el grado de daño hepático (fibrosis o cirrosis). Esto puede hacerse por biopsia hepática o por diversas pruebas no invasivas. Además, se debería realizar una prueba de laboratorio para identificar el genotipo de la cepa de hepatitis C de esas personas.

El diagnóstico precoz puede prevenir problemas de salud derivados de la infección, y también la transmisión del virus. La OMS recomienda el examen de las personas que puedan correr un alto riesgo de infección. Los grupos de población más expuestos al riesgo de infección con el VHC son:

- los consumidores de drogas inyectables
- los receptores de productos sanguíneos infectados, y los pacientes sometidos a intervenciones invasivas en centros sanitarios cuyas prácticas de control de la infección son inapropiadas
- niños nacidos de madres infectadas con el VHC

- personas cuyas parejas sexuales están infectadas con el VHC
- personas infectadas con el VIH
- reclusos o personas que han estado en la cárcel en el pasado
- personas que han utilizado medicamentos por vía intranasal
- personas que hayan tenido tatuajes o perforaciones ornamentales (piercings).

La infección por el VHC tiene un periodo de incubación que dura entre 2 semanas y 6 meses (17) y progresa generalmente de forma muy lenta (hasta 30 años) sin síntomas específicos. En la mayoría de los casos, como se acaba de comentar, los primeros síntomas aparecen cuando ya hay una enfermedad hepática avanzada, lo que afecta directamente a la detección de la enfermedad en fases agudas.

Algunos pacientes con infección crónica pueden presentar niveles fluctuantes de alanina aminotransferasa (GPT ó ALT). En la exploración física pueden observarse estigmas de hepatopatía crónica, como telangiectasias y eritema palmar. La infección crónica hepática se caracteriza por infiltración de células inflamatorias en los lóbulos y tractos portales. La progresión de la enfermedad puede llegar a que se aparezcan los nódulos de regeneración característicos de la cirrosis (en un 20% de pacientes con infección crónica), al inicio compensada y más adelante pasar a una cirrosis descompensada y/o hepatocarcinoma, que derivará en un trasplante de hígado. En la cirrosis descompensada pueden aparecer ictericia, esplenomegalia, ascitis, hemorragia por varices y encefalopatía hepática.

Después de la infección inicial, aproximadamente el 80% de las personas no manifiestan síntoma alguno. Algunas personas pueden presentar un cuadro clínico agudo con fiebre, pérdida de peso, irritabilidad, fatiga, falta de apetito, náuseas, vómitos, dolores abdominales, coloración oscura de la orina, heces fecales de color grisáceo, dolores en las articulaciones e ictericia.

Aproximadamente entre el 75% y el 85% de las personas que padecen la infección inicial contraen una enfermedad crónica. Los síntomas de la hepatitis C crónica

pueden tardar hasta 30 años en desarrollarse. Entre el 60% y el 70% de las personas que padecen la infección crónica sufren una hepatopatía crónica; entre un 5% y un 20% contraen cirrosis y entre un 1% y un 5% mueren por cirrosis o cáncer de hígado.

(Figura 5)

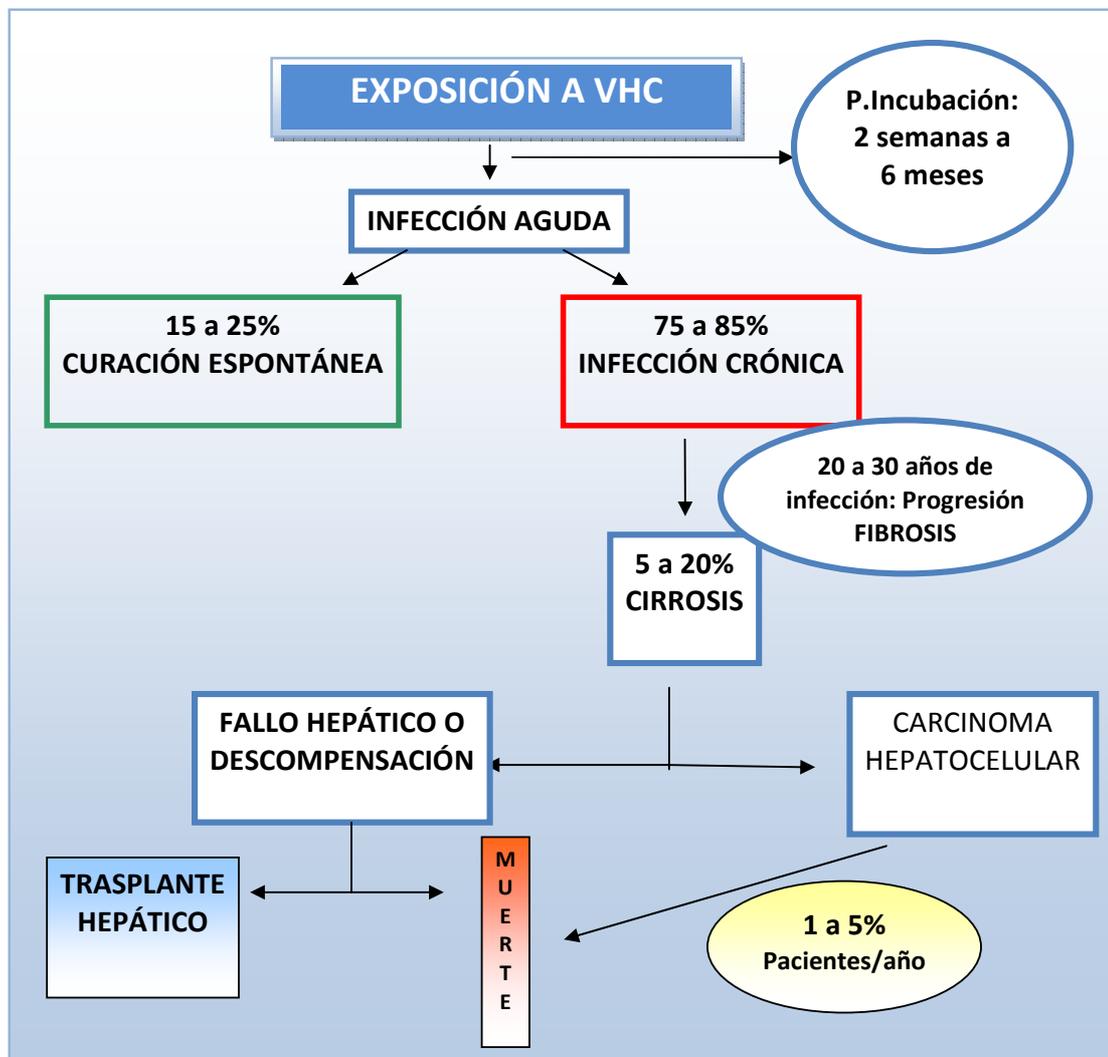


Figura 5: Historia natural de la infección por VHC (17)

La infección crónica por el VHC tiene el riesgo de progresión de fibrosis portal hasta llegar a establecer cirrosis, tras la cual el sujeto desarrolla insuficiencia hepática y/o hepatocarcinoma. Estos hechos suceden en una parte de sujetos infectados, y tras un tiempo largo de infección. En este punto los pacientes son trasplantados, viéndose seriamente comprometidas las posibilidades de éxito con el nuevo órgano trasplantado ya que éste es infectado, en todos los casos, por el VHC en el mismo

momento del trasplante empeorando así la supervivencia tanto del órgano injertado como del propio paciente trasplantado.

La progresión de la fibrosis es más lenta en los primeros 10 años, más rápida en los siguientes 10 años, y mucho más rápida en los siguientes 20 años. El pronóstico individual es muy difícil de establecer, pero globalmente el 20% de los adultos tienen cirrosis tras 10 años de infección. (17)

Los factores de alto riesgo identificados en adultos, para la progresión de la fibrosis, son: el sexo masculino, la ingesta de alcohol, las sobre infecciones por otros virus (VIH, VHB), drogas de abuso por vía parenteral, edad mayor de 40 años y una duración de la infección mayor de 20 años.

El tratamiento efectivo con medicamentos antivirales disminuye el riesgo de desarrollar cirrosis y cáncer hepático. Hasta hoy los pacientes con los genotipos 2 o 3 tenían mayor probabilidad de responder al tratamiento convencional (antivirales de acción indirecta) que los pacientes con los genotipos 1 o 4. Los nuevos medicamentos (antivirales de acción directa) pueden mejorar la respuesta de los que tienen el genotipo 1 o 4.

1.2.3. PRONÓSTICO Y PREVENCIÓN:

Analizando sujetos con hepatitis C crónica se han podido identificar diversos factores que afectarían la progresión de la infección por el VHC y sus efectos a nivel hepático, y que explicarían en parte la gran variabilidad observada en la evolución de la enfermedad (18).

Los principales son:

- Mecanismo de transmisión: Se ha encontrado que la progresión a cirrosis tras 20 años, puede ser 2 o más veces mayor, en los sujetos infectados por transfusión, respecto de aquellos infectados por uso de drogas endovenosas.
- Factores virales: A diferencia de lo ocurrido con la respuesta al tratamiento, donde sí constituyen factores de importancia, no existe evidencia concluyente respecto al efecto del genotipo y la carga viral sobre la historia natural de la enfermedad.

- Consumo de alcohol: Múltiples estudios han demostrado su efecto potenciador del daño viral, que implica tasas al menos 3 veces superiores de cirrosis en los pacientes bebedores excesivos respecto de los bebedores moderados, y 10 o más veces mayor respecto de los no bebedores.

- Coinfecciones: Los estudios han demostrado que los pacientes con hepatitis crónica por VHC e infectados por VIH tienen una peor evolución, en cuanto a daño histológico y mortalidad por causa hepática.

La tasa de mortalidad a 5 años en pacientes con cirrosis es relativamente baja (13%), aunque un 70% de estas muertes son relacionadas a carcinoma hepatocelular (riesgo anual de 1% a 4%), fallo hepática y hemorragia (19,20).

En conclusión, los factores asociados a un peor pronóstico en la infección crónica por VHC incluyen el contagio por vía transfusional, la edad mayor de 40 años al momento del contagio, el consumo de alcohol y las coinfecciones virales (21).

En cuanto a la prevención, según la Organización Mundial de la Salud, podemos hablar de:

Prevención primaria

No hay vacunas para prevenir la infección por el VHC. Reducir el riesgo de infección por el virus se puede conseguir **evitando**:

- El consumo de drogas por vía parenteral y el intercambio de material de inyección.
- El contacto con la sangre o con hemoderivados siempre que sea posible. Los trabajadores de la salud deben tomar precauciones al manipular sangre y líquidos corporales.
- Inyecciones innecesarias y aplicadas en condiciones no seguras.
- Recoger y eliminar de objetos punzantes o cortantes que no siguen las precauciones oportunas.

- Relaciones sexuales sin protección con personas infectadas por el VHC (pese a ser poco frecuente la transmisión sexual, la OMS recomienda usar protección con personas infectadas por VHC)
- Intercambio de objetos personales punzantes o cortantes que puedan estar contaminados por sangre infectada.
- Tatuajes, piercing y acupuntura realizados con material contaminado.

Prevención secundaria y terciaria

Las personas infectadas por el VHC deben:

- Buscar rápidamente atención médica apropiada, que pueda consistir en la administración de antivirales.
- Recibir educación y orientación acerca de las opciones asistenciales y terapéuticas.
- Someterse periódicamente a pruebas que permitan diagnosticar las enfermedades hepáticas en etapa temprana.
- Vacunarse contra la hepatitis A y B para prevenir la coinfección por estos virus y proteger así el hígado.

1.2.4. INMUNOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VHC.

La importancia del sistema inmune en el control del VHC es bien conocida. Hasta en un 25% de los pacientes que se infectan por primera vez por dicho virus, este es eliminado por el sistema inmunológico sin necesidad de ningún tratamiento farmacológico (22). En cuanto a la inmunidad humoral, la aparición precoz de anticuerpos neutralizantes frente al VHC, especialmente en dominios conservados, podría jugar un papel importante en la eliminación del VHC. La mayor afinidad de los anticuerpos frente a epitopos conservados del VHC se correlaciona con la eliminación del VHC (23). En este sentido hay datos que sugieren que la HVR1 contiene un dominio de neutralización relevante porque anticuerpos frente a este dominio pueden hacer la infección del VHC autolimitada (24).

En cuanto a la inmunidad celular frente al VHC, durante la infección se produce una respuesta policlonal poco intensa. Así, la deficiente función cooperadora y citotóxica de linfocitos T CD8+ específica para el VHC tiene como resultado la persistencia de viremia y la evolución a cronicidad (7). En este sentido se ha visto que en individuos capaces de combatir la infección, las respuestas proliferativas CD4+ son más intensas, tienen un perfil de citocinas Th1 y hay CTL dirigidos contra antígenos del VHC (22).

Todo esto sugiere que en aquellos pacientes con una infección por VHC que se autolimita, la respuesta inmune frente al virus es más potente, mientras que en aquellos en los que el virus persiste la respuesta inmune es más débil. Desafortunadamente, no sabemos si estas diferencias son la causa o la consecuencia de la diferente evolución de la infección.

1.2.5.EPIDEMIOLOGÍA. PREVALENCIA MUNDIAL.

El Virus de la Hepatitis C (VHC) fue inicialmente reconocido como agente productor de la hepatitis no-A, no-B, y clonado posteriormente por Choo et al. en 1989. Hasta el año 2005 no se logró cultivar el virus in vitro (25).

A partir de ese momento ya se pudieron plantear diversas investigaciones, ya que no disponer de un método que hiciese posible obtener partículas virales in vitro, dificultaba mucho cualquier tipo de investigación. En primer lugar, este hecho, permitió conocer la estructura y ciclo replicativo del VHC, lo que nos ha llevado a avanzar en el conocimiento y tratamiento de esta infección en los últimos años.

Como se apunta en el apartado anterior (Figura 5) la infección por VHC es una de las principales causas de hepatopatía crónica y puede producir cirrosis, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma. Además es la primera causa de trasplante hepático y de muerte asociada a enfermedad hepática. De acuerdo a las últimas estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, el 3% de la población mundial (aproximadamente entre 170 y 200 millones de personas) (Figura 6) está infectada, correspondiendo 4 millones en Estados Unidos y unos 5 millones en Europa. La prevalencia varía según los distintos países, su grado de desarrollo o, incluso, las diferentes zonas y circunstancias sanitarias dentro del mismo país. En España se

considera que la población infectada oscila entre el 2,5% con lo cual hay entre 480.000 y 760.000 personas infectadas por el VHC.

En la población de menos de 20 años la prevalencia es muy baja y a partir de los 30 años va aumentando en relación con la edad. Los presos y los ADVP son quienes presentan las tasas más elevadas de infección, entre un 40 y 98%. (26)

Algunas poblaciones de inmigrantes tienen una prevalencia elevada de infección el VHC, como los asiáticos y los subsaharianos, mientras que los procedentes de Latinoamérica presentan tasas más bajas que la población autóctona. Los pacientes españoles con hepatitis C crónica se infectaron mayoritariamente por transfusiones de sangre, uso de drogas por vía parenteral o durante alguna hospitalización médica y quirúrgica. La reducción del consumo de drogas por vía parenteral y los programas de intercambio de jeringuillas, así como la eliminación de las hepatitis postransfusionales, han determinado que la incidencia de nuevas infecciones se haya ido reduciendo progresivamente. (26)

Por otro lado la OMS incide en que sería importante para reducir la incidencia de Hepatitis C Crónica (HCC) descompensada (cirrosis, hepatocarcinoma) el diagnosticar los casos de hepatitis C aguda o crónica que aún no han presentado síntomas. De este modo los pacientes podrían recibir tratamiento antes de alcanzar una fase avanzada, lo que, además, se traduciría en un impacto beneficioso en términos económicos y sociales (27).

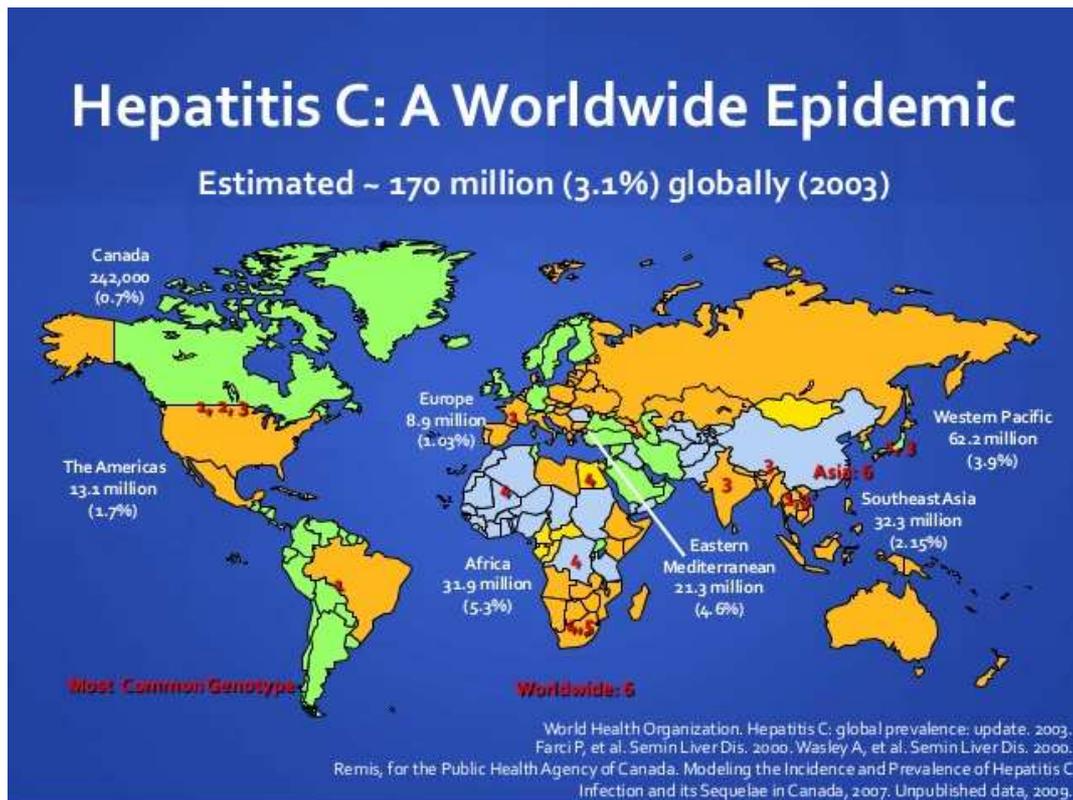


Figura 6: Prevalencia mundial de la Hepatitis C. Según la Organización Mundial de la Salud

1.3. TRASPLANTE HEPÁTICO

Según la evolución y progresión de la enfermedad vista anteriormente, la infección crónica por VHC puede desencadenar en una descompensación hepática o carcinoma que desencadenen un trasplante hepático (TH). (27)

Los sujetos deben cumplir varias condiciones para poder ser incluidos en la lista de espera a recibir un trasplante de hígado:

- Insuficiencia hepatocelular (MELD > 17)

$$MELD = 3.78[\text{Ln bilirrubina (mg/dL)}] + 11.2[\text{Ln INR}] + 9.57[\text{Ln creatinina (mg/dL)}] + 6.43$$

- Hepatocarcinoma que cumpla criterios de Milan:
 - Un nódulo único < 5 cm ó
 - Hasta 3 nódulos todos < 3 cm
 - Menor de 67 años

- Que no exista contraindicación (según la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), se consideran contraindicaciones absolutas: alcoholismo, consumo de drogas, infección séptica grave, tumor maligno extrahepático metastático, y como contraindicaciones relativas: enfermedades cardíacas, pulmonares u otras enfermedades crónicas de mal pronóstico)

Encontrar un fármaco que se pudiese administrar desde la fase anhepática (en el mismo momento del trasplante), teniendo en cuenta las condiciones de estos pacientes (inmunosupresión) podría ser beneficioso para el nuevo órgano y por tanto para el propio paciente, en el sentido de que podría evitarse la reinfección del nuevo órgano trasplantado, que es el gran problema que se encuentra en el trasplante de hígado en este tipo de pacientes, infectados por VHC, y que se expone más detalladamente en el siguiente apartado.

Actualmente no hay ensayos clínicos publicados con los nuevos antivirales de acción directa, que se hayan realizado en estos pacientes, desde la fase anhepática.

1.2.6.HISTORIA NATURAL DE LA REINFECCIÓN DEL INJERTO

Tal y como se apunta en apartados anteriores, el VHC no se elimina del huésped tras un TH, produciéndose la reinfección del injerto con grados variables de lesión de dicho injerto (28). Esta recidiva de la infección por el VHC después del trasplante hepático provoca una progresión de la hepatitis C acelerada y más grave que en los pacientes inmunocompetentes (29) y hasta un 30% de los pacientes desarrollan una nueva cirrosis hepática a los 5 años tras el TH, ocasionando una importante morbi-mortalidad (30).

Además, la recidiva de la infección por VHC se ha convertido en la primera causa de mortalidad a partir del primer año del trasplante hepático en los pacientes trasplantados por cirrosis secundaria a la infección por el VHC. Así, la supervivencia de estos pacientes a los 5 años del trasplante es del 60-70% frente al 80% en los pacientes trasplantados por otras etiologías (31,32). En la actualidad, no existen medidas eficaces para evitar la recidiva por lo que esta se considera uno de los principales problemas del TH. Por lo tanto, conocer la fisiopatología del proceso y

algún marcador predictivo que ayuden a tomar medidas preventivas es de vital importancia.

La terapia antiviral, en particular el tratamiento con IFN-alfa y ribavirina, se ha mostrado eficaz únicamente en el 15-20 % de los individuos con recidiva de la infección por VHC (33), por lo que el resto de pacientes que no toleran el tratamiento, o que no responden al mismo, están abocados a una evolución más rápida y agresiva de una enfermedad cuyo único tratamiento en los estadios finales será el trasplante hepático, con las dudas éticas y elevada morbi-mortalidad que el mismo conlleva (31).

1.2.7.ORIGEN DE LA INFECCIÓN Y CINÉTICA VIRAL POSTRASPLANTE

En casi la totalidad de los pacientes se detecta ARN del VHC en suero una vez trasplantados debido a que el VHC, a pesar de ser principalmente hepatotropo, se perpetúa en otros reservorios extra-hepáticos, fundamentalmente en los ganglios linfáticos, y desde esta localización vuelven a infectar el órgano trasplantado (32,34). Durante la fase anhepática se produce un descenso brusco de la carga viral, sin embargo a partir de las 12-24 horas posteriores a la reperusión, se produce una replicación viral muy rápida con el consiguiente aumento de viremia, que alcanza sus niveles máximos a los 4-5 días del trasplante. En los pacientes que aclaran el VHC se encuentra una respuesta inmunológica tipo Th1 rápida, vigorosa y mantenida en el tiempo, lo que sucede en el 20-50% de los pacientes inmunocompetentes y casi en ninguno de los pacientes trasplantados, en gran parte por la inmunosupresión a la que se encuentran sometidos, lo que condiciona una respuesta inmunológica débil y tardía, y como consecuencia, la persistencia viral y cronificación de la enfermedad. (32,34)

1.2.8.RECIDIVA DE LA INFECCIÓN POR EL VHC

La reinfección del injerto por el VHC es prácticamente inmediata, con una infección masiva de hepatocitos durante las primeras horas hasta alcanzar de nuevo los valores de CV-VHC basales 5 días después del TH (35,36). Esta reinfección se produce a los

pocos días tras el trasplante aunque no se observen cambios funcionales y bioquímicos importantes durante las 3 primeras semanas (37). Después de este período, aparece la lesión hepática (38), precediendo a la elevación de las transaminasas y el cuadro de hepatitis aguda en varias semanas (70% de los pacientes). Este proceso de hepatitis aguda inicial muestra un infiltrado inflamatorio portal y lobulillar (35). Hay infiltración de leucocitos en el hígado (39) y más del 90% de los hepatocitos están infectados. La tasa de muerte celular es elevada y coincide con un pico de CV-VHC y con una fuerte respuesta inmune que intenta controlar la infección (28, 37). Aproximadamente, un 10% de los pacientes con TH pueden desarrollar un daño hepático severo entre el mes 3 y 6 (40). Se trata de la hepatitis colestásica que se asocia a cargas virales de VHC muy elevadas e inmunosupresión severa y ausencia de respuesta específica frente al VHC (41, 42, 43).

Por otro lado, aproximadamente el 20% de los pacientes trasplantados y con recurrencia por el VHC no tienen síntomas de hepatitis durante los 6 primeros meses post-TH. En la mayoría de los pacientes con seguimiento histológico superior a 6 meses, los hallazgos histológicos observados son de hepatitis crónica activa, con o sin cirrosis.

Etos tres tipos de pacientes descritos (sin hepatitis, con hepatitis aguda y con hepatitis colestásica) van a evolucionar a una fibrosis hepática precoz que terminará en la pérdida del injerto a corto-medio plazo.

1.2.9.FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS CON LA RECIDIVA DEL VHC.

Los factores que predisponen a una evolución desfavorable de la hepatitis por VHC después del trasplante no están bien definidos, pero cada vez existen más evidencias de que están relacionados con las:

1. Características intrínsecas de la cepa vírica que infecta.
2. Características propias del receptor.
3. Características propias del donante.
4. Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas.

I. Factores víricos.

Los factores dependientes del virus parecen ser importantes en la patogénesis de la lesión hepática, bien a través del daño hepático directo por el acúmulo de viriones o bien indirectamente a través de la respuesta inmune desencadenada, que es variable en función de la cepa vírica infectante (34).

a) Genotipo viral

Existe controversia respecto al papel que desempeña el genotipo viral en la evolución de la hepatitis por VHC después del trasplante. A pesar de que algunos autores han descrito la asociación entre la infección por el genotipo 1b y el desarrollo de hepatitis más agresiva otros autores no han observado estos resultados.

b) Viremia

A partir de las 72 horas del trasplante, los niveles de viremia aumentan unas 10-20 veces con respecto a los niveles existentes pretrasplante. No se ha encontrado asociación entre la carga viral postrasplante y la gravedad de la recidiva del VHC, sugiriendo que el mecanismo patogénico de lesión celular es inmunomediado y no citopático como se pensaba en un principio. Sin embargo, cada vez existen más estudios que describen una asociación significativa entre los niveles elevados de ARN del VHC en el pre-trasplante y en el post-trasplante inmediato, con una peor evolución de la hepatitis por el VHC sobre el injerto.

c) Cuasiespecies del VHC

La diversidad genética presente principalmente en la región hipervariable 1 (HVR-1) del gen de la proteína de la envuelta E2, condiciona la existencia de cuasiespecies virales, dando lugar a una población compleja de diferentes genomas cuyas secuencias difieren únicamente en una pequeña cantidad de nucleótidos y que se encuentran presentes en un mismo individuo. Se ha sugerido que existe una relación entre el grado de inmunosupresión y la complejidad de las cuasiespecies en los pacientes con trasplante hepático. Este hecho podría ser el responsable de la recidiva del VHC debido a la emergencia de nuevas variantes que facilitan la evasión del virus frente al sistema inmunológico. La complejidad genética se vuelve constante 36 meses después del trasplante en pacientes con fibrosis grado 3-4, mientras que los pacientes con fibrosis 1-2 presentan un patrón de complejidad mas heterogéneo sugiriendo que la

disminución de la complejidad de las cuasiespecies podría estar asociada con la recidiva del VHC y con la progresión de la fibrosis.

II. Factores del huésped.

Está bien establecido que las características propias del huésped (44), tales como la edad en el momento del trasplante, el sexo femenino, la gravedad de la enfermedad antes del trasplante y la raza diferente a la caucásica, son factores que influyen negativamente sobre la supervivencia del injerto y del paciente. Sin embargo, existen pocos estudios que correlacionen estos factores con la severidad de la recidiva del VHC. También se ha demostrado que los pacientes portadores del antígeno de histocompatibilidad de clase II DR3, tienen una tasa de recidiva por el VHC mayor y desarrollan una enfermedad hepática más agresiva, con el consiguiente descenso en la supervivencia del injerto.

III. Factores del donante.

Está bien establecido que la edad del donante es un factor asociado con la gravedad de la recidiva viral en pacientes con trasplante hepático (44). Numerosos estudios han descrito una forma de recidiva más grave y más precoz en aquellos pacientes que han recibido el órgano de un donante mayor de 40 años. En los últimos años, la edad del donante se ha incrementado de forma importante ya que se han empezado a utilizar injertos procedentes de donantes añosos.

En cuanto al trasplante de donante vivo, no existen datos suficientes para poder determinar si es o no un factor de riesgo asociado con la gravedad de la recidiva del VHC en pacientes trasplantados, lo mismo ocurre con la esteatosis del donante, la concentración hepática de hierro, el grado de compatibilidad HLA (antígenos leucocitarios humanos) entre donante y receptor y factores genéticos propios del mismo que median en la respuesta inflamatoria frente al virus.

IV. Influencias externas del entorno y/o iatrogénicas.

El exceso de inmunosupresión en los pacientes trasplantados tiene un efecto deletéreo sobre la evolución de la recidiva del VHC, ya que es el responsable de la

disminución del aclaramiento viral (45). Parece que el grado de inmunosupresión global, y/o los cambios bruscos en los niveles de inmunosupresión, son responsables de una evolución más agresiva de la recidiva.

Finalmente, la infección por citomegalovirus (CMV) ha demostrado asociarse con una peor evolución de la recidiva del VHC (46), probablemente por el efecto modulador que ejerce el CMV.

Así mismo, el daño de preservación del injerto y el tiempo de isquemia fría del injerto también se han relacionado con una recidiva más grave (47).

1.4. TRATAMIENTOS ANTIVIRALES. SITUACIÓN ACTUAL.

1.4.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de cualquier terapia antiviral que se use es erradicar el ARN del VHC, éxito que se traduciría en el alcance de una respuesta viral sostenida (RVS), definida por la ausencia de ARN del VHC de tres a seis meses después de interrumpir el tratamiento. Una RVS se asocia, con una probabilidad del 99%, a una negativización del RNA del virus y por lo tanto se puede considerar la “cura” de la infección (48)

El alcance de una RVS también se ha asociado con una mejoría en todos los aspectos clínicos de la enfermedad.

Para alcanzar esta RVS es crucial el hecho de haber avanzado en los últimos años (desde 2005) en el conocimiento tanto de la estructura del virus (25), como del mecanismo de replicación viral, avanzando en el desarrollo de moléculas con mecanismos de acción directos sobre las enzimas implicadas en esta replicación viral, denominados Antivirales de Acción Directa (AAD).

A groso modo los AAD se enmarcan en uno de estos grupos:

- De primera generación: los inhibidores de proteasa NS3/4A (IP) (Aprobados desde 2011). (Boceprevir y Telaprevir)

- De segunda generación:
 - Inhibidores de la proteasa NS3/4A (Simeprevir, desde noviembre 2014)
 - los inhibidores de la proteína NS5A (el primero Daclatasvir, desde agosto 2014)
 - los inhibidores de la polimerasa NS5B que pueden ser: nucleót(s)idos o no nucleót(s)idos (El primero Sofosbuvir, desde Enero 2014)

Todas estas nuevas moléculas se están estudiando en diversas combinaciones (incluyendo o no Interferón-PEG y/o Ribavirina:RBV), observándose aumentos muy importantes en la eficacia (51-59)

Además de los AAD, existen otras líneas de investigación que desarrollaremos en el último punto de este apartado.

- Tratamientos dirigidos a proteínas del huésped
- Terapias preventivas y vacunas

1.4.2.DEFINICIONES

Antes de desarrollar los mecanismos de acción de fármacos ya aprobados y las nuevas líneas de tratamiento que se están estudiando cabe destacar la gran variedad de terminología muy específica que se ha utilizado desde el inicio del tratamiento de esta enfermedad para definir tanto las poblaciones a tratar en función de su exposición al virus y de la evolución de la enfermedad en el momento en que se va tratar como la respuesta mostrada a posibles tratamientos previos. Estos aspectos se deberán tener en cuenta antes de la terapia a elegir.

Es importante conocerlos para entender el manejo de la enfermedad y la estrategia elegida.

Entre estos términos encontramos:

- **PACIENTE NAÏVE:** Los pacientes que nunca han recibido ningún tipo de tratamiento para el VHC.
- **RECAÍDA PREVIA:** Los pacientes que tenían una carga viral indetectable al final de un tratamiento previo (respuesta al final del tratamiento), pero que no logran una respuesta virológica sostenida (RVS)
- **RESPUESTA VIRAL SOSTENIDA (RVS):** ARN del VHC negativo tras 24 semanas del fin del tratamiento
- **RESPUESTA PARCIAL:** Los pacientes que lograron una caída de 2 log₁₀ en el ARN del VHC en la semana 12 del tratamiento con peginterferón y ribavirina, pero que no llegan a tener una respuesta al final del tratamiento
- **RESPUESTA NULA:** Los pacientes que no lograron una reducción de 1 log₁₀ en el ARN del VHC en la semana 4 o una caída de 2 log₁₀ en el ARN del VHC en la semana 12 del tratamiento con peginterferón y ribavirina
- **FRACASO DE LOS INHIBIDORES DE LA PROTEASA:** Los pacientes que no responden al tratamiento con boceprevir, telaprevir, o simeprevir en combinación con peginterferón y ribavirina.

1.4.3. GUÍAS TERAPEÚTICAS PARA DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS C. QUIÉN Y CÓMO TRATAR

Conocer el contenido y existencia de estas guías es determinante para entender el algoritmo de tratamiento en unos centros u otros, países o continentes.

Existen varias:

- Las guías para el diagnóstico y tratamiento de la infección por VHC se crearon de forma conjunta por la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD) y la Infectious Diseases Society of America (IDSA)

en 2014 y se puede acceder a www.hcvguidelines.org (60). Estas guías tienen gran peso en la elección de la terapia antiviral.

- Además de estas, también se han creado unas guías que incluyen recomendaciones para el tratamiento de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL), que se publicaron en 2014 (61-65).
- Las guías de consenso de Reino Unido, que se actualizan en 2014 (66)
- Por último, también cabe destacar que la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó unas guías en 2014 sobre la detección y el tratamiento de la hepatitis C. Las directrices que recogen estas guías están destinadas principalmente para los médicos, pero también para el ámbito político de los países con un nivel económico medio-bajo (67)

1.4.4. CLASIFICACIÓN DE LOS FÁRMACOS AUTORIZADOS, SEGÚN MECANISMO DE ACCIÓN

En este apartado se detalla la clasificación de fármacos antivirales autorizados según su mecanismo de acción.

De modo esquemático, la clasificación es:

1.4.4.1. ANTIVIRALES DE ACCIÓN INDIRECTA

- **Interferón alfa pegilado (IFN-PEG)** (49)

La pegilación de una proteína consiste en su unión a una molécula de polietilenglicol (PEG) con el fin de disminuir su aclaramiento y así prolongar su tiempo de vida media en el organismo. Los dos IFNs pegilados actualmente disponibles difieren de forma considerable en su estructura:

- IFN pegilado alfa-2a está unido a una molécula de PEG ramificada de 40 kDa de peso molecular
- IFN pegilado alfa-2b está unido a una cadena lineal de 12 kDa.

Esta diferencia estructural justifica las diferencias farmacocinéticas que existen entre ellos. El IFN pegilado alfa-2a tiene una vida media más larga y un menor volumen de

distribución corporal en comparación con el IFN pegilado alfa-2b. Esta última forma es metabolizada principalmente por vía renal, mientras que la primera lo hace por vía hepática.

Los IFNs están relacionados con las citocinas e inducen acciones antivirales e inmunomoduladoras en las células dianas.

También, el VHC tiene mecanismos que interfieren en la respuesta inmune innata mediada por IFN-alfa.

El IFN alfa estimula la inmunidad innata (células NK) y adquirida (CD4+ CD8+ células T) frente al VHC, mediante la inducción de genes que participan en la presentación de antígenos y en la activación de las células T y B. (68)

Por lo general son fármacos mal tolerados por la gran cantidad de efectos secundarios que originan. Los efectos secundarios que con mayor frecuencia se asocian a su administración (>30%) incluyen: síntomas pseudo gripales (dolor de cabeza, dolores musculares, cansancio y fiebre) que por lo general disminuyen después de las primeras semanas de tratamiento, astenia y anorexia, reacciones en el lugar de la inyección (hematoma, escozor, irritación) y náuseas. También es frecuente (aunque en menor medida que los anteriores) que asocien (10-29%): depresión, ansiedad, irritabilidad, insomnio, dolor en los huesos y las articulaciones, adelgazamiento temporal del cabello, diarrea, dolor abdominal, prurito, mareos, pérdida de peso, piel seca y dificultad para concentrarse.

Además, los efectos secundarios graves derivados del uso de interferón, tales como insuficiencia cardíaca, sepsis, leucopenia, depresión, pérdida de visión, descompensación hepática etc., hacen que el cumplimiento terapéutico sea bajo, con lo cual muchos pacientes no alcanzan la curación por falta de adherencia al tener tantos efectos secundarios.

Esta gran cantidad de efectos secundarios y la eficacia limitada en algunas poblaciones de las terapias basadas en interferón, especialmente en los pacientes con enfermedad hepática más avanzada y en los que han fracasado a tratamientos previos, han puesto de manifiesto la necesidad de encontrar otros fármacos que sean mejor tolerados y más efectivos (69)

- **RIBAVIRINA (RBV) (50):**

La RBV es un nucleósido sintético, análogo de la guanosina, usada en el pasado principalmente para el tratamiento de la infección respiratoria severa por el virus respiratorio sincitial en niños.

La RBV entra en la célula hepática como un profármaco y es convertida en monofosfato, difosfato y trifosfato de ribavirina, a través de una acción secuencial de 3 kinasas celulares. Hasta este momento se han propuesto los siguientes mecanismos de acción:

- 1) Favorece la inmunidad del huésped frente al VHC potenciando una respuesta Th1 con aumento de citocinas como IFN-gamma y TNF-alfa e IL-2, que aumenta la lisis de los hepatocitos infectados y reduce la producción de viriones. Se piensa que el IFN y la RBV favorecen la respuesta inmunológica a través de los NK y linfocitos T, consiguiendo la muerte de las células infectadas por el VHC.
- 2) Inhibición de IMPDH (inosina monofosfato deshidrogenasa), una enzima que transitoriamente depleciona la reserva intracelular de trifosfato de guanosina, que es esencial para la transcripción viral y la replicación de los virus ARN. No obstante, otros inhibidores específicos de IMPDH como el merimepodib (VX-497) no han demostrado de una manera clara un efecto antiviral frente al VHC.
- 3) Moderada inhibición de la ARN Polimerasa. Tampoco parece que la RBV sea un potente inhibidor de la ARN polimerasa, ya que sólo produce una leve disminución de la carga viral ($<0,5 \log_{10}$), y no aumenta la pendiente de la primera fase de reducción del ARN-VHC.
- 4) Por último, la RBV actuaría como un mutágeno del VHC al incorporarse dentro de los nuevos genomas sintetizados, dando lugar a mutaciones inducidas por la RBV en el genoma viral y originando un “error catastrófico” de la replicación (acumulación de mutaciones sin valor adaptativo). El resultado final es que los viriones infecciosos van desapareciendo, y se evita que el virus ataque a los hepatocitos sanos. Se ha comprobado, que la administración de RBV en monoterapia produce una precoz y leve reducción de la carga viral. Este efecto es transitorio y desaparece al cuarto

día. Al añadir el IFN alfa la reducción diaria de la carga viral en la primera fase fue de 2 log₁₀/día, y en la segunda fase de 0,15 log₁₀/día.

El efecto de la RBV depende de la capacidad del IFN alfa al bloquear la producción de viriones.

A pesar de que del mecanismo de acción la RBV en el tratamiento de la hepatitis C crónica no se conoce bien, este fármaco ha pasado a formar parte del tratamiento de referencia cuando se utiliza con PEG-Interferón o cuando se combina como tratamiento triple con un IP de primera generación como boceprevir o telaprevir junto con PEG.

Su ausencia en el tratamiento da lugar a una eliminación viral más lenta, a un mayor número de recaídas y a recidivas más frecuentes. Hasta la fecha, se han demostrado diferentes actividades para RBV.

La asociación de RBV con fármacos antivirales de acción directa contra proteínas virales concretas se está utilizando para potenciar esta acción directa, asociándose además a una RVS tras 24 semanas de tratamiento, lo cual hace pensar que la RBV, en estos casos, pueda modular la respuesta inmunitaria humoral contra el VHC. (50,68,69)

Los efectos secundarios asociados con mayor frecuencia al tratamiento con Ribavirina incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, fatiga, sangrado de encías, deshidratación, erupciones cutáneas, picores, fragilidad capilar, sequedad de ojos y nariz. El principal efecto secundario grave asociado es la anemia que por lo general sucede durante las primeras cuatro semanas de tratamiento y luego mejora. Otros efectos secundarios graves incluyen hipotensión y posibilidad de producir parada cardíaca, empeoramiento de la función respiratoria y posibilidad de aparición de una neumonía y conjuntivitis.

1.4.4.2. ANTIVIRALES DE ACCIÓN DIRECTA (AAD)

1. Inhibidores de la proteasa NS3/4A:

- El genoma de ARN del VHC codifica una sola poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Esta poliproteína se escinde durante y después de la traducción. La proteína viral NS3 / 4A contiene

una actividad de serina proteasa esencial para la hidrólisis de la poliproteína viral. La rápida replicación de VHC, junto con la baja fidelidad de su polimerasa, da lugar a generaciones de mutaciones por todo el genoma viral que tiene como resultado una variabilidad notable en la población de HCV, conociéndose las distintas variables como cuasiespecies.

Son:

- Boceprevir (BOC) (51) y Telaprevir (TVR) (52) activos sólo frente al genotipo 1 : **DE PRIMERA GENERACIÓN**
- Simeprevir (SMV) activo frente a los genotipos 1 y 4, **DE SEGUNDA GENERACIÓN** (53)
- Paritaprevir (Viekirax®) (59). Este fármaco está autorizado sólo en la esta formulación que contiene varios antivirales.

En cuanto al perfil de seguridad de los AADs de primera generación los ensayos clínicos (EECC) en fases II y III, han puesto de manifiesto la aparición frecuente de anemia y erupciones en la piel como acontecimientos adversos (AA) relacionados con el tratamiento con telaprevir y boceprevir. Estos AAs junto con otros síntomas menores derivados de la triple terapia con inhibidores de la proteasa, como son: fatiga, dolor de cabeza, náuseas, malestar anorrectal y disgeusia, pueden comprometer la adherencia de los pacientes a estas nuevas terapias.

Los resultados comparados señalan un perfil de toxicidad en el que prevalece un mayor ajuste de dosis de ribavirina, ingresos hospitalarios, neutropenia y disgeusia con boceprevir, y mayor aparición de toxicodermia, hiperuricemia y prurito anal con telaprevir (52)

Debido a que el boceprevir fue aprobado para ser usado en combinación con peginterferón y ribavirina, resulta difícil establecer relaciones causales entre los efectos secundarios surgidos en los ensayos clínicos y el agente en particular(49, 50,51). En todos los estudios, surgieron efectos adversos en el 100% de los participantes. El principal problema del boceprevir es la anemia, que requiere la administración de epoetina o análogos, con el consiguiente aumento de efectos

secundarios, de molestias para el paciente y de los costes del tratamiento (51). Los acontecimientos adversos más frecuentes en los pacientes tratados con boceprevir fueron fatiga, anemia, náuseas, dolor de cabeza y disgeusia. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes tratados con boceprevir y el grupo control en la anemia, neutropenia, disgeusia, vómitos y diarrea (51). Las tasas de abandono del tratamiento y de necesidad de disminución de la dosis fueron mayores en los grupos que recibieron boceprevir, mientras que las de efectos adversos graves fueron similares entre quienes recibieron el tratamiento estándar y quienes recibieron el antiviral

Por lo que respecta al perfil de seguridad de telaprevir, en los ensayos clínicos, la incidencia de acontecimientos adversos de intensidad moderada fue más elevada en el grupo que recibió telaprevir que en el grupo al que se administró placebo (en ambos casos junto con interferón pegilado y ribavirina). Los acontecimientos adversos más característicos e importantes de telaprevir se produjeron en la piel, con un mayor riesgo de erupciones exantemáticas graves (5% de grado ≥ 3), habiéndose descritos varios casos de síndrome de Stevens Johnson (52). En un 56% de los pacientes que fueron tratados con triple terapia con TVR apareció exantema cutáneo, eccematoso y maculo papuloso, en ocasiones moderado-grave, en comparación con un 32% en el caso de la terapia doble con IFN-PEG más RBV. Las reacciones adversas moderadas que se comunicaron de forma más frecuente (incidencia igual o superior a un 5,0%) fueron anemia, exantema (rash), prurito, náuseas y diarreas y los acontecimientos adversos graves comunicados con más frecuencia (incidencia igual o superior a un 1,0%) fueron anemia, exantema, trombocitopenia, linfopenia, prurito y náusea.

En relación al perfil de seguridad de los AADs de segunda generación, por lo general, simeprevir presenta un perfil de seguridad mejor que telaprevir y boceprevir y buena tolerancia, con muy pocas interrupciones del tratamiento debidas a acontecimientos adversos y una incidencia baja de acontecimientos adversos graves. Durante las primeras 12 semanas de tratamiento, las reacciones adversas notificadas con mayor frecuencia (incidencia $\geq 5\%$) fueron náuseas (22%), exantema y prurito (22%), disnea (11,8%), aumento de la bilirrubina en sangre (7,4%) y reacción de fotosensibilidad (5%). La mayoría de las reacciones adversas

notificadas fueron de intensidad grado 1 ó 2 y los acontecimientos adversos graves fueron muy raros. (53)

2. Inhibidores de la polimerasa NS5B (Análogos a núcleo(s)tidos o no análogos a núcleo(s)tidos):

- Los inhibidores de la ARN polimerasa NS5B se dividen en dos grandes clases: Inhibidores análogos a nucleótidos (IN) y los inhibidores no análogos a nucleótidos (INN). Los IN se unen al sitio activo de NS5B, mientras INN se unen a uno fuera del sitio activo (de los al menos tres lugares, de unión alostérico). La unión de la NNI a uno de estos lugares de unión alostéricos puede dar un cambio conformacional del sitio activo, lo cual inhibe la actividad de la ARN polimerasa. (69). Son:

- Sofosbuvir (SOF) (Sovaldi®). Análogo Nucleó(s)tido) (54) Y
- Dasabuvir (Exviera®. Análogo No Núcleo(s)tido)(55)

Sofosbuvir mostró una buena tolerabilidad durante los ensayos clínicos. Los acontecimientos adversos fueron generalmente leves y se produjeron pocas interrupciones de tratamiento como consecuencia de dichos acontecimientos adversos. Entre los más comunes, que se produjeron en, como mínimo, un 10% de los participantes en dichos ensayos y que coincidieron con los perfiles de seguridad bien conocidos de IFN-PEG y RBV, se incluyen fatiga, cefalea, náuseas, insomnio, mareo, prurito y anemia.

Dasabuvir, se administra junto con la combinación de ombitasvir, paritaprevir y ritonavir (Viekirax®). La administración conjunta de estos fármacos se asocia con un buen perfil de seguridad y buena tolerabilidad. Los acontecimientos adversos más frecuentes con los 3AAD + RBV fueron fatiga, astenia, cefalea, náusea, diarrea, prurito y exantema. Las diferencias de riesgo indican que la combinación puede causar fatiga y prurito, el cual se ha observado con otros inhibidores NS3/4A y pudiera deberse a la influencia en transportadores biliares. En los pacientes tratados con esta combinación se observaron

aumentos transitorios de bilirrubina y de enzimas hepáticos. Parece que el dasavubir puede potenciar la aparición de anemia que habitualmente se asocia al tratamiento con ribavirina.

3. Inhibidores de la proteína NS5A:

- La proteína NS5A del VHC es esencial para la replicación viral y para el ensamblaje de viriones infecciosos, aunque los mecanismos moleculares precisos por los cuales NS5A lleva a cabo estas funciones no se conocen (70)

El mecanismo de acción de los inhibidores de VHC NS5A es, por tanto, aún poco claro. Son:

- Daclatasvir (DCV) (56) y
- Ledipasvir (LDV) (57), con actividad frente a todos los genotipos del VHC
- Ombitasvir (Viekirax®) (59). Este fármaco está autorizado sólo en la esta formulación que contiene varios antivirales.

Daclatasvir es generalmente seguro y bien tolerado, con una baja barrera para resistencia y bajo potencial de interacción medicamentosa. Las reacciones adversas notificadas con más frecuencia ($\geq 1\%$) fueron cansancio, cefalea, prurito, insomnio, síndrome pseudogripal, sequedad de piel, náuseas, disminución del apetito, alopecia, erupción cutánea, astenia, irritabilidad, mialgia, anemia, pirexia, tos, disnea, neutropenia, diarrea y artralgia. Las reacciones adversas notificadas con más frecuencia de una intensidad de al menos Grado 3 (frecuencia del 1% o mayor) fueron neutropenia, anemia y linfopenia. El perfil de seguridad de daclastavir en combinación con la biterapia PEG/RBV fue similar al observado con PEG y RBV.

La seguridad clínica de ledipasvir ha sido estudiada fundamentalmente en combinación con sofosbuvir. Hasta la fecha, no se han notificado acontecimientos adversos específicos para los inhibidores de NS5A. La frecuencia de acontecimientos adversos de grado > 2 fue baja. El número de

pacientes que discontinuaron el tratamiento debido a acontecimientos adversos fue muy baja (<1%) siendo los efectos secundarios más comunes el dolor de cabeza leve y la fatiga.

Los últimos fármacos aprobados son:

- Harvoni®, una combinación fija de Ledipasvir y Sofosbuvir: LDV 90 mg / 400 mg SOF. (58)
- Exviera®: Dasabuvir, 250 mg (55)
- Exviera® + Viekirax® (Ombitasvir + Paritaprevir + Ritonavir (Inhibidor de cit CYP3A. Fármaco anti VIH) (59)

A pesar de los beneficios que representa el uso de AAD, su uso puede traer aparejado el desarrollo de **resistencia viral** en aquellos pacientes que no logran una RVS debido a la gran diversidad genética, altos niveles de replicación y alta tasa de mutación que caracterizan al VHC. Estas características conllevan a que cualquier mutación que confiera resistencia a los AAD con el simple cambio de un aminoácido este presente en todo paciente, inclusive antes de que hayan recibido el tratamiento. A día de hoy, conocemos de forma detallada el perfil de resistencias de la mayoría de los AAD actualmente en desarrollo. Debemos tener en cuenta que estos hallazgos podría ser un factor importante en el caso de fallo terapéutico, sin embargo deben ser tomados con cautela hasta que un número importante de estudios dirigidos a investigar estrategias de retratamiento hayan sido completados (71).

Además, según las Fichas Técnicas, se recogen listadas las **posibles interacciones** con fármacos que se metabolizan por la vía del CYP3A4, como el BOC, que pueden hacer que aumente la C_{máx} del AAD sino se tiene en cuenta este mecanismo, lo cual también podría traducirse en fallo terapéutico además de amenazante para la vida de estos pacientes. Como es lógico en nuevos medicamentos, no existe una evidencia claramente establecida para poder determinar la relevancia clínica de las interacciones entre los nuevos VHC-IPs y otros medicamentos pero ya se conocen algunas de ellas que han sido objeto de la elaboración de notas informativas emitidas

por la AEMPS como el “Riesgo de bradicardia severa y bloqueo cardiaco asociado a la administración de Harvoni® y la combinación de Sovaldi® mas Daklinza® con amiodarona publicada el 27 de abril de 2015.

Como norma general es recomendable extremar las precauciones del uso de estos medicamentos cuando se administran con tres grandes grupos de medicamentos: los que son altamente dependientes del CYP3A4 y la elevación de sus concentraciones plasmáticas se asocia con acontecimientos adversos graves (midazolam, triazolam, alfuzosina, cisaprida, estatinas, colchicina, pimozida, inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (para el tratamiento de la hipertensión arterial), derivados ergotamínicos, hipérico, etc.), los que pudieran reducir significativamente la exposición plasmática de los IPs y disminuir la respuesta antiviral (dexametasona, rifampicina, rifabutina, fenitoína, fenobarbital o carbamazepina) o aquellos medicamentos que prolongan el intervalo QT (amiodarona, quinidina, metadona y algunos neurolépticos).

Será vital un seguimiento exhaustivo de la administración de los tratamientos recientemente autorizados (planes de gestión de riesgo), para poder establecer si el desarrollo de resistencia, estrategias de retratamiento, interacciones, etc.... podrán acarrear consecuencias a largo plazo y la trascendencia de las mismas.

1.4.5.TERAPIAS EN INVESTIGACIÓN

Las principales líneas de investigación (69) continúan en la línea de identificar nuevas terapias para el tratamiento de la hepatitis C crónica (HCC) que sean capaces de lograr una respuesta viral sostenida (RVS), disminuyendo así la aparición y desarrollo de efectos secundarios.

Antes de desarrollar este apartado hay que tener en cuenta varios factores que pueden ser determinantes en la respuesta al tratamiento antiviral:

- Genotipo
- Papel del polimorfismo del gen de la interleuquina 28B: IL28B
- Aspectos clínicos (como tener VIH, sufrir daño hepático, tener sobrepeso, hábitos tóxicos y comorbilidades asociadas del paciente a tratar en cuestión) que pueden dificultar la curación.

- Genotipo: El genotipo 1a del VHC se asocia con menores tasas de RVS a muchas combinaciones AAD en comparación con 1b.
- Polimorfismo del Gen IL28B: Los polimorfismos genéticos humanos del gen IL28B, que codifica el interferón lambda 3, han demostrado ser predictores significativos de la respuesta al tratamiento del VHC. (72)

El gen IL28B está implicado en la respuesta inmunitaria a determinados virus, incluyendo el de la hepatitis C. Existen tres subtipos del IL28B (denominados genotipos): CC, CT y TT. Las personas con el genotipo CC presentan una respuesta inmunitaria más potente frente a la infección por VHC que las que tienen los genotipos CT o TT (también denominados genotipos no-CC). Esta respuesta inmunitaria hace que las personas que presentan un genotipo CC tengan más probabilidades de aclarar el VHC sin tratamiento (aclaramiento viral espontáneo) en los primeros meses de la infección. Las personas con un genotipo CC también son de dos a tres veces más propensas a curarse con IFN-PEG y RBV, con independencia de su origen étnico o su estado serológico al VIH.

Una persona puede tener cualquier genotipo del gen IL28B independientemente de su origen racial o étnico, pero la población afroamericana o de origen africano tiene menos probabilidades de poseer el genotipo CC que las de otras razas o etnias.

Origen Probabilidad de tener el genotipo IL28B CC (en %) (72):

Africano 23–55

Europeo 53–86

Sudasiático 65–98

Oriente asiático 90–100

Aunque las personas con el genotipo CC tienen más posibilidades de curarse con IFN-PEG y RBV, el origen étnico sigue influyendo sobre esta posibilidad. Las tasas de RVS entre las personas con el genotipo CC son menores entre la población afroamericana y de origen africano que en personas de otras etnias. Aún no se ha descubierto qué factores justificarían esta diferencia en las tasas de RVS. (73)

IL28B y nuevos fármacos anti-VHC

La incorporación de uno de los nuevos fármacos orales (AADs) contra el VHC al régimen de IFN-PEG y RBV, o su empleo como parte de una combinación de AAD aumenta las tasas de RVS en personas con genotipos no-CC, con independencia de su origen racial o étnico. Todavía no está claro si el genotipo IL28B tiene una gran influencia sobre las tasas de curación usando AAD sin interferón pegilado, o si los AAD son mejores para las personas con dichos genotipos del gen IL28B.

❖ En este grupo, proteínas del propio VHC como dianas, podemos destacar las siguientes líneas de investigación (72):

- Combinaciones de AAD (Sin interferón)
- Combinaciones de AAD, PEG-IFN (alfa) y ribavirina
- La terapia triple: AAD + PEG-IFN (alfa) y ribavirina
- La terapia cuádruple: Dos AADs + PEG-IFN (alfa) y ribavirina

Actualmente están empezando a surgir los primeros casos de interacciones y resistencias a los AAD en este tipo de combinaciones. Al igual que con los fármacos ya autorizados, queda aún por establecer si el desarrollo de resistencias acarrea consecuencias a largo plazo y en particular relacionadas al uso de estrategias de retratamiento (74)

1.4.5.1. PROTEÍNAS DEL HUÉSPED COMO DIANA TERAPEÚTICA

Otra línea de investigación se ha centrado en las proteínas del huésped que son esenciales para la replicación viral, como ciclofilinas y microRNAs.

- Inhibidores de la ciclofilina: Ciclosporina A, un inmunosupresor que inhibe la replicación del VHC en modelos de cultivo de células de replicón (75). El efecto antiviral de la ciclosporina A se debe a su inhibición de la proteína celular ciclofilina A, que a su vez parece modular la función de NS5A por mecanismos que todavía no están completamente definidos (76).

- Inhibidores de MicroARN-122: Los microARN son una clase de pequeñas moléculas de ARN que regulan los niveles de ARN mensajero y / o la traducción de proteínas a través de interacciones directas específicas con sus dianas. Uno de estos microRNAs que se expresa en seres humanos es el miR-122, se expresa abundante y específicamente en el hígado. MiR-122 interactúa directamente con la región no codificante 5' del genoma de ARN del VHC y regula al alza los niveles de ARN viral en las células infectadas (77). Cabe destacar que todos los genotipos del VHC han conservado los sitios de unión de miR-122. Un oligonucleótido modificado diseñado para antagonizar miR-122 (miravirsén; Santaris Pharma) ha demostrado inhibir el ARN del VHC en chimpancés sin mostrar resistencia viral (78).

Además de esos dos bloques existen más líneas de investigación en cuanto a la terapia antiviral para VHC.

1.4.5.2. TERAPIAS PREVENTIVAS Y VACUNAS

Los pacientes con infección por VHC generan anticuerpos que son generalmente ineficaces a la hora de combatir la infección viral. La eliminación espontánea del VHC en personas con infección aguda está asociada con las respuestas de células T contra el VHC, y por lo tanto una vacuna exitosa probablemente tendrá que obtener tanto CD4 como células T CD8+. Desafortunadamente, la falta de un modelo animal de infección crónica por VHC es un impedimento importante en el desarrollo de vacunas. (79)

Conceptualmente, los objetivos de la vacunación de la hepatitis C pueden ser o bien para prevenir la infección crónica en el individuo recién infectado (vacunación preventiva) o para ayudar a combatir la infección crónica en el individuo ya infectado favoreciendo la respuesta inmune del huésped (vacunación terapéutica).

1.4.6. TERAPIAS PROBADAS CON LIMITADA EFICACIA (INCLUSO EN ALGÚN CASO INEFECTIVAS).

- El interferón lambda: El interferón lambda-1 (IL29) es un tipo de interferón con una actividad similar al interferón pegilado afa-2a. Sin embargo, los receptores para este IFN lambda son expresados en menor medida lo cual va asociado a una disminución de efectos adversos, con una actividad antiviral muy similar.
- Albinterferon: es una fusión del interferón con la albúmina. Mostró un perfil de seguridad mejor que el del IFN pero no mostró actividad antiviral relevante.
- La amantadina: un antiviral frente al virus de la gripe
- La nitazoxanida: un antiprotozoario, con actividad frente a diarreas causadas por *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*. Se ha usado en cultivos celulares comprobándose una actividad inhibitoria para replicación de VHB y VHC. Parece que el mecanismo de acción es mediante la fosforilación del las proteín kinasas del huésped que se acabará traduciendo en una inhibición de la replicación del VHC.

Otros tratamientos inefectivos: Son tratamientos que se han intentado usar con finalidad antiviral pero que en ningún caso se han logrado resultados relevantes.

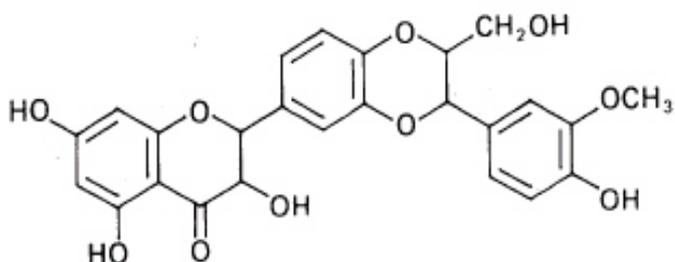
- Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE): ketoprofeno en asociación con IFN
- Las citocinas e inmunomoduladores, tales como granulocitos y macrófagos factor estimulante de colonias (GM-CSF) la interleucina-12, levamisol, la interleucina-2, y la monoterapia con extractos tímicos.
- Los antioxidantes como la N-acetilcisteína y la vitamina E.
- La hipericina, un derivado natural de la planta común de la hierba de San Juan.
- El ácido ursodesoxicólico (UDCA)

1.4.7.TERAPIAS ALTERNATIVAS O COMPLEMENTARIAS: SILIBINA
(CARDO MARIANO).

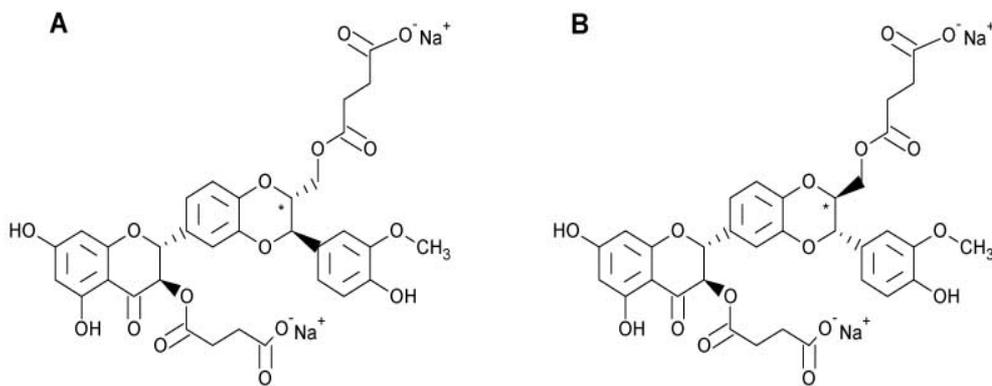
Ver apartado 1.5

1.5. PRODUCTO EN INVESTIGACIÓN: SILIBINA

1.5.1.ESTRUCTURA QUÍMICA Y COMPOSICIÓN:



Silibina



* Position of labeling

Silibina-C-2',3-dihidrógenosuccinato, sal disódica (Legalon®).

La silimarina es un extracto de flavonolignanos de las semillas del cardo mariano “Silybum marianum” que tiene a su vez varios componentes: Silidianina (10%), silicristina (20%), isosilibina (5%) y en mayor proporción (50- 60%) la silibina, que es

una mezcla en proporción 1:1 de los diastereoisómeros A y B, además presenta otros componentes minoritarios como la dehidrosilibina y algún flavonoide como la taxifolina (80).

1.5.2.ACTIVIDAD ANTIVIRAL:

Se ha demostrado que la silimarina inhibe la replicación de la cepa JFH1, un VHC genotipo 2a en cultivo de líneas celulares de hepatoma. El efecto antiviral fue atribuido parcialmente a la inducción por la silimarina de la ruta intracelular inducida por el IFN y parcialmente a inducción de rutas independientes del IFN (82)

Polyak y Cols han demostrado que la silimarina inhibe la actividad de la polimerasa del VHC NS5B, aunque a concentraciones de 5 a 10 veces mayor que la requerida para inhibir la infección de las células en cultivo por el VHC (HCVcc)

Por lo tanto aunque la silimarina inhibe la polimerasa NS5B del VHC, este único mecanismo no parece justificar todo el efecto antivírico atribuido al fármaco. La inhibición de la polimerasa NS5B sólo puede explicar en parte la acción antiviral. Estos autores demuestran que la silimarina bloquea la entrada del virus al hepatocito y la fusión, así como la replicación intracelular del virus.

También en el mismo modelo celular COIN1, estos mismos autores han demostrado que la silibina (El Legalon en dosis de 200 microM) disminuye la expresión de Ocludina y de la Claudina (La Ocludina y la Claudina son los componentes principales de las fuertes uniones que se han identificado recientemente como receptores de entrada del VHC a la célula). Disminuyó el RNA mensajero de Ocludina en un 25 % y de la Claudina en un 30 % e igualmente las proteínas Ocludina (56%) y Claudina (42%). Silimarina redujo el ARN del VHC (85%), la proteína core (84%) y la NS5A (80%) en células CON1.

Esto sugiere, por un lado, que disminuye la entrada del virus en la célula a través de la regulación de la Ocludina y la Claudina, y por otro, que tiene un efecto antivírico al inhibir la NS5A y la proteína core. Ambos efectos podrían traducirse en su acción antiviral en la replicación del VHC.

Ferenci, en un estudio clínico, demostró una significativa reducción de los niveles de ARN del VHC dosis-dependiente, en pacientes no respondedores a tratamiento con peg-IFN y ribavirina cuando recibían Legalon-IV, alcanzándose la respuesta más potente en cuanto a reducción de carga viral con 20 mg/kg al día en una sola dosis diaria (82)

Además de estos datos en modelos celulares y estudios clínicos, en 2011 la EMA publica un informe acerca de una revisión que realiza el Comité de Medicamentos Huérfanos (COMP: Committee for Orphan Medicinal Products) donde remarca la opinión de dicho comité de la Silibina-C-2'-3- dihidrógenosuccinato, sal disódica para la **prevención de la recurrencia de Hepatitis C en pacientes trasplantados de hígado**. (EMA/COMP/642562/2010)

1.5.3.ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA:

Esta planta se ha usado durante siglos como “hepatoprotector”. El mecanismo de acción no está totalmente claro, pero se ha descrito que la silibina tiene actividad antioxidante, inmunomoduladora, antifibrótica, antiproliferativa y antivírica.

Según diversos estudios encontrados en la literatura esta acción hepatoprotectora de la silibina se pueden explicar, por diversos mecanismos:

- Mecanismo antioxidante (83)
- Inhibición de la peroxidación lipídica (84)
- Estimulación de la ARN polimerasa ribosomal y la consecuente síntesis de proteínas, lo que lleva a una mayor regeneración de hepatocitos (85)
- Mejora la desintoxicación del hígado (86)
- Mejora la glucuronidación y la protección contra la depleción de glutathione (87)
- Efectos antiinflamatorios, incluyendo la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas y también mediante la inhibición de la migración de neutrófilos (88)
- Puede retardar o incluso revertir la fibrosis mediante la reducción de la conversión de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos (89)
- Anticarcinogénesis mediante la inhibición de las quinasas dependientes de ciclina y la detención del crecimiento de células cancerígenas.

- También tiene efectos inmunomoduladores en la enfermedad hepática. (90)

Por otro lado, se ha argumentado que muchos de los resultados discrepantes sobre la eficacia de la silimarina podrían explicarse por la falta de estandarización entre las diferentes presentaciones orales de silimarina (compuestos a base de “cardo mariano”), a este habría que añadir que hay países, como Estados Unidos donde las plantas medicinales no tienen una regulación específica.

En España la investigación con este tipo de productos (plantas medicinales) también carece de regulación específica, sin embargo la comercialización de cualquier planta medicinal sí está regulada.

Además hay estudios en los que también se ha usado este producto en tratamientos de cáncer e infección por VIH (91) en la línea de intentar mejorar la toxicidad de los fármacos quimioterápicos y antirretrovirales y también reducir la activación y proliferación celular.

También se ha usado en hipercolesterolemia y psoriasis (92,93,94)

1.5.4.FORMULACIÓN IV (LEGALÓN SIL)[®]

Legalon Sil comercializado desde el año 1997, por laboratorios Rottapharm, Moza (Italia) es un fármaco disponible como formulación intravenosa (liofilizado para solución para perfusión) en una mezcla aproximadamente de 1:1 de silibina A y B en sus formas dihidrogenosuccinato solubles en agua.

Se desarrolló originalmente para el tratamiento de la intoxicación por el hongo Amanita Phalloides. Tal y como se ha descrito en el apartado anterior y como está indicado en su Ficha Técnica (95). Un vial para perfusión contiene como principio activo: 598,5 mg de producto liofilizado que contiene 528,5 mg de silibina-C-2',3'-dihidrogenosuccinato disódico, equivalente a 350 mg de silibina.

Se ha usado siguiendo la pauta que indica ficha técnica: 20 mg/kg/día (95), que por otra parte es la que se usa en diversos estudios con actividad antiviral (96,97)

Como se viene comentando en este trabajo, este producto tiene un efecto antivírico directo en humanos tanto in vitro como in vivo y ya se ha usado en muchos trabajos publicados con éxito y de forma segura para enfermedades hepáticas terminales, lo cual justificaría el plantear la búsqueda de una formulación oral bioequivalente.

1.5.5.FORMULACIÓN ORAL (SILYFIT) ®



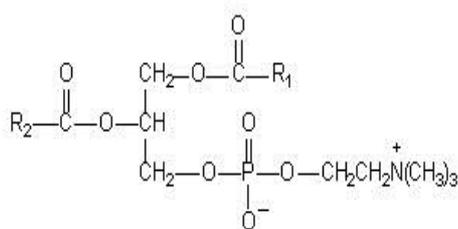
Figura 7: SilyFit: complejo silibina-fosfatidilcolina: Este envase contiene 60 cápsulas del complejo silibina-fosfatidilcolina, correspondientes a 40 mg de silibina por cápsula más 160 de fosfatidilcolina. De laboratorios 100%natural.

En el estudio se ha usado el complejo: silibina-fosfatidilcolina (SilyFit) que el propio laboratorio proporcionó de forma gratuita y que está aprobada y comercializada en España como planta medicinal.

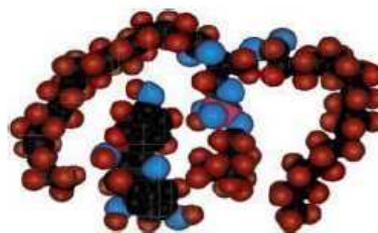
1.5.5.1.COMPLEJO: SILIBINA-FOSFATIDILCOLINA:

- **UNIÓN A FOSFATIDILCOLINA: FITOSOMA.**

Los fitosomas son combinaciones de componentes activos vegetales con fosfatidilcolina de soja. De modo que la sustancia activa vegetal se une a la cabeza de la fosfatidilcolina y las colas liposolubles envuelven este acoplamiento (sustancia activa + colina), formando pequeñas “bolas”



Fosfatidilcolina



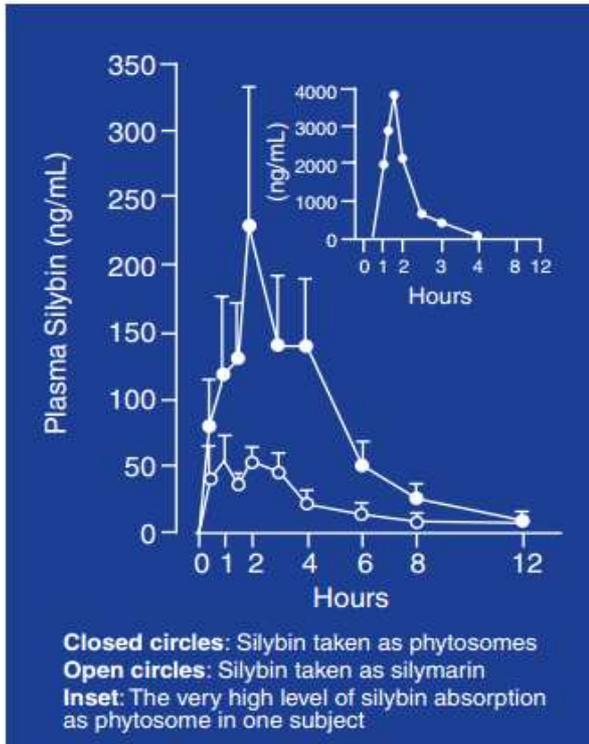
Fitosoma (Phitosome®)

1.5.5.2. PROPIEDADES DE LOS FITOSOMAS (SILIBINA-FOSFATIDILCOLINA):

- Los fitosomas se fusionan fácilmente con la membrana celular intestinal por su similitud estructural, favoreciéndose de forma espontánea la absorción de sustancias activas que en su mayor parte son hidrosolubles.
- Las colas liposolubles que rodean las sustancias activas la protegen contra los jugos digestivos y la acción destructora de ciertas bacterias intestinales.

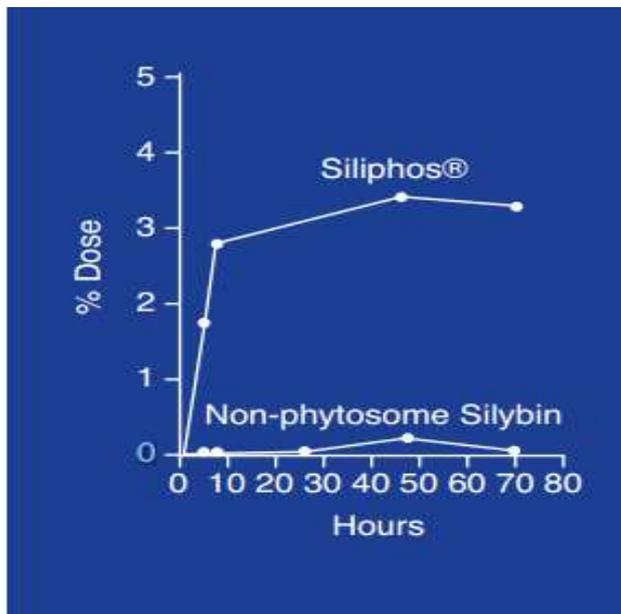
En este complejo (SilyFit®): silibina- fosfatidilcolina, se ha comprobado que la fosfatidilcolina:

- aumenta la absorción intestinal, que es una de las grandes limitaciones del producto cuando se administra por vía oral, aumentando su biodisponibilidad hasta 6 veces.
- además mejora la cantidad relativa y de la velocidad con la que la silibina alcanza sin cambios la circulación sistémica, y está, por tanto, disponible para hacer el efecto esperado.



Niveles en plasma de silibina, tras la administración de silibina unida a fosfatidilcolina y silibina convencional, en voluntarios sanos (360 mg de silibina en dosis única)

Kidd PM. *Altern Med Rev* 2009; 14 (3): 226-246



Niveles plasmáticos de silibina total después de la administración oral a ratas de 200 mg/kg de silibina (Siliphos®) y de la misma forma fitosomada, es decir, unido a la fosfatidilcolina (Non-phytosome Silybin)

Morrazzoni et al *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 1992;17:39-44

Las formulaciones orales que hay comercializadas: Legalón® 150 mg (98) y Silarine® (80 mg) no se consideraron una opción dada su baja disponibilidad. El hecho de existir

formulaciones como SilyFit® que forman el complejo Silibina-Fosfatidilcolina nos hace pensar en un aumento de la probabilidad de éxito del estudio a la hora de alcanzarse concentraciones plasmáticas detectables en sangre.

En nuestro país existen otras formulaciones a base de silibina (“cardo mariano”) pero en dosis muy bajas y sin ninguna combinación con fosfatidilcolina lo que hizo que tampoco fuesen una opción válida para el presente estudio.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA: ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL

La mayoría de los pacientes con infección por el VHC que son candidatos a trasplante hepático, están replicando en el momento del trasplante y como se ha comentado en el apartado anterior, la recurrencia de la infección es universal en estos pacientes (99). Esta infección determina un peor pronóstico en cuanto a supervivencia del injerto y del paciente. La supervivencia de los injertos VHC positivos a 1, 3 y 5 años fue del 76,9%, 66,4% y 56,8% frente a 80,1%, 73,3% y 67,7% entre los VHC negativos ($p < 0.0001$) según los datos publicados en un trabajo realizado por Lisa M. Forman et al en el año 2002 acerca de un estudio retrospectivo sobre 11.036 pacientes trasplantados entre 1992 y 1998 en Estados Unidos (*"The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation"*). En este estudio se vio también que la supervivencia de los pacientes VHC positivos, infectados por el VHC, fue de 86,4 %, 77,8 % y 69,9% a 1, 3 y 5 años frente a 87,5%, 81,8 % y 76,6 % en los VHC negativos ($p < 0.0001$). Según datos del registro español, también la supervivencia del injerto y de los pacientes trasplantados con infección por VHC fue significativamente menor a los 3 y 5 años que la de los pacientes trasplantados no infectados por este virus.

Por lo general, los pacientes recién trasplantados no son candidatos a ningún tratamiento antiviral dadas sus condiciones, se trata de pacientes inmunodeprimidos que además presentan varias comorbilidades y que en el momento del trasplante la carga viral aún es indetectable, con lo cual tratar a estos pacientes en ese momento estaría fuera de indicación. El problema de aplicar un tratamiento una vez se ha producido la recidiva es que puede resultar poco eficaz (< 30 % de RVS en genotipo 1 que el más frecuente).

En el momento actual, desarrollar un tratamiento eficaz que prevenga la infección del injerto supondría uno de los mayores avances en el trasplante hepático porque actuaría directamente evitando el daño directo e independiente que provoca el VHC sobre el nuevo órgano. Evitar esta reinfección del injerto, aunque solo ocurriera en un 20 % de los pacientes, y/o mitigar la aparición de formas severas, sería altamente rentable en términos médicos, sociales y económicos.

Tal y como se ha explicado en el apartado anterior (1.5), existen datos muy recientes y relevantes en la literatura médica sobre el potencial efecto antiviral de la silibina y su papel beneficioso como tratamiento pre/post-trasplante hepático para evitar la recurrencia de la infección por el VHC (100,101,102). Además, diversos estudios han demostrado que la silibina es un potente agente antiviral en pacientes con HCC que no han respondido a la terapia habitual con interferón pegilado y ribavirina. (96)

De entre sus múltiples acciones, destaca su actividad **hepatoprotectora**, antioxidante, antifibrótica y antiinflamatoria, propiedades que la convierten en un producto potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades crónicas hepáticas (106,96). Estimula la actividad de la polimerasa A de los nucleolos, con el consiguiente aumento de la síntesis proteica ribosomal incrementando la capacidad de regeneración del hígado y la producción de nuevos hepatocitos (107).

En cuanto a su actividad **antiviral**, ya se ha hablado de que la silibina inhibe la infección por el VHC principalmente por su efecto directo sobre la ARN polimerasa ARN-dependiente del virus, además de inhibir la entrada del VHC y la producción del virus infeccioso (108,109).

Los primeros resultados positivos con este fármaco (formulación intravenosa) aparecen a partir del año 2005(25) en pacientes coinfectados con VIH y VHC en los que el tratamiento estándar con RBV más Peg-IFN había fallado y en los que tras dos semanas de tratamiento con silibina iv la carga viral tanto de VHC como de VIH quedaron suprimidas. Tras 24 semanas se alcanzó RVS para VHC aunque la carga viral de VIH repuntó a las doce semanas. (21)

La dosis que se ha utilizado en el presente trabajo es la de 20 mg/kg/día que es la que ficha técnica recomienda para la intoxicación para *A.phalloides*. Además hay estudios

confirmatorios del efecto antiviral a esta dosis (que compara el efecto antiviral a 5,10,15 y 20 mg/kg/día en infusiones de 4 horas durante 7 ó 14 días).(96)

Estos datos fueron la base para el uso de silibina intravenosa en monoterapia durante dos semanas en pacientes trasplantados, con el fin de evitar la reinfección del injerto en estos pacientes. Este tratamiento logró suprimir/disminuir la carga viral en estos pacientes, sin embargo tras su retirada a los 21 días se comprobó que en la mayoría de los casos la carga viral de VHC repuntaba antes de las 24 semanas post-tratamiento (97). En este estudio piloto, que realiza en el año 2013 un equipo de Investigadores del Hospital Ramón y Cajal se analizan datos de 16 pacientes: 9 tratados con silibina iv en dosis 20 mg/kg inmediatamente antes del trasplante, en la fase anhepática y durante el trasplante y 21 días postrasplante, y 7 controles. Se analizaron niveles de VHC en sangre y diferentes parámetros de seguridad. En cuanto a la replicación del virus en sangre se obtuvieron los siguientes resultados: (97)

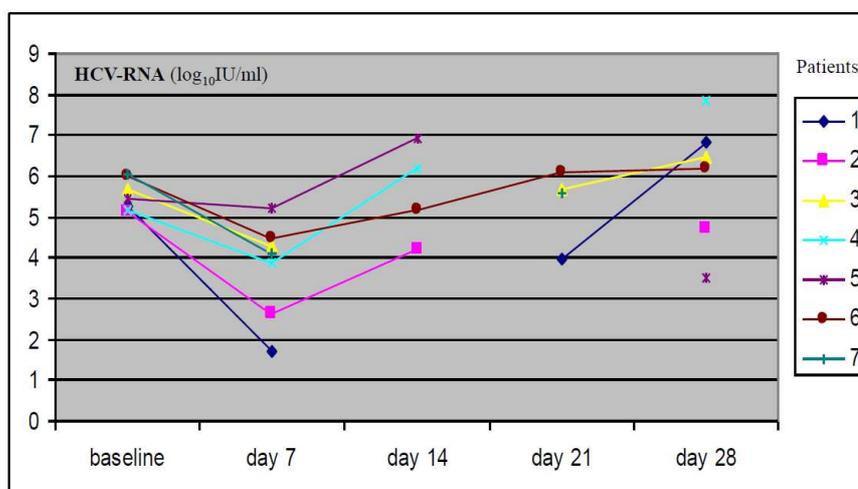


Figura 8: Valores de carga viral en el grupo control, sin Silibina iv (97)

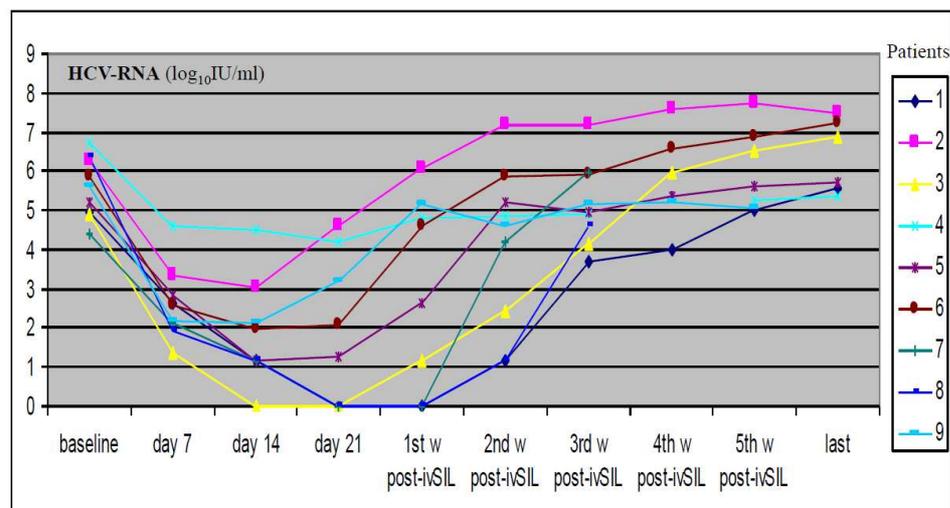


Figura 9: Valores de carga viral en pacientes trasplantados tratados con Silibina iv. (97)

La dosis de silibina iv utilizada en este estudio (20 mg/kg) dio lugar a una progresiva reducción de la carga viral de VHC. Esta reducción se mantuvo de forma progresiva conforme se administraba el fármaco (cae la carga viral (ARN-VHC) $4,1 \pm 1,3 \log_{10}$ IU / ml de media, en la semana 3). Sin embargo en este estudio también se observó que en todos los casos la carga viral repunta en una media de 3 semanas tras la finalización del tratamiento con silibina iv . En cuanto a la seguridad del fármaco, la dosis utilizada confirma la seguridad del fármaco, ya que no aparece ningún acontecimiento adverso relacionado con el fármaco.

Como conclusión, el estudio confirma que la monoterapia prolongada con silibina iv resulta segura en el periodo inmediatamente posterior al trasplante, y tiene un potente efecto antiviral con el consecuente bloqueo de la replicación del virus durante la administración del fármaco. Sin embargo la carga viral repunta en todos los casos después de la retirada del fármaco. Para que se mantuviera la inhibición de la replicación del VHC sería necesario mantener la terapia con silibina pero en este sentido, mantener de forma crónica la administración de silibina iv, es completamente inviable, lo cual deja una puerta abierta a la investigación de una terapia oral que permitiese administrar este fármaco de forma crónica, además de estudiar si una terapia combinada de silibina junto a algún antiviral más podría evitar o retrasar la reinfección del injerto en este tipo de pacientes.

En esta línea, actualmente en el Hospital Ramón y Cajal, se está llevando a cabo un ensayo clínico que promueve la Fundación de Investigación y que ha obtenido fondos públicos, en el que los pacientes son tratados con silibina i.v. (20 mg/kg/día) un día antes, durante y 21 días tras del trasplante, además se introduce Ribavirina a partir de la indetectabilidad de VHC en sangre desde el día 14 postrasplante, coincidiendo en ese caso doble terapia (RBV-SIL, 7 días, del 14 al 21). El objetivo del estudio está enfocado a evitar el repunte de la carga viral que se ha visto ocurre con la monoterapia de silibina en una media de 3 semanas tras la suspensión del tratamiento con silibina iv. Aún no se conocen los resultados definitivos del estudio, pero según datos preliminares ya hay algún paciente que ha alcanzado RVS.

Además de estos datos generados en diferentes ensayos clínicos, hay que destacar que en Diciembre 2011, la EMA publica un informe acerca de una revisión que realiza el Comité de Medicamentos Huérfanos (COMP: Committee for Orphan Medicinal Products) donde remarca la opinión de dicho comité de la Silibina-C-2'-3-dihidrógenosuccinato, sal disódica para la **prevención de la recurrencia de Hepatitis C en pacientes trasplantados de hígado**. (EMA/COMP/642562/2010). Este hecho refuerza la línea de investigación abierta con este fármaco, y por tanto con una futurible formulación oral que permitiese alargar el tratamiento, combinado o no con otros antivirales.

El problema que surge a la hora de plantear la administración de una formulación oral, es como ya se ha comentado, la baja biodisponibilidad de la silibina oral.

En principio, tal y como se apunta en el apartado 1.5, la biodisponibilidad de la silibina oral mejora en aproximadamente 6 veces en comparación con la silibina sin conjugar (104,112). Los estudios farmacocinéticos (PK) realizados tanto en voluntarios sanos como en pacientes con cirrosis hepática compensada han demostrado que tras una única dosis de silibina oral se alcanza un pico plasmático aproximadamente a las 2 horas tras la toma. Cuenta con vidas medias cortas de aproximadamente 4 horas, el equilibrio estacionario se alcanza a los 4 días de tratamiento con silibina-fosfatidilcolina, aunque se observa una amplia variabilidad interindividual en todo los parámetros PK sobre todo en lo referente a las concentraciones máximas. No se han observado cambios significativos en relación a la farmacocinética entre la exposición

única o repetida al fármaco. Así mismo, no se objetivaron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos de los voluntarios sanos frente a los de los pacientes con cirrosis hepática compensada.

A priori, sólo por tratarse de diferente vía de administración (iv y oral) sabemos que es necesario administrar dosis mayores de silibina por vía oral para obtener concentraciones plasmáticas similares, lo que podría traducirse en problema de toxicidad. En este sentido, existen publicaciones que indican que estamos ante un producto seguro: estudio fase I de búsqueda de dosis en pacientes con cáncer prostático se administraron diversas dosis de silibina oral (2.5gr, 5gr, 10gr, 13gr, 15gr y 20gr) con el fin de evaluar la toxicidad de dosis altas de silibina oral y recomendar una dosis para futuros ensayos. El único acontecimiento adverso observado fue una leve hiperbilirrubinemia asintomática que mejoraba tras la suspensión del tratamiento concluyendo por tanto, en que es un producto seguro y bien tolerado incluso administrado a dosis altas (113, 114)

En resumen, la experiencia acumulada hasta ahora parece indicar que:

- La silibina i.v se tolera bien en la fase anhepática y posthepática.
- La silibina, hasta 21 días después del TH, es capaz de inhibir o disminuir la carga viral con este tratamiento, pero en la mayoría de los casos esta carga viral repunta antes de las 24 semanas tras la retirada del fármaco que es el tiempo establecido para considerar la RVS.

Lo cual nos lleva a plantearnos el presente trabajo, bajo la premisa de que quizá se podría evitar la reinfección del injerto complementando el tratamiento de silibina iv desde el momento del trasplante, con una formulación oral

Además hemos comprobado que no existen datos publicados en la literatura que describan el perfil farmacocinético de la silibina intravenosa en voluntarios sanos, ni ningún estudio en el que se compare ésta con la silibina administrada por vía oral (ya sea combinada con fosfatidilcolina o sin combinar), por lo que es imposible estimar la dosis oral que podría ser equivalente a la intravenosa.

Este dato sería de mucha utilidad, ya que permitiría evaluar, como venimos comentando, su uso de forma crónica, en un posterior estudio fase II-III de eficacia y seguridad. En estos estudios se valoraría la dosis oral necesaria de administración de silibina peritrasplante así como el tiempo de duración del tratamiento para garantizar una mayor supervivencia del injerto y por tanto del paciente trasplantado.

Además, el contar con una formulación oral con un buen perfil eficacia/seguridad, podría tener impacto económico, en términos de ahorro al no tener que acudir el paciente al hospital a inyectarse las sucesivas dosis i.v postrasplante, en este sentido resultaría mucho más cómodo para el paciente recién trasplantado y favorecería el cumplimiento terapéutico con una mejoría evidente en su calidad de vida.

2.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.2.1. HIPÓTESIS

Nos proponemos describir la farmacocinética de las dos formulaciones de silibina: producto liofilizado para infusión intravenosa y combinado con fosfatidilcolina para administración oral, y calcular la biodisponibilidad oral de la silibina, para así poder estimar la dosis oral a administrar en futuros estudios que se deberán llevar a cabo para evaluar la eficacia y seguridad de la silibina, intravenosa y/o oral, en el trasplante hepático.

2.2.2. OBJETIVO PRIMARIO

- Describir la biodisponibilidad oral de la silibina oral mediante el cálculo del Área Bajo la Curva (AUC_{0-∞} y AUC₀₋₁₂) tras la administración de la misma dosis de silibina por vía oral (AUC_o) e intravenosa (AUC_{iv}).

2.2.3.OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir el perfil farmacocinético (C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$) tras dosis única de ambos preparados: producto liofilizado para infusión intravenosa y combinado con fosfatidilcolina para administración oral.
- Estimar el coeficiente de variación (CV) interindividual.
- Evaluar la seguridad (acontecimientos adversos, alteraciones analíticas) y tolerabilidad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Ensayo clínico abierto, cruzado y aleatorizado de biodisponibilidad absoluta de silibina por vía oral.

3.2. INVESTIGADORES

Principal: Mónica Aguilar Jiménez

Colaboradores: M^a Luisa Serrano Olmeda, M^a Ángeles Gálvez Múgica, Itziar López de Abechuco, , Amaya Revilla Monaj.

Servicio de Farmacología Clínica

Hospital Ramón y Cajal

3.3. PROMOTOR

Fundación par la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal.

Ctra. Colmenar Viejo Km 9,100 28034 Madrid

3.4. MONITOR DEL ESTUDIO

Unidad de ensayos clínicos e investigación Clínica

Planta 7 Izda. Hospital Ramón y Cajal

3.5. COMPROMISOS ÉTICOS

El estudio se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki, sucesivamente modificada en las distintas asambleas médicas mundiales, y la legislación española en materia de Ensayos Clínicos en seres humanos. El protocolo del ensayo fue revisado y evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Ramón y Cajal que emitió dictamen favorable el 5 de noviembre de 2012 y aprobado por la por la Agencia Española del Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) el 30 de agosto de 2013 (ver anexo III). Además de ambas aprobaciones, según exige la legislación vigente, el estudio contó con una póliza de seguro de responsabilidad civil y se firmó un contrato entre promotor, investigador y centro.

La medicación fue adquirida por parte del promotor, en este caso fue el Servicio de Farmacia el encargado de realizar la compra, con la partida para medicación que la Mutua Madrileña había concedido y fue etiquetada acorde a la Normativa Vigente: Anexo 13 de las Normas de correcta Fabricación.

Antes de comenzar con el reclutamiento de sujetos, el monitor, realizó una visita de inicio con el Equipo Investigador y con el Servicio de Farmacia donde se pudo revisar que todo estaba listo para poder comenzar a desarrollarse el estudio.

Los sujetos participantes dieron su consentimiento por escrito antes de comenzar los procedimientos previstos para su inclusión en el estudio. Los sujetos fueron informados de su derecho a abandonar el estudio en cualquier momento.

El Equipo Investigador ha cumplido desde el inicio con lo dispuesto en las Normas de Buena Práctica Clínica, el RD 223/2004 de Ensayos Clínicos y legislación vigente.

La guía de BPCs es una norma internacional de calidad ética y científica aplicable al diseño, realización, registro y comunicación de ensayos clínicos en los que participen seres humanos. El cumplimiento de esta norma proporciona una garantía pública de la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos del ensayo e acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, así como también garantiza la credibilidad de los datos del ensayo clínico.

El objetivo de estas Normas BPC de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, International Conference on Harmonisation) es proporcionar una norma única para la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos, facilitando de este modo la aceptación

muta de datos clínicos por parte de las autoridades reguladoras de estas jurisdicciones. En esta guía quedan especificados las obligaciones de cada parte implicada, especialmente de Promotor e Investigador, así como todo lo relativo a la guarda y custodia de la documentación que se genera en el estudio.

Por último cabe destacar que para realizar esta guía (en vigor desde el año 1996) se han tenido en cuenta las guías de BPC existentes en la Unión Europea, Japón y los Estados Unidos, además de las procedentes de Australia, Canadá, Países Nórdicos y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

3.6. SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD DEL ESTUDIO

Durante el estudio se llevaron a cabo los siguientes controles de calidad:

- Monitorización: Durante el desarrollo de este ensayo clínico se realizó una visita de inicio con el Equipo Investigador y en el Servicio de Farmacia del centro, 2 visitas de monitorización donde se iban verificando los datos recogidos y el cumplimiento de BPCs por parte de todas las partes implicadas. Finalmente se realizó una visita de cierre con el Equipo Investigador y con el Servicio de Farmacia, donde se verificó que no quedaban hallazgos ni acontecimientos adversos pendientes de resolver ni documentación pendiente de obtener y archivar. En dicha visita también se verificó la correcta contabilidad del producto en investigación (certificado con el documento de destrucción firmado en 07 de Noviembre de 2013). El archivo de farmacia queda custodiado por el propio servicio de farmacia durante el tiempo establecido por la legislación vigente. El archivo del investigador y promotor quedará custodiado bajo la responsabilidad del Investigador Principal durante el tiempo establecido por la legislación vigente.
- Documento en el que se anotaba el personal (médico y enfermera) responsable de los procedimientos realizados cada día del estudio, así como los voluntarios que ingresaban cada día.
- Registro de incidencias en la obtención de las muestras. Las incidencias con las muestras se anotaban en la hoja de extracciones de farmacocinética que se archivaban con la documentación fuente propia de cada paciente.

- Registro de almacenamiento de las muestras. El almacenamiento de las muestras se anotaba en las hojas de registro de las muestras. Ésta última hoja era firmada por la persona que se encargaba del almacenamiento.
- Control diario de temperatura del congelador donde se almacenaron las muestras del estudio. Hoja de registro de firmas de todas las personas que colaboraron en el ensayo.
- Revisión sistemática (comprobación por duplicado) de la existencia de correspondencia entre el tratamiento a administrar a cada voluntario y la hoja de aleatorización.
- Revisión sistemática por dos investigadores distintos de todos los datos registrados en la base de datos del estudio.
- Revisión sistemática por dos investigadores distintos de la mecanización de los resultados de las concentraciones de silibina para su análisis cinético y estadístico.

3.7. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES:

A continuación se detallan los criterios de inclusión y exclusión tal y como se especificaban en el protocolo del estudio:

3.7.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes, que tras haber recibir información sobre el diseño, los fines del estudio, los posibles riesgos que de él pueden derivarse y de que en cualquier momento pueden denegar su colaboración, otorguen por escrito su consentimiento para participar en el estudio
- Entender el propósito del estudio y estar disponibles para realizar los ingresos y las visitas al hospital.
- Edad comprendida entre 18 y 45 años.
- Sujetos libres de patología orgánica o psíquica.

- Historia clínica y exploración física dentro de la normalidad.
- No presentar anormalidades clínicamente relevantes en los análisis de hematología, bioquímica, virología y orina.
- Signos vitales y registro electrocardiográfico dentro de la normalidad.
- Los varones con pareja en edad fértil deben comprometerse a utilizar un método anticonceptivo de gran eficacia (como esterilización quirúrgica, método de doble barrera,) y a continuar utilizándolos hasta 6 meses después de la última dosis de tratamiento.

3.7.2.CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Sujetos afectos de patología orgánica o psíquica. Previamente a la inclusión de cualquier voluntario se considerarán todos los parámetros de seguridad referidos en el protocolo. Serán excluidos aquellos que presenten alteraciones analíticas clínicamente significativas, o en los que los marcadores bioquímicos de daño renal y/o hepático, se alejen del rango de normalidad marcado por el laboratorio.
- Sujetos que hayan recibido tratamiento farmacológico de prescripción en los últimos 15 días o algún tipo de medicamento en las 48 horas antes de recibir la medicación en estudio.
- Sujetos con IMC que no esté comprendido entre 18 y 30.
- Antecedentes de hipersensibilidad a cualquier fármaco
- Sospecha de consumo de drogas de abuso.
- Consumidores diarios de alcohol y/o intoxicación etílica aguda en la última semana.
- Sujetos fumadores.
- Haber donado sangre en los tres últimos meses.
- Participación en algún otro estudio con fármacos en investigación en los 3 meses previos

- Incapacidad para seguir las instrucciones o colaborar durante el desarrollo del estudio.

3.8. RESTRICCIONES

Las definidas por los criterios de inclusión y exclusión de este ensayo clínico.

3.9. ABANDONOS

No hubo ningún abandono.

3.10. TRATAMIENTO

3.10.1. MEDICACIÓN DEL ESTUDIO

Tratamiento A: Silibina combinada con fosfatidilcolina.

Cápsulas de 40 mg de silibina (complejo silibina- fosfatidilcolina) por vía oral, comercializado como complemento alimenticio a base de plantas (SilyFit®): Se administrarán 9 cápsulas en total.

Dosis por sujeto: 360 mg de silibina administrada en 9 cápsulas

Vía de administración: Oral

Tratamiento B: Legalon SIL, ampollas.

Dosis por sujeto: 1 ampolla que contiene 350 mg de silibina, dosis única

Vía de administración: Intravenosa

Los tratamientos se administraron con un período de lavado entre ellos de 7 días.

En la tabla 1 se recoge el número de lote y la fecha de caducidad de los fármacos en estudio lo cual permite asegurar la correcta trazabilidad de los productos utilizados, obligatoria en la realización de un ensayo clínico, según Normas de Buena Práctica Clínica y legislación vigente.

FÁRMACO	FORMULACIÓN	DOSIS SILIBINA	LOTE	CADUCIDAD
Legalon SIL®	Solución para perfusión	350 mg	1100001	05/2014
SilyFit®	cápsulas	40mg	SP/12J03	10/2015

Tabla 2. Formulación, dosis, fecha de caducidad y lote de los fármacos en estudio

3.11. RELACIÓN ENTRE LA ADMINISTRACIÓN DEL FÁRMACO Y LA INGESTA

Con el fin de disminuir en lo posible la variabilidad interindividual en la absorción del fármaco, se establecieron restricciones en la dieta de los voluntarios, prohibiéndoles el consumo de bebidas alcohólicas durante todo el ensayo, y de café, té, chocolate y refrescos con cafeína, desde 48 horas previas a cada uno de los días de ingreso y hasta la última extracción de sangre. Por la misma razón, la dieta durante el ingreso fue la misma para todos los voluntarios en las dos fases de ingreso. Los participantes mantuvieron el ayuno desde las diez horas previas (22:00 h del día anterior) y hasta las cinco horas siguientes a la administración de la medicación, momento en el que recibieron la comida estándar (14:00-15:00 h del día del estudio), que consistió en un primer plato de pasta, segundo plato de pechuga de pollo empanada con patatas, y de postre fruta. La merienda (bocadillo de jamón y queso) se administró a las nueve horas de la toma de la medicación (entre las 18:00 y las 19:00 h). No tomaron nada más dentro de la UEC.

3.11.1. ADMINISTRACIÓN DE LÍQUIDOS

Restringido durante la mañana: 200 ml de agua coincidiendo con la toma de la medicación oral. Sin limitación a partir de la hora de la comida (14:00 h).

3.11.2. ACTIVIDAD FÍSICA

La actividad física se restringió al mínimo imprescindible, manteniéndose el reposo en decúbito supino durante las cinco horas posteriores a la administración de la medicación, es decir, hasta la hora de la comida y permitiendo que se levantaran por la tarde. No se permitió realizar esfuerzo físico intenso durante el desarrollo del estudio.

3.12. CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO

La medicación se administró en presencia de uno de los investigadores del estudio, asegurando de este modo el correcto cumplimiento terapéutico.

3.13. MEDICACIÓN PREVIA Y CONCOMITANTE

No se permitió la toma de ninguna medicación durante el desarrollo del estudio sin el consentimiento de algún miembro del equipo investigador. En lo que se refiere a la medicación previa, se excluyó a los voluntarios que hubieran tomado algún tratamiento de prescripción médica en los 15 días previos al estudio o cualquier tipo de medicación 48 horas antes de recibir los fármacos del estudio.

Los voluntarios que durante el curso del ensayo clínico necesitaron cualquier tipo de tratamiento concomitante lo notificaron al médico investigador, anotando éste en la hoja de seguimiento individual, la dosis, la razón, la vía de administración y la duración del tratamiento.

3.14. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En la Tabla 3 se detallan los procedimientos del estudio.

<i>Día</i>	<i>Basal</i>	<i>Día 1 de ingreso</i>	<i>Día 2 de ingreso</i>	<i>Visita de seguridad</i>
Consentimiento informado	X			
Historia clínica	X	X	X	X
Exploración física¹	X	X	X	X
Criterios de inclusión	X			
Determinaciones de laboratorio²	X			X
Administración de fármacos		X	X	
Extracción de muestras para PK		X	X	
Evaluación acontecimientos adversos	X	X	X	X

¹ Incluye frecuencia cardíaca y tensión arterial.

² Incluye la monitorización hematológica y bioquímica habitual.

Tabla 3. Procedimientos del estudio

3.15. SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES

La fase de reclutamiento se desarrolló durante tres semanas, desde el 23 de septiembre hasta el 4 de octubre de 2013. El personal de la Unidad de Ensayos Clínicos (UEC) entrevistó a los posibles voluntarios, que recibieron información oral y por escrito, sobre la naturaleza, objetivos, sistemática y riesgos del ensayo y posteriormente firmaron el consentimiento informado.

A los voluntarios que firmaron el consentimiento informado se les realizaron los siguientes procedimientos antes de decidir su inclusión en el estudio:

Historia clínica que incluía antecedentes personales y anamnesis por aparatos.

Exploración física completa que incluía talla, peso corporal y temperatura.

Frecuencia cardiaca (FC) y presión arterial (PA) sistólica y diastólica.

Electrocardiograma de 12 derivaciones estándar, registrado tras 5 minutos de reposo en decúbito supino.

Determinaciones de hematología, bioquímica, serología y análisis de orina.

Todos los voluntarios se abstuvieron de realizar esfuerzos físicos intensos y de ingerir bebidas alcohólicas o estimulantes (café, té, chocolate, coca-cola o derivados) o zumo de pomelo desde las 48 horas antes del inicio de cada uno de los días de ingreso y hasta la última extracción de sangre. Los voluntarios no podían fumar en ningún momento del estudio porque ser fumador era un criterio de exclusión.

Tras su inclusión, los pacientes fueron asignados a uno de los dos grupos del estudio que recibieron los siguientes tratamientos de forma aleatorizada:

A) SilyFit® (complejo silibina-fosfatidilcolina): 9 capsulas que contenían 40mg de silibina cada una v.o con 250 ml de agua a tomar en un mismo tiempo.

B) Legalon Sil®: 350 mg liofilizado para solución para perfusión. 1 ampolla en dosis única, diluida en 100 ml de SF, por vía intravenosa a pasar en 2h (50ml/h) por bomba de infusión.

3.16. CONTROL DE SEGURIDAD

La semana siguiente (± 3 días) tras finalizar el segundo periodo, los voluntarios acudieron a la UEC para realizar la visita de seguridad, se les realizó una exploración física completa con registro de PA, FC y ECG. Además se extrajo sangre para el análisis de seguridad (hemograma y bioquímica), y orina para un análisis rutinario.

Como control de seguridad se realizó una exploración física, toma de constantes vitales y un ECG para la medición del QTc (recogiéndose y registrándose en el CRD la duración, en mseg, de los intervalos QRS, PR y QTc) en el periodo de reclutamiento, al inicio del estudio, cada uno de los días de ingreso y en la visita de seguridad.

Además, se realizaron análisis de sangre (hematología, bioquímica) y de orina en la fase de reclutamiento de los voluntarios y al final del estudio, en la visita de seguridad. También se realizaron serologías de hepatitis B, hepatitis C y VIH en el periodo de reclutamiento.

3.17. FASE DE TRATAMIENTO

Cada uno de los días de ingreso, los voluntarios acudieron a la UEC a las 8:00 de la mañana, en ayunas de al menos 10 horas, permaneciendo ingresados durante 12 horas aproximadamente. Cada día ingresaron 8 voluntarios en la UEC. El registro de la tensión arterial y frecuencia cardiaca, la exploración física, el ECG y temperatura, se realizaron antes de la administración de la medicación del estudio.

El primer voluntario recibió la medicación a las 9:00 horas; el segundo, a los cinco minutos del primero; el tercero, a los cinco minutos del segundo y así sucesivamente los 8 voluntarios. La hora de administración se anotó en el lugar correspondiente del Cuaderno de Recogida de Datos. Durante el ingreso en la UEC los sujetos permanecieron en ayunas, en posición de decúbito, hasta 5 horas después de la administración de la medicación.

Durante el ingreso en la UEC, se realizaron extracciones de sangre de 10 ml, en tubos heparinizados, previo a la administración del preparado correspondiente (basal) y en los siguientes tiempos después de su administración: 20min, 40min, 1h, 1h20min, 1h40min 2h, 2h30min, 3h, 4h, 6h, 8h y las 12h. Tras la administración IV además se realizarán extracciones a los 5min y 10 min. Tras la extracción correspondiente a las 12h, los voluntarios abandonaron la UEC. Durante su estancia en la UEC se encontraron bajo la supervisión de un miembro del equipo investigador, un médico y una enfermera. Estos días además se realizó un registro de la presión arterial, frecuencia cardiaca y ECG y se les preguntó acerca de la posible aparición de acontecimientos adversos.

Los mismos procedimientos se repitieron en el periodo 2 de tratamiento (segundo ingreso), 1 semana después del primer ingreso.

Para cada voluntario la duración global del estudio fue de unos 30 días, desde el reclutamiento hasta la última exploración y se llevó a cabo de acuerdo con los esquemas que figuran en las Tablas 3 y 4.

Fase de tratamiento					
		Periodo 1	Lavado	Periodo 2	
Día de ingreso	Extracción basal	8:00-9:00		8:00-9:00	
	Adm. medicación	9:00-9:35		9:00-9:35	
	Extracciones de sangre (tiempo tras la administración del fármaco)	5 min (si IV)			5 min (si IV)
		10 min (si IV)			10 min (si IV)
		20min			20min
		40min			40min
		1h			1h
		1h20min			1h20min
		1h40min			1h40min
		2h			2h
		2h30min			2h30min
		3h			3h
4h			4h		
6h			6h		
8h			8h		
12h			12h		

Tabla 4. Plan general de las extracciones de sangre

3.17.1. DETERMINACIONES DE LABORATORIO

Hematología clínica: hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media, concentración de hemoglobina corpuscular media, plaquetas, leucocitos, fórmula leucocitaria y actividad de protrombina.

Bioquímica clínica: SGOT, SGPT, LDH, fosfatasa alcalina, GGT, bilirrubina total, ácido úrico, creatinina, urea, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, glucemia, proteínas totales, colesterol y triglicéridos.

Serología: VIH Ac; Hepatitis C Ac; Hepatitis B Ag de superficie.

Análisis de orina: elemental y sedimento.

Esta batería de pruebas compuso el análisis de laboratorio de las fases de reclutamiento, y seguimiento.

Estos análisis se realizaron en el laboratorio de bioquímica y microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid).

3.17.2. PROCEDIMIENTOS DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS (PA, FC Y ECG)

Presión arterial y frecuencia cardiaca: en las visitas de selección, los días de ingreso y en las visitas de seguimiento se determinó la presión arterial y frecuencia cardiaca conforme a los protocolos establecidos en la unidad.

Electrocardiograma: se realizó en la visita de selección y en los dos días de ingreso.

3.17.3. PERIODO DE LAVADO

Se estableció un periodo de lavado de al menos 7 días entre los dos periodos de tratamiento, tiempo suficiente para la eliminación completa de silibina.

- Causas de retirada del estudio.

No hubo ninguna retirada del estudio.

3.17.4. ENMASCARAMIENTO DE LAS DETERMINACIONES

La determinación de las concentraciones plasmáticas de silibina se realizó por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem (triple cuádruplo) por Laboratorios Dr. Echevarne. Las muestras se enviaron etiquetadas con el código del estudio, nº del voluntario, periodo del estudio, punto de extracción al que corresponde y el número de alícuota del que se trata manteniéndose ciega la medicación de estudio que había correspondido en cada periodo.

3.17.5. RECOGIDA E INTERPRETACIÓN DE ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Se considera acontecimiento adverso a todo aquel suceso médico indeseable que ocurre en un paciente o en un sujeto en investigación clínica al que se le ha administrado un producto farmacéutico, aunque el suceso no tenga necesariamente que tener una relación causal con el tratamiento. Un Acontecimiento Adverso (AA) puede ser un signo, síntoma, hallazgo de laboratorio o resultado de una prueba anormal.

Tal y como se especificaba en el protocolo, el equipo investigador ha realizado un seguimiento de los posibles acontecimientos adversos a la medicación que surgieron a lo largo del estudio, recogándose el momento de aparición, su duración, intensidad, curso y desenlace, a fin de realizar una evaluación de la relación de causalidad entre el acontecimiento adverso y el medicamento. El período de comunicación de un acontecimiento adverso comienza en el tras la firma del consentimiento informado y continúa hasta el último seguimiento del sujeto.

Al inicio de cada visita y coincidiendo con todas las extracciones de sangre se preguntó a los participantes sobre la posible aparición de cualquier acontecimiento adverso mediante una pregunta genérica del tipo “¿ha notado algo desde la toma de la medicación?”. También se recogieron los acontecimientos adversos descritos espontáneamente por los voluntarios. Cada acontecimiento adverso se describió temporalmente.

Los acontecimientos adversos en este estudio se clasificarán en base a su relación de causalidad con el fármaco como:

- Posiblemente/probablemente relacionados:

Si existe sospecha razonable de una posible o probable relación: existe secuencia temporal razonable entre la administración del producto en investigación y la aparición del acontecimiento adverso y el AA no puede atribuirse razonablemente a cualquier otra causa alternativa.

- No relacionados:

Existe secuencia temporal razonable entre la administración del producto en investigación y la aparición del acontecimiento adverso, pero dicho acontecimiento puede ser explicado por causas alternativas; o bien no existe secuencia temporal razonable entre la administración del fármaco y la aparición del acontecimiento adverso.

Para todos los AA observados, el investigador usó las siguientes definiciones para calificar la intensidad de cualquier AA recogido durante el estudio en el CRD:

- Leve: aquella que no causa limitación en las actividades cotidianas.
- Moderado: aquella que causa alguna limitación en la realización de las actividades cotidianas.
- Severo: aquella que impide la realización de las actividades cotidianas.

Cuando resultaba complicado incluir un AA en alguna categoría se adoptó el criterio del investigador.

El AA se clasificó también en base a su gravedad. En general se consideraron acontecimientos adversos graves (AAG) todos aquellos AA que cumplieran alguno de los siguientes criterios:

- Que produzca la muerte.
- Que ponga en peligro la vida.
- Que requiera hospitalización o la prolongación de una hospitalización ya existente.
- Que cause invalidez o incapacidad permanente o significativa.

Que ponga en evidencia una anomalía o malformación congénita.

Se consideren médicamente importantes, entendiendo como tal aquella que precise de un tratamiento intensivo urgente para evitar uno de los desenlaces anteriormente mencionados.

Se consideró un acontecimiento adverso inesperado aquella experiencia no descrita (en naturaleza, gravedad o frecuencia) en el manual del producto que en este caso fue la Ficha técnica vigente de Silibina.

Se formó a los investigadores para que comunicaran inmediatamente al promotor (siempre dentro de las 24 horas siguientes a su conocimiento) todos los AAG, en el formulario diseñado a tal efecto (Formulario de notificación de AAG). Esta

comunicación inicial fue seguida de comunicaciones escritas pormenorizadas. El investigador realizó el seguimiento del AA hasta su resolución, vuelta a la situación basal o hasta la estabilización en caso de una afectación permanente.

El periodo de notificación comprendió desde el momento en el que el paciente firmó el consentimiento informado hasta 30 días después de la administración de la última dosis.

El promotor era el encargado de notificar a la AEMPS, CEIC implicado (CEIC del Hospital Ramón y Cajal) y órgano competente de la Comunidad Autónoma dónde se realiza el ensayo clínico (Comunidad Autónoma de Madrid), las sospechas de reacciones adversas graves y a la vez inesperadas asociadas a los medicamentos en investigación según lo establecido en la normativa vigente. El plazo máximo de notificación era de 15 días, excepto cuando la sospecha de reacción adversa grave e inesperada haya ocasionado la muerte del sujeto, o puesto en peligro su vida, que se comunicaría en los 7 días naturales después de su conocimiento, pudiendo completar la información en los 8 días siguientes.

Los acontecimientos adversos no graves y aquellos que se consideren no relacionados con los tratamientos en estudio no tenían que ser notificados pero si incluidos de forma tabulada en el cuaderno de recogida de datos y en el informe final del ensayo clínico.

3.18. ANÁLISIS CINÉTICO

3.18.1. TIEMPOS DE MUESTREO

Se recogen en la Tabla 4.

3.18.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En cada extracción de sangre se usaron por paciente dos tubos de 4 ml estériles con EDTA K2E.

Todas las extracciones se realizaron obteniendo la muestra de una vía venosa periférica empleando un sistema de vacío Vacutainer®.

Tras la extracción, la enfermera invirtió de 4-5 veces los tubos, para permitir la mezcla del contenido de sangre con el EDTA y lo depositó en una gradilla. Una vez obtenidas las ocho muestras correspondientes a los voluntarios ingresados, el responsable de procesar las muestras las trasladó a una centrífuga.

Los tubos se centrifugaron durante 10 min a 3000 r.p.m. y a 4° C. Una vez centrifugados se recogió el plasma sobrenadante y se guardaron tres alícuotas, una de ellas de reserva, en criotubos debidamente etiquetados, que tenían al menos 1 ml de plasma. Las alícuotas se almacenaron en un congelador de -80° C. Diariamente se registraron las temperaturas del congelador durante el periodo de almacenamiento de las muestras. El envío de dos de las muestras se realizó en hielo seco a Laboratorio Echevarne, quedando las de reserva en la unidad para poder ser utilizadas en caso de haber algún problema con las primeras, en cuyo caso se enviarían también en hielo seco a Laboratorio Echevarne.

3.18.3. MÉTODO ANALÍTICO

La determinación en plasma de silibina se realizó mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas en tandem (triple cuadruplo) por Laboratorios Dr. Echevarne.

3.18.4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

El análisis farmacocinético se realizó en la Unidad de Farmacología del Hospital Universitario Ramón y Cajal empleando el programa WinNonlin (Scientific Consulting, Inc, Cary USA), Versión 2.0, según una aproximación independiente de modelo.

Todos los cálculos se llevaron a cabo utilizando los tiempos teóricos de extracción de las muestras (anexo I), porque las desviaciones con respecto a los tiempos reales fueron mínimas (menores del 2%).

El AUC total ($AUC_{0-\infty}$) se calcula mediante la suma de dos AUC parciales: a) AUC_{0-t} , entre el tiempo anterior al primero con concentraciones detectables y el último con concentraciones detectables, calculada mediante la regla trapezoidal; y b) $AUC_{t-\infty}$, calculada como el cociente C/k , siendo C la última concentración detectable y k la pendiente de la recta obtenida mediante regresión lineal a partir de los puntos correspondientes a la fase de eliminación del fármaco. Para determinar el número de puntos utilizados en el cálculo de k , WinNonlin comienza la regresión a partir de los últimos tres puntos detectables, calculando R^2 ajustado al número de puntos añadiendo en cada paso un cuarto, quinto... punto. Se estima entonces la pendiente de la recta de eliminación con los puntos que proporcionen el R^2 ajustado más alto, mediante una regresión lineal del logaritmo natural de las concentraciones.

La concentración máxima (C_{max}) y el tiempo para alcanzarla (T_{max}) se obtienen directamente a partir de los datos de las concentraciones plasmáticas. La vida media de eliminación ($t_{1/2}$), calculada con la fórmula $\ln 2/k$, y el tiempo de residencia medio (MRT) se calcularon tras realizar el ajuste independiente del modelo. Mediante un modelo no compartimental se calcula el aclaramiento (Cl) ajustado a la biodisponibilidad (F) con la fórmula $Cl/F = \text{dosis}/AUC_{0-\infty}$, y el volumen de distribución (V_d), ajustado a la biodisponibilidad, con la fórmula $V_d/F = Cl/k$.

3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.19.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

No existen datos publicados en la literatura que describan el perfil farmacocinético de la silibina intravenosa, ni ningún estudio en el que se compare ésta con la silibina administrada por vía oral (ya sea combinada con fosfatidilcolina o sin combinar) por lo que consideramos que, dado que se trata de un estudio piloto, es suficiente con incluir a 8 voluntarios para obtener una descripción de la P_k de cada uno de los preparados estudiados. Todos fueron varones para reducir al máximo la variabilidad de la muestra.

3.19.2. MÉTODO DE ALEATORIZACIÓN

La asignación del tratamiento se ha realizado mediante una aleatorización en bloques (AB, BA) utilizando el programa informático MAS Ver 2.1 (Glaxo Wellcome).

Por cuestiones logísticas y de seguridad se ha considerado necesario que en cada sala de hospitalización de la UEC se administren los dos tratamientos de forma equitativa (es decir, que dos de los voluntarios tomen el tratamiento A y otros dos el tratamiento B). Los tratamientos correspondientes a cada uno de las ramas de tratamiento fueron los siguientes:

- **A:** SilyFit[®], 9 cápsulas de 40 mg de silibina-fosfatidilcolina por vía oral
- **B:** LEGALON SIL 1 ampolla 350mg de silibina por vía IV

Por ello, en el programa se introdujeron las secuencias necesarias para cumplir con dicha condición: AB y BA y se procedió a aleatorizar el orden de las secuencias que fueron asignadas a los voluntarios en orden rigurosos conforme fueron llegando a la Unidad de Ensayos Clínicos (Ver tabla 5)

Nº DE SCREENING	Nº DE RANDOMIZACIÓN	SECUENCIA ASIGNADA
PK-10	1	AB
PK-03	2	BA
PK-12	3	AB
PK-01	4	BA
PK-06	5	AB
PK-02	6	BA
PK-15	7	BA
PK-05	8	AB

Tabla 5. Asignación aleatoria del tratamiento

3.19.3. EVALUACIÓN DE LOS DATOS

3.19.3.1. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS:

Los parámetros calculados fueron: área bajo la curva entre el tiempo anterior al primero con concentraciones detectables (AUC_{0-t}) y el correspondiente a las 12 horas tras la administración del tratamiento (AUC₀₋₁₂) y el área bajo la curva total, extrapolada hasta el infinito (AUC_{0-∞}), la concentración máxima (C_{max}) y tiempo para alcanzarla (T_{max}), la vida media de eliminación (t_{1/2}), el volumen de distribución (V_d) ajustado a la biodisponibilidad, el aclaramiento (Cl) ajustado a la biodisponibilidad y el tiempo medio de residencia (MRT). Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Estos parámetros se han calculado para silibina.

3.19.3.2. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD:

Se realizó una estadística descriptiva de los parámetros empleados para el análisis de seguridad.

3.19.3.3. MÉTODO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos del ensayo clínico ha sido realizado por los miembros de la Unidad de Farmacología Clínica del Hospital Universitario del Ramón y Cajal. No se ha realizado ningún análisis intermedio, todos los datos se analizaron al final del estudio. Los datos demográficos y analíticos de los voluntarios fueron analizados de forma descriptiva. En el caso de existir diferencias clínicamente relevantes en alguno de los datos entre los resultados finales del estudio y los basales se aplicaría la prueba de Chi cuadrado, la "t" de Student o análisis de la varianza (ANOVA), según proceda.

Para el análisis de los datos farmacocinéticos de silibina se ha usado el paquete estadístico integrado en el programa "Winnonlin Professional Edition" versión 2.0 (Scientific Consulting, Inc, Cary USA), empleándose el análisis de la varianza (ANOVA)

de los parámetros cinéticos AUC₀₋₁₂ y C_{max} transformados logarítmicamente y la aplicación de los intervalos de confianza para el 90%. En este ANOVA se han tenido en cuenta 3 factores (niveles): los sujetos, la pauta de tratamiento y el periodo de tratamiento. En el caso en el que hubiese aparecido efecto periodo para el AUC o la C_{max} se hubiera realizado un análisis no paramétrico según el método de Hauschke y coli, que corrige la existencia de este efecto, con el programa BIOEQUIVALENCE versión 6.21.

Los parámetros de seguridad se analizaron de forma descriptiva, indicándose aquellos valores que se salían de los rangos de normalidad y tenían significación clínica.

3.19.3.4. MODIFICACIONES AL PROTOCOLO

No ha habido modificaciones al protocolo.

4. RESULTADOS

4.1. FECHAS DEL ESTUDIO

Los primeros voluntarios firmaron el consentimiento informado el 30/09/2013. En la Tabla 6 se indica las fechas en las que ingresaron los voluntarios en la UEC:

PERIODO 1	PERIODO 2
16/10/2013	23/10/2013

Tabla 6. Fechas de ingreso en la UEC

La última visita de seguridad se realizó el 31/10/2013.

4.2. INCLUSIÓN Y CALENDARIO DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO

De los 36 voluntarios que acudieron a la entrevista de selección, 26 firmaron el consentimiento informado. De estos 26 se decidió comenzar con las pruebas correspondientes de la visita de selección en 15 de ellos (por orden de llegada) y dejar en reserva al resto por si no se conseguían los 8 voluntarios necesarios para realizar el estudio.

De los 15 voluntarios que se sometieron a las pruebas de selección: 2 finalmente deciden no participar, 3 no cumplen los criterios de inclusión por presentar alteraciones en la analítica y 1 recibe tratamiento concomitante analgésico en las 48h previas al ingreso por lo que también tiene que ser excluido del ensayo. De los 9 restantes, 8 son finalmente incluidos en el ensayo y 1 se deja de reserva.

Finalmente, se incluyeron en el estudio 8 voluntarios, todos hombres como estaba previsto, que recibieron las dos pautas de tratamiento correspondientes y completaron el estudio. Los 8 voluntarios que completaron el estudio se han incluido

en el análisis farmacocinética correspondiente y en el análisis de seguridad. En la Tabla 7 se indica el calendario seguido por los voluntarios incluidos en el estudio.

Voluntario	Firma CI	Reclutamiento	Periodo I (Día de ingreso)	Periodo II (Día de ingreso)	Seguimiento
01	30/09/2013	02/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	29/10/2013
02	30/09/2013	01/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	31/10/2013
03	30/09/2013	02/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	30/10/2013
04	30/09/2013	30/09/2013	16/10/2013	23/10/2013	29/10/2013
05	30/09/2013	01/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	29/10/2013
06	30/09/2013	01/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	29/10/2013
07	30/09/2013	02/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	30/10/2013
08	30/09/2013	01/10/2013	16/10/2013	23/10/2013	29/10/2013

Tabla 7. Calendario del estudio

4.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS VOLUNTARIOS INCLUIDOS

En el anexo II se detallan las características de los voluntarios incluidos en el estudio. En la Tabla 8 se detallan las características demográficas de todos los voluntarios incluidos y en el anexo II se puede ver las medias para cada grupo. No se aprecian diferencias en los parámetros demográficos entre los dos grupos de tratamiento.

Los datos de exploración física, constantes vitales (frecuencia cardiaca y tensión arterial), electrocardiograma y análisis obtenidos en la visita de reclutamiento también se recogen en el anexo II, así como su estadística descriptiva.

Voluntario	Sexo	Secuencia	Raza	Edad	Peso (Kg)	Talla (m)	IMC (peso/talla ²)
01	VARÓN	AB	Caucásica	22	99.9	189.8	28
02	VARÓN	BA	Caucásica	22	75.2	180.6	23.2
03	VARÓN	AB	Caucásica	24	62.0	168.5	22.0
04	VARÓN	BA	Caucásica	24	76.7	172.7	25.9
05	VARÓN	AB	Caucásica	39	74.7	173.7	25.0
06	VARÓN	BA	Caucásica	26	81	182.0	24.4
07	VARÓN	BA	Caucásica	36	67.9	167.0	24.4
08	VARÓN	AB	Caucásica	23	75.4	179.7	23.5
Media				27	76.60	176.75	24.55
Desviación estándar				6.65	11.07	7.66	1.83

Tabla 8. Características demográficas de los participantes

4.4. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PREVIOS Y CONCOMITANTES

En la tabla 9 se detallan los tratamientos que tomaron los voluntarios durante el desarrollo de este ensayo clínico por la aparición de enfermedades concurrentes.

Ninguno de estos fármacos presenta interacciones con la medicación del estudio.

VOL	TRATAMIENTO	DOSIS ÚNICA	POSOLOGÍA	FECHA INICIO	FECHA FINAL	MOTIVO DEL TRATAMIENTO
03	Paracetamol	Si	1 g	19/10/2013	19/10/2013	Dolor de cabeza
04	Paracetamol	Si	1 g	16/10/2013	16/10/2013	Dolor de cabeza
07	Complejo multivitamínico (Herbalife)	Si	1 comp	29/10/2013	29/10/2013	Sin causa específica

Tabla 9. Tratamientos farmacológicos concomitantes durante el desarrollo del estudio.

4.5. CUMPLIMIENTO DEL TRATAMIENTO

Los 8 voluntarios recibieron la medicación correspondiente a los dos periodos de tratamiento y completaron el estudio.

4.6. DESVIACIONES DEL PROTOCOLO

No se observaron desviaciones al protocolo durante la realización del estudio.

4.7. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

4.7.1. NIVELES PLASMÁTICOS Y PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA SILIBINA

En el anexo I se indican todos los valores de concentraciones de silibina total calculados en todos los tiempos a cada uno de los voluntarios y para los dos tratamientos administrados. A continuación se muestra una figura con los valores medios de las concentraciones (Figura 10) en cada uno de los tiempos de muestreo, en los 8 voluntarios que completaron el estudio y con cada una de las pautas de tratamiento, así como cada una de las gráficas individuales que muestran las concentraciones alcanzadas con cada pauta de tratamiento (Figuras 11 a 18)

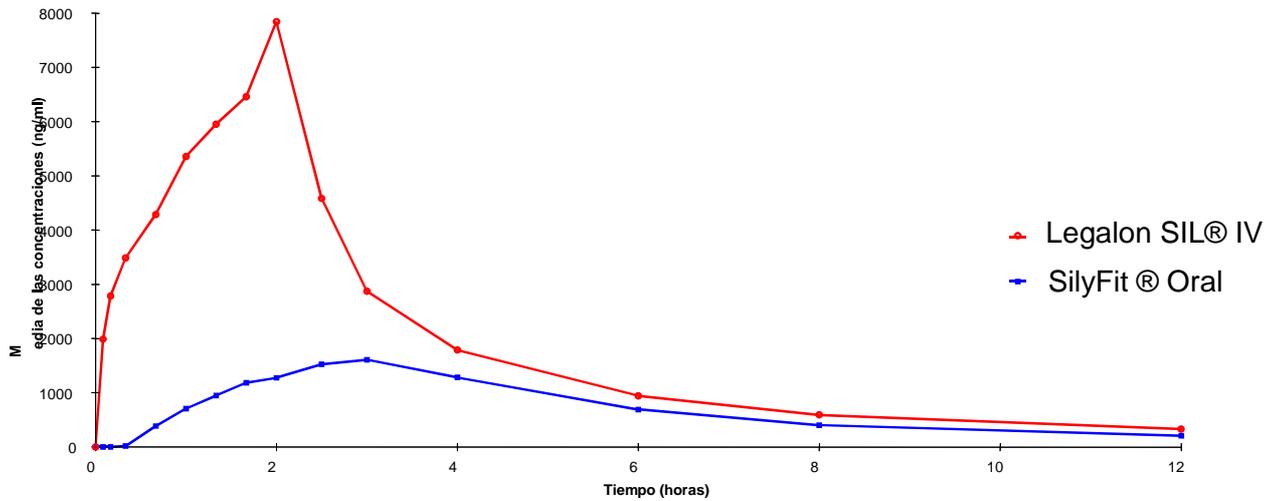


Figura 10. Gráfico de los valores medios de las concentraciones plasmáticas de silibina con cada una de las pautas de tratamiento a los diferentes tiempos de extracción

4.7.2.GRÁFICO DE LAS CONCENTRACIONES PLASMATICAS INDIVIDUALES

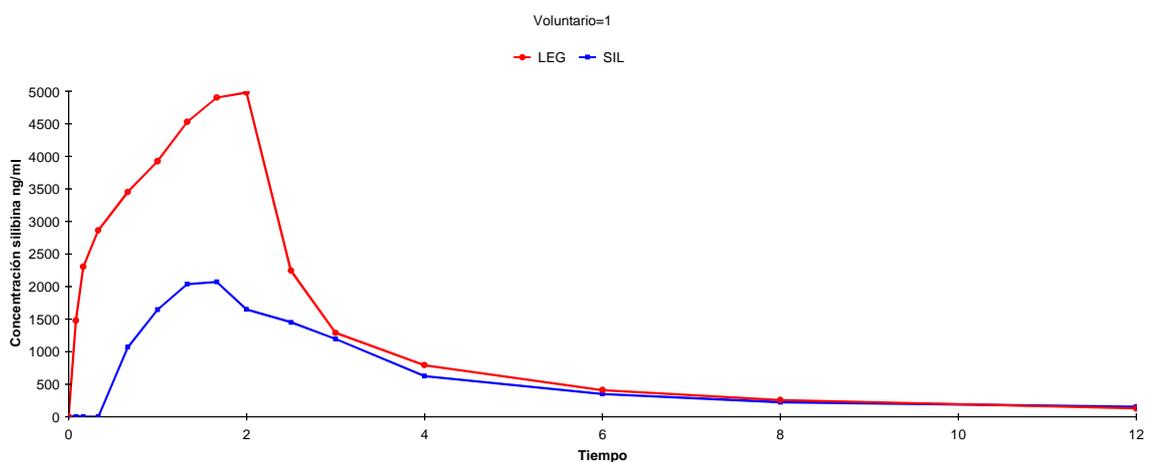


Figura 11: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 01

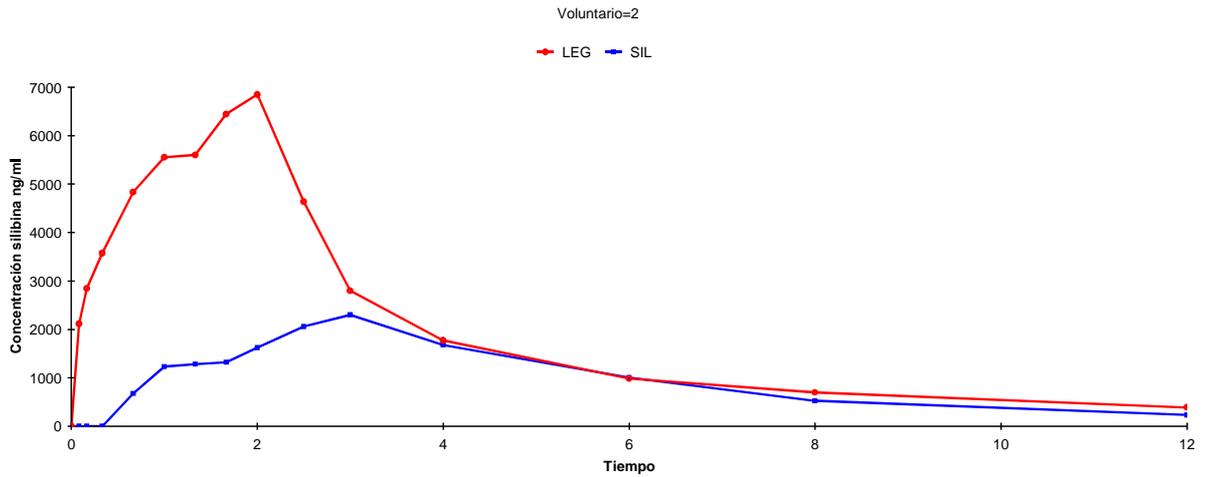


Figura 12: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 02

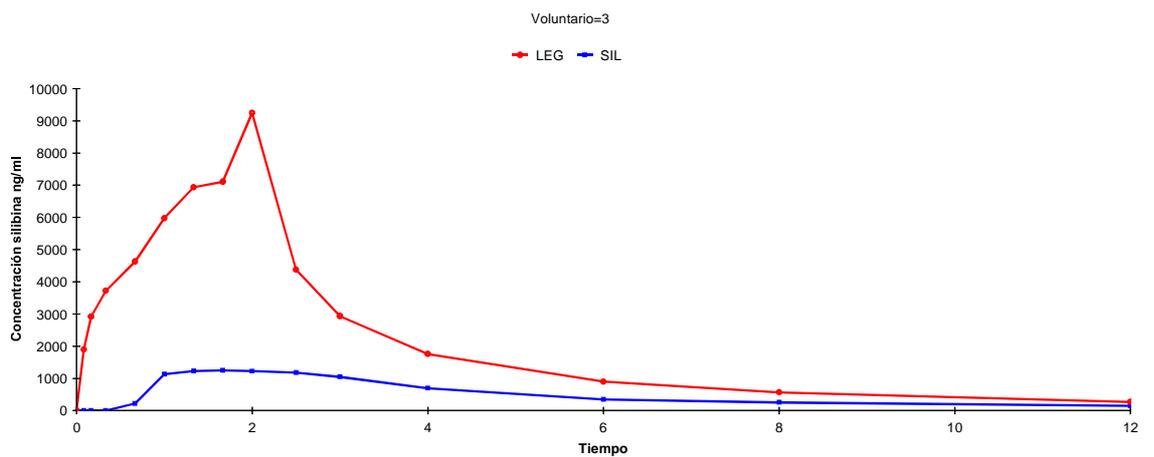


Figura 13: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 03

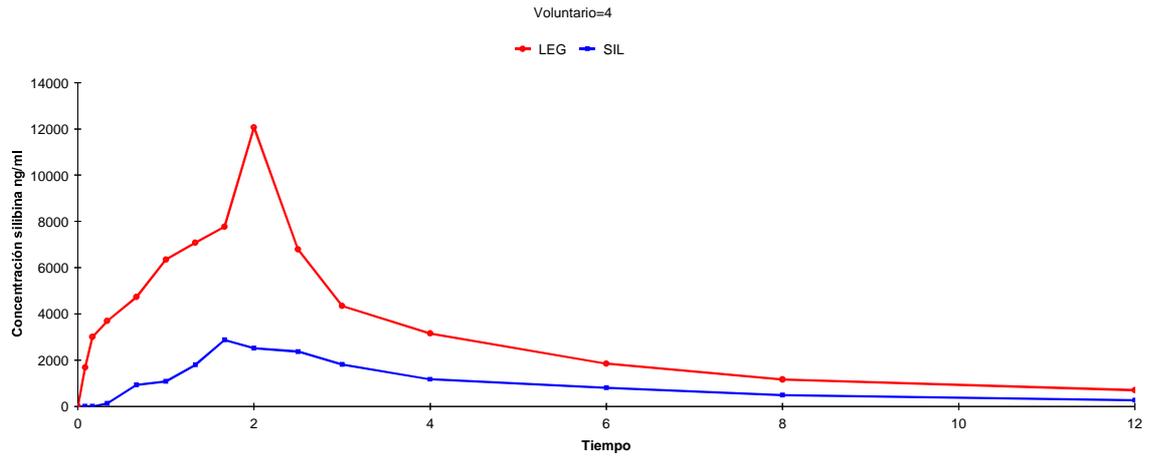


Figura 14: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 04

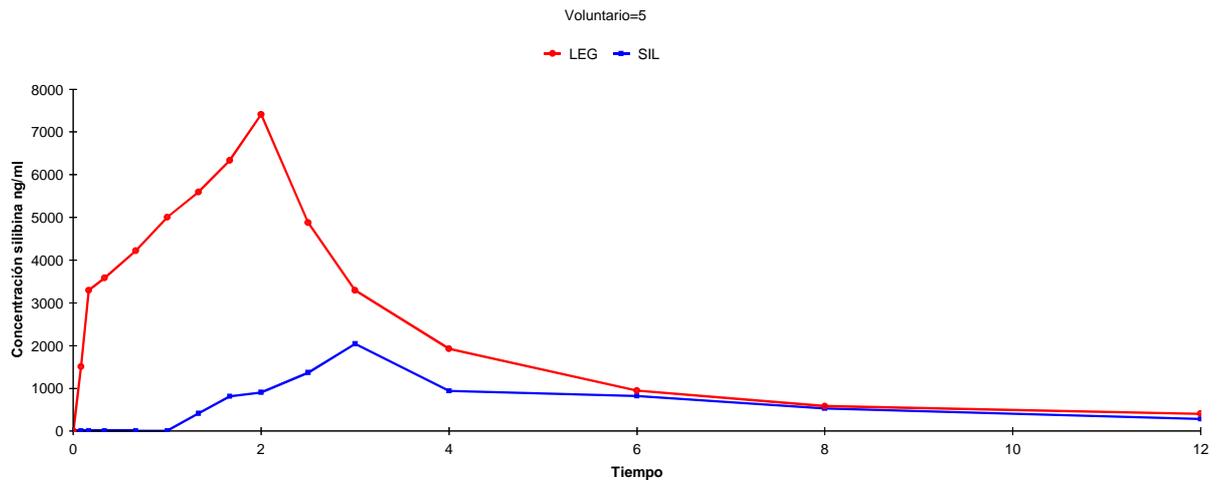


Figura 15: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 05

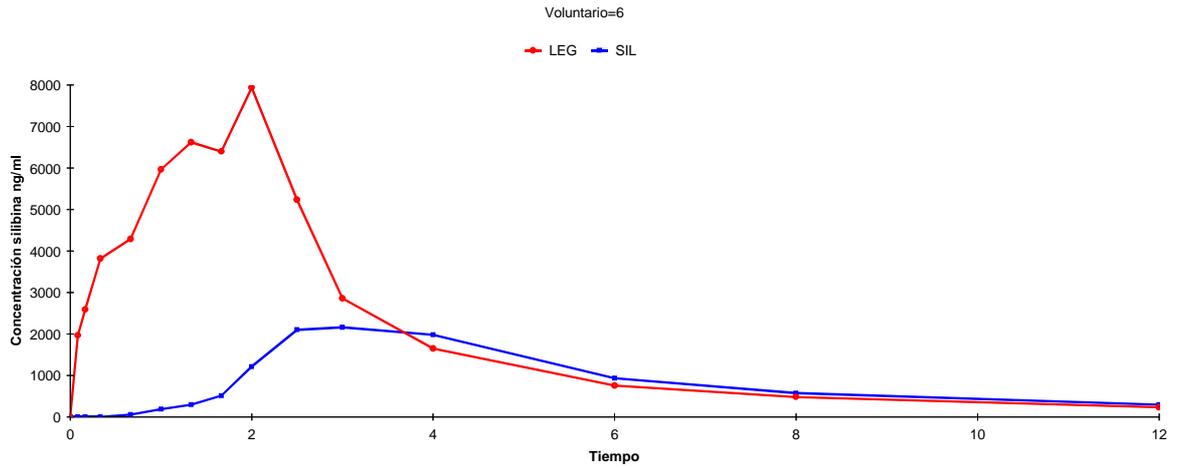


Figura 16: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 06

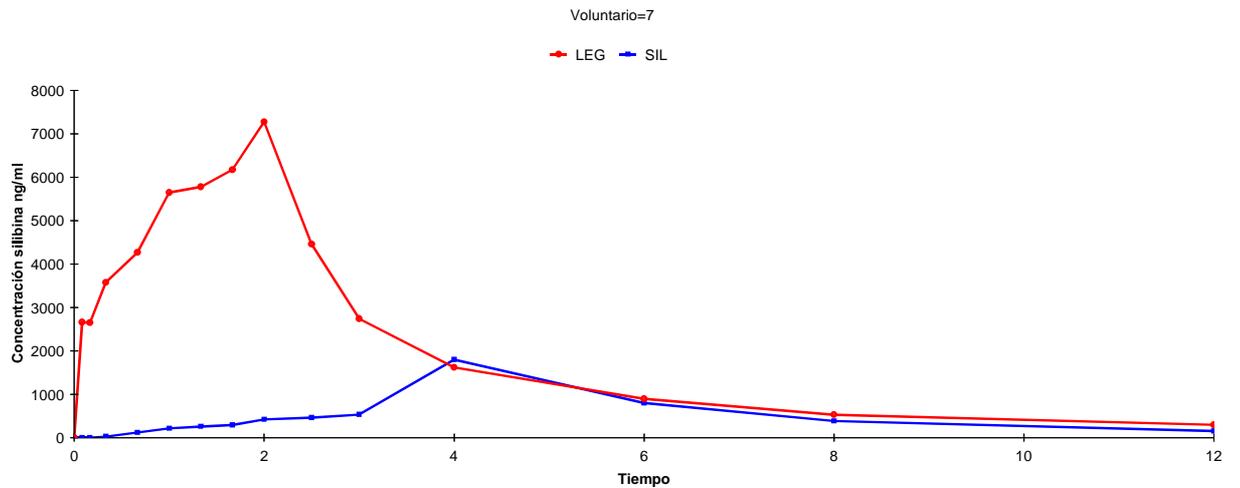


Figura 17: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 07

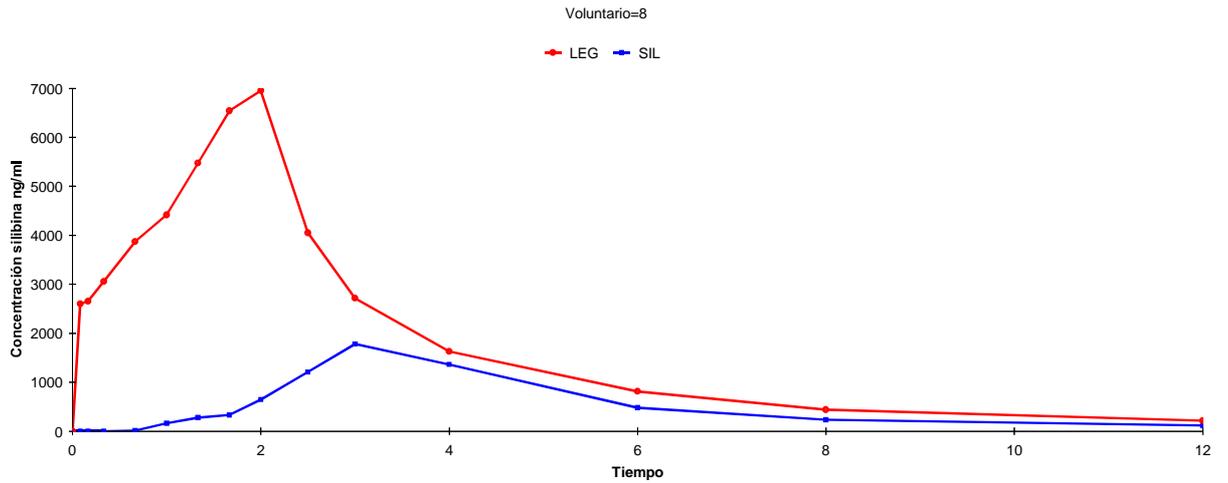


Figura 18: Gráfico de los valores de las concentraciones plasmáticas de silibina con ambas pautas (iv y oral) a los diferentes tiempos de extracción (en horas) para el VOLUNTARIO 08

RESULTADOS

En las Tablas 10 y 11, se muestran los datos cinéticos de cada uno de los 8 voluntarios que completaron el estudio y para cada formulación: Área bajo la curva de 0-12 h (AUC₀₋₁₂), Área bajo la curva extrapolada hasta el infinito (AUC_{0-∞}), % de AUC extrapolado, C_{max}, T_{max}, Vida media (t_{1/2}), Tiempo medio de residencia (MRT), aclaramiento (Cl) y volumen de distribución (Vd). Además, se incluye la estadística descriptiva de estos parámetros (Tabla 12).

Nº Vol.	Secuencia de tto	Periodo de tto	AUC ₀₋₁₂ (ng*h/ml)	AUC _{0-∞} (ng*h/ml)	AUC % Extrap	T _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (l/h)	Vd (l)
01	AB	1	7205.65	7794.27	7.55	1.67	2072.80	2.64	3.58	16.2	176.1
02	BA	2	11513.80	12427.62	7.35	3.00	2300.74	2.71	4.46	29	113.2
03	AB	1	5948.02	7041.90	15.53	1.67	1247.26	5.05	4.11	51.1	372.1
04	BA	2	11263.17	12710.37	11.39	1.67	2874.92	3.73	4.19	28.3	152.5
05	AB	1	8206.32	9850.49	16.69	3.00	2042.09	4.01	5.20	36.5	211.2
06	BA	2	10681.88	12246.77	12.78	3.00	2162.16	3.68	4.96	29.4	155.9
07	BA	2	6869.50	7440.69	7.68	4.00	1799.02	2.58	5.22	48.4	180
08	AB	1	6420.22	6796.23	5.53	3.00	1780.48	2.21	4.49	53	169.2

Tabla 10. Parámetros cinéticos de silibina combinada con fosfatidilcolina por vía oral. A= SilyFit®

RESULTADOS

Nº Vol.	Secuencia de tto	Periodo de tto	AUC ₀₋₁₂ (ng*h/ml)	AUC _{0-∞} (ng*h/ml)	AUC % Extr ap	Tmax (h)	Cmax (ng/ml)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (l/h)	Vd (l)
01	AB	2	13935.93	14603.01	4.57	2.00	4981.41	3.62	1.57	24	125
02	BA	1	23687.61	26230.29	9.69	2.00	6850.19	4.52	2.20	13.3	87
03	AB	2	24575.69	25948.53	5.29	2.00	9246.99	3.51	1.91	13.5	68.4
04	BA	1	35127.94	38640.14	9.09	2.00	12070.90	3.44	2.57	9.1	45
05	AB	2	23838.57	25410.47	6.19	2.00	7412.53	2.69	2.16	13.8	53.5
06	BA	1	23176.52	24385.57	4.96	2.00	7941.04	3.59	1.83	14.4	74.2
07	BA	1	22448.09	23870.62	5.96	2.00	7274.82	3.32	2.00	14.7	70.2
08	AB	2	20872.74	21893.99	4.66	2.00	6954.63	3.25	1.92	16	75

Tabla 11. Parámetros cinéticos de silibina por vía IV.B= Legalon SIL®

RESULTADOS

	Tto	Media	DE	Min	Mediana	Max	CV
AUC₀₋₁₂ <i>(ng*h/ml)</i>	A	8513.57	2290.83	5948.02	7705.99	11513.80	26.91
AUC₀₋₁₂ <i>(ng*h/ml)</i>	B	23457.89	5807.47	13935.93	23432.07	35127.94	24.76
AUC_{0-∞} <i>(ng*h/ml)</i>	A	9538.54	2592.19	6796.23	8822.38	12710.37	27.18
AUC_{0-∞} <i>(ng*h/ml)</i>	B	25122.83	6632.30	14603.01	24898.02	38640.14	26.40
AUC % Extrap	A	10.56	4.16	5.53	9.53	16.69	39.34
AUC % Extrap	B	6.30	2.00	4.57	5.63	9.69	31.70
MRT (h)	A	4.53	0.57	3.58	4.48	5.22	12.69
MRT (h)	B	2.02	0.30	1.57	1.96	2.57	14.64
Cl (l/h)	A	40.20	10.60	28.30	41.40	53.00	26.37
Cl (l/h)	B	14.80	4.20	9.10	14.10	24.00	28.38
Vd (l)	A	191.30	78.20	113.20	172.70	372.10	40.88
Vd (l)	B	74.80	24.10	45.00	72.20	125.00	32.22
t_{1/2} (h)	A	3.33	0.95	2.21	3.19	5.05	28.63
t_{1/2} (h)	B	3.49	0.51	2.69	3.48	4.52	14.57
Cmax <i>(ng/ml)</i>	A	2034.93	468.24	1247.26	2057.45	2874.92	23.01
Cmax <i>(ng/ml)</i>	B	7841.56	2081.47	4981.41	7343.68	12070.90	26.54
Tmax (h)	A	2.62	0.86	1.67	3.00	4.00	32.88
Tmax (h)	B	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00

Tabla 12. Estadística descriptiva de los parámetros cinéticos de silibina calculados para las 2 pautas de tratamiento. A= SilyFit® (oral) y B= Legalon SIL®(iv)

4.8. ANÁLISIS DE BIODISPONIBILIDAD

4.8.1. CONCENTRACIONES DE SILIBINA

En la Tabla 13 se resume el análisis estadístico realizado para las concentraciones de silibina, mostrando el intervalo de confianza (IC) clásico para una significación estadística del 90% (formulación test/formulación de referencia). Este intervalo de confianza se ha calculado mediante una aproximación paramétrica, usando los datos transformados logarítmicamente para AUC₀₋₁₂, AUC_{0-∞} y Cmax. Todos los cálculos estadísticos realizados, ANOVA y estimación de los intervalos, se recogen en el Anexo I.

Parámetro farmacocinético	Ratio (Test/Referencia)	Intervalo de confianza estándar (90%) (Test / Referencia)
ln (Cmax)	26,06	20,54-33,08
ln (AUC ₀₋₁₂)	36,14	29,79-43,84
ln (AUC _{0-∞})	37,96	22,44-53,49

Tabla 13. Análisis de bioequivalencia para las concentraciones de silibina

Para calcular la biodisponibilidad (B) de la formulación oral se ha aplicado la siguiente fórmula:

$$B = \frac{(AUC_{0-12})O * DIV}{(AUC_{0-12})IV * DO} \times 100$$

Si tenemos en cuenta que el AUC₀₋₁₂ para la formulación oral e intravenosa fue de 8.513,57 ng*h/ml y de 23.457,89 ng*h/ml respectivamente y la dosis administrada a los voluntarios fue 360 mg por vía oral y 350 mg por vía intravenosa, la biodisponibilidad absoluta de la formulación oral es un 35% por lo que para obtener con la formulación oral concentraciones plasmáticas similares a las obtenidas por vía intravenosa es necesario multiplicar por 2,8 la dosis que administramos por vía iv.

Este resultado se consigue aplicando la siguiente regla de tres:

Dosis administrada (iv=oral) → 35% biodisponibilidad

DOSIS ORAL "X" → 100 % biodisponibilidad

"X" (D.oral) = Dosis (iv) x 100/ 35 ⇨

Dosis oral =2.8 x Dosis iv

Según esto, a un paciente con un peso de 70 kg , al que se administre, acorde con la Ficha Técnica, una dosis iv de 20 mg/kg/día, es decir, 1.400 mg silibina/día, le corresponderá una dosis oral de: 1.400 mg x 2.8= 3.920 mg silibina/día ⇨

Aproximadamente 4g silibina oral /día

4.9. TOLERABILIDAD Y SEGURIDAD

4.9.1.ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

Durante el estudio se produjeron 3 acontecimientos adversos (AA), que se documentaron con arreglo a las normas establecidas en el protocolo del ensayo. De los 3 AA, 1 (escozor al orinar) se consideró como enfermedad intercurrente sin relación causal con la medicación del estudio (improbable o no relacionado) y 2 (dolor de cabeza) se consideraron probable o posiblemente relacionados con la medicación (reacciones adversas): 1 después de recibir el tratamiento con Legalon SIL® y 1 después de recibir tratamiento con SilyFit®. De acuerdo a la intensidad, todos los acontecimientos adversos fueron leves, ninguno se clasificó como severo. No se documentó ninguna reacción adversa grave. En la tabla 14 se presentan los acontecimientos adversos sucedidos.

VOL	TTo	ACONTECIMIENTO ADVERSO	FECHA INICIO	FECHA FIN	RELACIÓN CAUSAL	ACTITUD
03	A	Dolor de cabeza	19/10/2013	19/10/2013	Posible	Tratamiento
04	B	Dolor de cabeza	16/10/2013	17/10/2013	Posible	Tratamiento
01	B	Escozor al orinar	24/10/2013	30/10/2013	No relacionado	Ninguna

Tabla 14. Acontecimientos adversos notificados durante el estudio.

4.9.2. ANÁLISIS DE SEGURIDAD

Para el análisis de seguridad, a cada voluntario se le realizaron los siguientes procedimientos: exploración física, toma de constantes vitales (tensión arterial, frecuencia cardiaca y temperatura), ECG y análisis de sangre (hemograma y bioquímica sérica), análisis de orina tanto en la fase de selección como al final del tratamiento. Al principio de cada día de ingreso se realizó una exploración física, toma de constantes vitales y ECG.

No se detectaron alteraciones clínicas o analíticas relevantes, ni cambios relevantes en los ECG realizados a cada sujeto. Todas las serologías realizadas en el periodo de reclutamiento fueron negativas.

Los resultados de los análisis de reclutamiento y de seguridad y los registros de las constantes vitales y del ECG, se recogen en el Anexo II.

5. DISCUSIÓN

5.1. FARMACOCINÉTICA

Los medicamentos para producir su efecto terapéutico tienen que alcanzar el lugar de acción en una cantidad adecuada y en un tiempo determinado. En consecuencia, el efecto farmacológico depende tanto del principio activo como de la dosis administrada y de la concentración en el lugar de acción. Las concentraciones del principio activo se miden en la sangre, tal y como se ha hecho en este ensayo y, si es posible en otros fluidos orgánicos y en los tejidos. Disponemos de ciertos modelos matemáticos que permiten analizar los resultados experimentales y predecir el comportamiento del medicamento a corto y a largo plazo. En realidad la farmacocinética la podemos definir como el estudio especializado en las relaciones matemáticas entre un régimen de dosificación y las concentraciones plasmáticas alcanzadas, y el perfil farmacocinético de un medicamento es uno de los determinantes principales para establecer la pauta terapéutica. El fármaco se distribuye en uno o varios tejidos del organismo (por ejemplo la sangre, el líquido intracelular, el tejido adiposo...), a cualquier conjunto de tejidos de aspecto homogéneo desde el punto de vista cinético se le denomina compartimento. En general se renuncia a utilizar modelos demasiado complicados porque impedirían hacer los cálculos matemáticos necesarios. En este ensayo clínico se ha utilizado un modelo monocompartimental que es el que se usa habitualmente en estudios de dosis única.

La biodisponibilidad es la fracción del fármaco administrado que llega en forma activa y sin metabolizar a la circulación general. La biodisponibilidad siempre se expresa en términos comparativos, ya sea con una administración intravascular o con otra extravascular. En el primer caso, se obtiene la biodisponibilidad absoluta y en el segundo la biodisponibilidad relativa. De manera que, Biodisponibilidad Absoluta(BA) se define como la comparación de la cantidad de fármaco que se absorbe desde un producto farmacéutico cuando se administra por cualquier vía, excepto la intravenosa, con respecto a la que se obtiene después de una administración intravascular; y por su parte Biodisponibilidad Relativa

(BR) corresponde a la comparación de la velocidad y cantidad de fármaco absorbido desde un producto farmacéutico frente a las que se obtienen con otro que se toma como referencia y se administra por la misma vía u otra extravascular.

Una vez obtenido el Área Bajo la Curva (AUC), que relaciona las variaciones de concentración del fármaco en función del tiempo, se aplica la siguiente ecuación para calcular la biodisponibilidad (B):

$$B = \frac{(AUC_{0-12})O * DIV}{(AUC_{0-12})IV * DO} \times 100$$

De forma general la biodisponibilidad de un fármaco puede verse afectada tanto por el efecto de primer paso (metabolización hepática) como por una absorción incompleta del fármaco. Es importante recordar que fármacos diferentes o formulaciones o vías de administración distintas de un mismo fármaco pueden variar considerablemente entre si, tanto en grado de absorción como en tiempo que tarda en absorberse, por lo que no siempre se alcanzarían las mismas concentraciones plasmáticas administrándose la misma dosis.

Este estudio ha permitido caracterizar la biodisponibilidad absoluta de una dosis oral del complejo silibina-fosfatidilcolina. Este dato nos permite establecer para cada paciente, la dosis oral que se debería administrar para evitar la reactivación de la carga viral, hecho que en la práctica habitual se ha observado que se produce una vez se retira el tratamiento intravenoso a los pacientes.

Es conocido que la silibina administrada por vía oral presenta una baja absorción a nivel gastrointestinal debido a su baja solubilidad pero hay estudios que demuestran que tras unirla al complejo fosfatidilcolina su biodisponibilidad aumenta en 6 veces respecto a la administración única de la silibina. Estos datos nos hacían pensar que el complejo silibina fosfatidilcolina podría presentar una buena biodisponibilidad absoluta sin embargo los datos obtenidos en este estudio indican que la silibina oral en la formulación administrada, combinada con fosfatidilcolina no presenta un buen nivel de absorción sistémica tras la administración oral. La biodisponibilidad absoluta de la administración oral con respecto a la formulación intravenosa fue del 35% lo que significa que sería necesario multiplicar por 2,8 la dosis que administramos por vía iv, para obtener con la formulación oral concentraciones plasmáticas similares a las obtenidas por vía intravenosa.

En la actualidad la pauta que se utiliza en el Hospital Ramón y Cajal en pacientes infectados por el VHC que reciben trasplante hepático es de 20 mg /kg por vía intravenosa en una única dosis. Según esto, un adulto de 70 kg recibiría 1400mg al día de silibina intravenosa por lo que necesitaría aproximadamente unos 4000 mg al día de silibina-fosfatidilcolina administrada por vía oral para conseguir concentraciones en sangre equivalentes a las alcanzadas con la formulación intravenosa, que es la que ha demostrado efecto antiviral.

El tener que administrar esta dosis tan alta en estos momentos nos plantea dos problemas importantes, por un lado el tener que conseguir alguna formulación que sea viable para su administración a los pacientes, ya que a día de hoy sólo están comercializadas cápsulas que contienen 40 mg de silibina (lo que supondría tener que dar a los pacientes 100 cápsulas diarias) y por otro lado, determinar si a pesar del buen perfil de seguridad que presenta el producto, el tener que administrar esta dosis tan alta podría conllevar problemas de seguridad. Más adelante, dentro de este apartado, se realiza un análisis exhaustivo de estos 2 problemas que se nos han planteado.

Por otro lado, el estudio también nos ha permitido calcular las características farmacocinéticas de una dosis única oral (360 mg) o intravenosa (350 mg en infusión de dos horas) en adultos sanos que serán de utilidad a la hora de establecer la pauta posológica mas correcta para administrar a estos pacientes.

Tras realizar una revisión de la literatura científica no se encontró ningún artículo en el que se definieran los datos cinéticos de la silibina administrada por vía intravenosa por lo que desconocíamos, a priori, cuales eran las concentraciones plasmáticas que ya han demostrado en la práctica habitual que son efectivas a la hora de inhibir la replicación del virus. Sí que se encontraron datos cinéticos relativos a la administración de silibina conjugada con fosfatidilcolina administrada por vía oral que coinciden con los datos que se han obtenido en este estudio. Tanto tras administración intravenosa como oral, se observó que la variabilidad interindividual calculada como el coeficiente de variación (CV%) era menor del 30% en los principales parámetros farmacocinéticos (AUC, C_{max}).

Las concentraciones plasmáticas máximas (C_{máx}) de silibina se observaron al final de la infusión de dos horas de silibina por vía intravenosa y, aproximadamente, a las 2.5 horas tras la administración de la silibina- fosfatidilcolina por vía oral. **La vida media se**

encuentra alrededor de las 3,5 horas para ambas formulaciones. Atendiendo a estos datos cinéticos, parecería razonable que la dosis diaria de 20 mg/kg administrada por vía oral se prescribiera con un intervalo entre dosis de 6-8 horas.

5.2. SEGURIDAD:

La experiencia que nos otorgan los más de 30 años de la presencia de silibina (cardo mariano) en el mercado, han demostrado el excelente perfil de seguridad y tolerabilidad que presenta. Desde la Agencia Europea del Medicamento (EMA) se ha llevado a cabo una revisión a cerca de la información de seguridad disponible del cardo mariano (tanto obtenida de ensayos clínicos como en el periodo postcomercialización) y en términos de seguridad concluyen que la incidencia de reacciones adversas es muy baja principalmente afectando al tracto gastrointestinal y que la mayoría de las veces son leves (sequedad de boca, náuseas, malestar estomacal, irritación gástrica y diarrea). En alguna ocasión se han reportado reacciones cutáneas alérgicas leves (picor y erupción cutánea), dolor de cabeza e insomnio.

Las evaluaciones de seguridad realizadas en el presente estudio se realizaron de acuerdo con las Normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente. Se recogieron todos los acontecimientos adversos que tuvieron lugar desde que los pacientes firmaron el consentimiento informado hasta 30 días después de la administración de la última dosis.

Todos los voluntarios reunieron los requisitos exigidos para su participación en el ensayo, no detectándose ninguna anomalía valorable en la exploración física ni en los antecedentes personales. Tampoco se observó ninguna alteración clínicamente significativa en los parámetros analíticos de seguridad en la fase de reclutamiento del ensayo, que pudieran considerarse como causa de exclusión.

Tanto las cifras de tensión arterial, la frecuencia cardiaca y el electrocardiograma se mantuvieron dentro de límites fisiológicos durante todo el ensayo, sin que se detectaran alteraciones clínicamente valorables.

Respecto a los cambios hemodinámicas, TAS, TAD y FC, todos los valores obtenidos se encontraban dentro de la normalidad y no se produjeron cambios relevantes a los diferentes tiempos con ninguno de los tratamientos.

Durante el estudio se produjeron 3 acontecimientos adversos (AA), que se documentaron con arreglo a las normas establecidas en el protocolo del ensayo. De los 3 AA, 1 (escozor al orinar) se consideró como enfermedad intercurrente sin relación causal con la medicación del estudio (improbable o no relacionado) y 2 (dolor de cabeza) se consideraron probable o posiblemente relacionados con la medicación (reacciones adversas): 1 después de recibir el tratamiento con Legalon SIL® y 1 después de recibir tratamiento con SilyFit®. De acuerdo a la intensidad, todos los acontecimientos adversos fueron leves, ninguno se clasificó como severo. No se documentó ninguna reacción adversa grave.

Estos datos de seguridad coinciden con los datos de la literatura científica. Es importante destacar como fortaleza de este producto el **favorable perfil de seguridad**, destacando la relevancia de este punto en el tratamiento de estos pacientes dadas sus características. Es más, en ningún caso, ni en este estudio ni en la literatura científica, ya sea cuando se administró en voluntarios sanos como cuando se administró en pacientes (HCC, cirrosis, cáncer próstata, recién trasplantados...) se han notificado reacciones adversas graves ni interacciones con ningún otro tipo de fármacos.

Un problema que se nos presenta es que, como ya se ha mencionado anteriormente, para poder alcanzar las concentraciones plasmáticas conseguidas tras la administración de la silibina intravenosa es necesario que la dosis oral sea igual a la intravenosa multiplicada por 2.8, lo que se traduciría en la práctica habitual en tener que administrar 4000 mg/día a los pacientes.

Esta dosis oral tan alta podría traducirse en problemas de seguridad, sin embargo, aunque sería necesario realizar estudios que evaluaran el perfil de seguridad a altas dosis, hay datos en la literatura científica que nos hacen pensar que esta dosis va a mantener el excelente perfil de seguridad ya conocido de la silibina. De hecho, en pacientes con cáncer de próstata se diseñó un estudio para evaluar la toxicidad de dosis altas de silibina-fosfatidilcolina y así recomendar una dosis para la fase II. Silibina-fosfatidilcolina se administró por vía oral a las dosis de 2,5 a 20 g al día, dividido en 3 dosis durante 4 semanas. Durante el estudio solo se observaron casos de toxicidad hepática asintomática (elevaciones leves y transitorias de la bilirrubina y un

caso de elevación de la enzima alanotransferasa (ALT)) que demostraron el buen perfil de seguridad de la silibina aún administrándose a dosis altas (113).

Los nuevos AAD, presentan menos efectos secundarios que la asociación Peg-IFN más RBV usada hasta ahora, pero siguen apareciendo diversos problemas de seguridad en el periodo postcomercialización, que se han ido desarrollando a lo largo de este trabajo (resistencias, interacciones) y que se deberán seguir vigilando y recogiendo para ver el alcance de los mismos en el tratamiento de la población fuera de un ensayo clínico, valorando, además, si esto puede traducirse a largo o medio plazo en un fracaso del tratamiento o en un problema de seguridad grave para el propio paciente.

Además, hay que destacar también que este fármaco sería el único, de los autorizados a día de hoy, que además de actividad **antiviral** presente actividad **hepatoprotectora**, lo que podría ser ventajoso para los pacientes infectados por el VHC.

5.3. OBTENCIÓN DE UNA FORMULACIÓN ORAL ADECUADA:

Actualmente, el complejo silibina-fosfatidilcolina se comercializa en cápsulas que sólo contienen 40 mg de silibina por lo que a un paciente habría que prescribirle unas 100 cápsulas al día para alcanzar la dosis de 4000 mg/día, tal y como hemos detallado en este mismo apartado (farmacocinética). Este hecho hace que utilizar este producto sea completamente inviable. Para que esto fuera viable, sería necesario conseguir una formulación que contuviera la dosis suficiente y fuera compatible con la administración oral a los pacientes.

Por otra parte, cabe destacar que sabemos que la dosis de 20mg/kg administrada en una sola toma es eficaz a la hora de inhibir la replicación del VHC, sin embargo sería necesario diseñar un estudio que confirmase si esta inhibición se podría alcanzar con dosis menores y/o administrando la dosis total diaria de silibina intravenosa en varias infusiones, tal y como se indica en su ficha técnica. Dependiendo de los resultados, quizá se podrían plantear pautas posológicas alternativas que permitiesen reducir la

dosis que el paciente debería recibir en cada toma, facilitándose así la obtención de fórmulas galénicas que fueran viables para la administración de silibina-fosfatidilcolina por vía oral.

En cualquier caso, se trataría de obtener una formulación silibina-fosfatidilcolina con 4000 mg de silibina, es decir, 4 g, o una dosificación que permitiese tomar esta cantidad (de 1g, 2g, etc...), o en el mejor de los casos, algo menor. Para conseguir esta formulación oral deberán tenerse en cuenta varios aspectos: los ligados al propio principio activo, la silibina, como a los excipientes con los que éste es compatible.

Podríamos hablar de conseguir una forma farmacéutica que no sean cápsulas o comprimidos, sino alguna otra que haga que el producto sea más soluble o permita administrar una mayor dosis por toma, por ejemplo una solución (jarabe) o un granulado para suspensión (sobres), teniendo en cuenta siempre las características químicas de la silibina y de los excipientes con los que fuese a ser formulada.

5.4. DESARROLLO CLÍNICO DE LA FORMULACIÓN

ORAL:

Una vez conseguida la formulación adecuada para ser administrada por vía oral, habría que seguir con esta línea de investigación, realizando un estudio fase I de nuevo con dosis aproximadas de 4000 mg/ día y en función de los resultados plantear sucesivos ensayos fase II y fase III de eficacia y seguridad con esa formulación oral.

En cuanto a los ensayos clínicos que se deberían realizar a continuación, en primer lugar sería necesario hacer un nuevo EC fase I con la nueva formulación, pero como ya tenemos información “inicial” de sus características farmacocinéticas, lo ideal sería aprovechar el mismo ensayo para hacer un estudio de búsqueda de dosis. Uno de los aspectos más complicados en el diseño del estudio es definir los límites de dosis a utilizar, que dependen de los resultados de estudios en animales, pero realmente en este caso tal y como ya se ha comentado en diferentes apartados hay mucha información acerca de la seguridad porque como planta medicinal la silibina oral se ha utilizado durante mucho tiempo además de existir una amplia bibliografía sobre su uso en investigación a dosis mucho mayores. A parte, la forma intravenosa también se

ha utilizado en clínica durante muchos años y no se han detectado problemas de seguridad a las dosis previstas. En los estudios fase I a dosis inicial suele ser un 1-2% de la dosis eficaz en animales y la dosis máxima un 10-16% de dosis máxima tolerada en animales (115). En los primeros estudios se suele administrar una dosis única y después de analizar los resultados de esta dosis se decide si procede continuar con la siguiente dosis. En nuestro ensayo se ha seleccionado la dosis de 20 mg/kg porque es la autorizada para la formulación intravenosa y la que ha demostrado actividad antiviral, pero normalmente se suele utilizar la vía y la formulación que se va a utilizar posteriormente en las fases clínicas por lo que en el caso de la formulación de la silibina por vía oral se podría incrementar progresivamente la dosis hasta que se produzcan efectos adversos intolerables para definir la dosis máxima tolerada que en este momento desconocemos. El objetivo es obtener la máxima información con la exposición del mínimo número de sujetos, para lo cual es necesario proceder con cautela y aumentar la dosis de forma paulatina y secuencial hasta la dosis máxima tolerada. Los incrementos entre dosis al principio suelen ser del 100% y al acercarse a la dosis máxima del 30-50% (116).

Para continuar con la línea de investigación abierta lo siguiente a realizar sería un EC fase II de búsqueda de dosis en pacientes infectados por el VHC en una situación clínica en la que no haya indicación de tratamiento (por que haya fracasado el tratamiento previo, en situación pretrasplante...). El objetivo fundamental sería establecer la dosis o la pauta más eficaz, y la relación entre la dosis-concentración y concentración-eficacia. De forma inicial se pueden realizar estudios piloto que pueden ser abiertos sin grupo control, válidos cuando la variable de evaluación es objetiva, que es nuestro caso. Sin embargo, los ensayos de búsqueda de dosis o de dosis-respuesta definitivos tienen que ser siempre controlados, enmascarados y con asignación aleatoria (117) Fundamentalmente encontramos dos tipos de diseño de ensayos de búsqueda de dosis (117):

- 1) Los ensayos de dosis escalonada o de titulación de dosis, en los que todos los pacientes empiezan con una dosis baja supuestamente eficaz y según la respuesta observada se aumenta la dosis hasta alcanzar la eficacia óptima o hasta que aparezcan efectos adversos. Estos ensayos tienen la ventaja de que se parecen a lo que sucede en la práctica clínica habitual y aportan datos sobre la variabilidad interindividual en la respuesta terapéutica, pero tienden a sobrestimar la dosis terapéutica ideal.

2) Los ensayos a dosis fijas en los que se administran diferentes dosis a los pacientes que se mantienen constantes a lo largo del tiempo. Este tipo de diseño es más robusto estadísticamente pero no refleja la variabilidad de las respuestas individuales y requiere un elevado número de sujetos (118) Existen otros tipos de diseños mixtos.

Un estudio de búsqueda de dosis adecuado debería incluir al menos 3 niveles de dosis, una dosis subóptima que no debería ser eficaz o ser poco eficaz, una dosis teóricamente óptima, y otra dosis superior para ver si aumenta la eficacia, y un grupo con placebo o con el fármaco de referencia. La demostración de una clara relación dosis-respuesta es una buena garantía para un fármaco (117). Por el contrario, si de las 3 dosis ensayadas solo una es eficaz surgen bastantes dudas. Si la eficaz es la dosis alta deberemos evaluar dosis superiores; si sólo es eficaz la dosis baja o la dosis media es posible que haya habido algún problema con el diseño o la realización del ensayo. Sin embargo, en muchos casos no es posible establecer una clara relación dosis-respuesta. Para estos estudios se puede utilizar un diseño cruzado, en el que cada sujeto recibe todas las dosis a diferentes tiempos, o un diseño paralelo, en el que cada sujeto solamente recibe una de las dosis. La ventaja del diseño cruzado es que cada paciente es su propio control, con lo que disminuye la variabilidad y se necesita un número menor de sujetos, pero tiene los inconvenientes de que solo se puede utilizar en enfermedades crónicas estables y puede aparecer efecto periodo (efecto del primer tratamiento administrado sobre el segundo), se solucionaría con un periodo de lavado prolongado, aunque no siempre es éticamente posible dejar a los pacientes sin tratamiento. Los estudios paralelos son más fáciles de realizar pero debido a la heterogeneidad entre los grupos se necesita un mayor tamaño de muestra.

Finalmente, para evaluar de forma definitiva la eficacia y seguridad de la silibina por vía oral en el tratamiento de pacientes infectados por el VHC, tendríamos que realizar ensayos clínicos fase III que son los que establecen una propiedad tan fundamental del medicamento como es su balance beneficio/riesgo que posteriormente va a marcar su verdadera utilidad en la práctica clínica diaria. Estos deben ser controlados y aleatorizados ya que hasta llegar a esta fase puede conocer la eficacia preliminar del fármaco pero no se conoce bien el balance beneficio-riesgo ni qué ventajas e inconvenientes representa en relación con otros tratamientos más o menos ya establecidos, es decir se trata de establecer si el medicamento aporta algo. Los problemas que surgen al hacer esta comparación son muy importantes: con quien se compara, qué es lo que hay que contrastar, qué se va a entender por ventaja o

inconveniente relevante, etc. El estudio debe realizarse intentando reproducir las condiciones de uso habituales lo cual resulta muy difícil cumplir porque por mucho que se intente, la situación en que se encuentra un paciente incluido en un ensayo clínico difiere bastante de las circunstancias normales y corrientes en las que se trata a un paciente habitualmente. La cantidad de controles y la calidad de los mismos siempre es mucho mayor que la que se realiza en la práctica clínica habitual. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el ensayo Fase III es el último estudio que se realiza antes de la autorización del fármaco en la indicación estudiada, y que por lo tanto la población de pacientes que se incluya debe ser lo más parecida posible a la población que va a recibir posteriormente el fármaco. Tal y como se ha comentado uno de los problemas más difíciles en la fase III es la elección del tratamiento del grupo control.

En el caso de la Hepatitis C, en los últimos ensayos aprobados para registro, la EMA ha aceptado el uso de controles históricos debido a las grandes diferencias en eficacia en cuanto a respuesta viral sostenida de los nuevos fármacos (Antivirales de Acción Directa) frente a la combinación de interferón y ribavirina (antivirales de acción indirecta) debido claramente al mecanismo de acción y además a la gran cantidad de efectos adversos que originaban los tratamientos con interferón que obligaban en muchos casos a abandonar incluso el tratamiento, con el consecuente fracaso en la obtención de la RVS.

En nuestro caso primero habría que ver la eficacia obtenida en la fase II y sería necesario analizar a que población se le podría administrar sin que se privase al paciente de un tratamiento eficaz.

En cuanto a los sesgos que pueden influir sobre los resultados en la Fase III, son muy numerosos. La mejor forma de paliarlos es que los EC sean paralelos, controlados, aleatorizados y doble ciegos.

Es importante destacar que la realización del ensayo en Fase III exige una justificación muy buena de la hipótesis de trabajo; una gran motivación, presupuesto suficiente, dotación técnica adecuada y el cumplimiento de todos los requisitos legales vigentes en España.

Una vez obtenidos los resultados esperados de estos ensayos clínicos, habría que llevar toda la información de la molécula (dossier) a registro para obtener la autorización de la silibina como medicamento en la indicación estudiada.

Este dossier se presenta a las autoridades sanitarias competentes (Agencia Europea del Medicamento: EMA y a la Agencia Española del Medicamento: AEMPS)

El procedimiento de registro puede ser Centralizado (en toda Europa) o Nacional. En este caso optaríamos por un procedimiento Centralizado, es decir, el medicamento se presenta a Registro en todos los países de la **Unión Europea**, de tal manera que solo existe **una “autorización única”** de comercialización en todos los países de la UE.

Para favorecer que todos los pacientes de la UE tengan la misma disponibilidad a los medicamentos innovadores destinados a enfermedades graves, es obligatorio que los siguientes medicamentos sean registrado por este procedimiento: productos biotecnológicos, medicamentos huérfanos, medicamentos para sida, cáncer, trastornos neurodegenerativos, diabetes, enfermedades autoinmunes, **víricas** y otros medicamentos que constituyan una innovación (terapéutica, científica ó técnica).

En este tipo de procedimiento el medicamento se presenta a Registro a la EMA y es evaluado por el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP). En este Comité participan representante de todas la Agencias Nacionales de los países de la Unión Europea.

El tiempo medido en el que se cubren las etapas de registro, es de aproximadamente 15 meses.

Además, según los datos obtenidos y remarcando siempre el buen perfil de seguridad de la silibina, también podría ser interesante abrir nuevas líneas de investigación que combinasen la administración de silibina intravenosa/oral con algún Antiviral de Acción Directa, de primera o de segunda generación, o que estudiaran el tratamiento de la silibina en pacientes con otro tipo de enfermedad hepática donde se combinase con algún tratamiento estándar, o en pacientes que sufran Hepatitis C crónica desde su diagnóstico.

5.5. ESTRATEGIA PARA LLEVAR A CABO ESTE DESARROLLO CLÍNICO:

El intento desde hace años de armonizar a nivel europeo escenarios a priori muy diversos en relación con los procedimientos para autorizar ensayos clínicos con medicamentos ha dado como resultado un modelo más difícil de cumplir para los investigadores independientes que promueven ensayos clínicos, ya que no se puede aplicar un “doble rasero” en función de quien sea el promotor de un ensayo clínico. La consecuencia de estos cambios es que si esta investigación (llamada independiente o académica) no consigue el apoyo inversor que posibilite su realización lo que puede producirse es un estancamiento en su realización, muchos grupos de clínicos con interés en colaborar en proyectos europeos tendrían que abandonarlos y España quedaría descolgada de muchas actividades corporativas en materia investigadora a nivel europeo, sin dejar de lado la importancia que tiene la capacidad investigadora y de innovación para el desarrollo económico y social de un país. En este contexto hay que destacar el papel especial y fundamental de la investigación en salud y concretamente la investigación clínica, pues sus resultados inciden directamente no sólo en el avance científico sino, más importante aún, en la disminución de la morbi-mortalidad y en una mayor calidad de vida de sus ciudadanos y en definitiva en la mejora del estado de salud del país.

La investigación clínica es un elemento clave dentro de la I+D+i porque constituye el nexo de unión entre la investigación básica y la asistencia a los pacientes, siendo el ensayo clínico un instrumento fundamental en la investigación traslacional. Por este motivo el Ministerio de Sanidad, ha impulsado iniciativas a nivel nacional para facilitar a los investigadores el proceso de realización de un EC y aumentar la inversión dedicada a becas y ayudas para proyectos.

El Instituto de Salud Carlos III ha venido desarrollando a lo largo de los últimos años diferentes estrategias con una estructura en red para realizar una planificación adecuada de las necesidades y utilización óptima de los recursos. Ha promovido proyectos coordinados y colaborativos, así como diferentes tipos de redes y consorcios (por ejemplo.: Redes de enfermedades oncológicas, o cardiovasculares, CIBER de patologías respiratorias o mentales, RETICs de Biobancos o de Innovación y el Consorcio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red (CAIBER), bajo la premisa

de que solamente trabajando en red y mediante estudios multicéntricos puede darse respuesta adecuada a la mayor parte de las preguntas planteadas en el ámbito de la investigación en salud.

El CAIBER se constituyó según la convocatoria de 12 de marzo de 2008, de ayudas de la Acción Estratégica en Salud (en el marco del Plan Nacional I+D+I 2008-2011, BOE de 15 de marzo). De esta manera España se integraba en una Infraestructura Europea, la red ECRIN, proveedora de servicios integrados para realizar y dar soporte a la investigación clínica multinacional en los países participantes. Tanto ECRIN como CAIBER surgen porque el ensayo clínico, debe cumplir con los más elevados estándares científicos, de calidad, ética y operativa que garanticen la seguridad de los pacientes y la fiabilidad de los datos generados. Además, precisa habitualmente de una metodología compleja y unos acondicionamientos que requieren la disposición de un elevado número de recursos económicos y humanos, organizados y dispuestos eficientemente para la implementación del estudio en el tiempo adecuado.

Hay que tener en cuenta que sin el apoyo y conocimiento necesario, las posibilidades de realizar una investigación clínica de calidad son muy bajas, particularmente en el ámbito de la investigación independiente. Los profesionales sanitarios necesitan asesoramiento y ayuda técnica en la planificación y ejecución de estas tareas, que han de compatibilizar con su actividad asistencial y que pueden incluir desde la generación y maduración de la hipótesis de investigación, hasta la preparación de documentación, gestiones administrativas, puesta en marcha de mecanismos de seguridad en relación con fármacos y pacientes, monitorización de los datos o análisis estadísticos en ocasiones muy complejos. Sin este soporte es imposible garantizar la calidad de un proyecto de investigación clínica, siendo ése un motivo sustancial entre los que ha contribuido a que tradicionalmente la gran mayoría de ensayos clínicos se hayan circunscrito al ámbito de la investigación comercial. El consorcio se constituyó con una Unidad central que desempeñaba las tareas de gestión, promoción y coordinación de proyectos y cuarenta unidades de los centros asistenciales del SNS que proporcionaban investigadores, infraestructuras y servicios comunes. CAIBER, como estructura estable de investigación clínica en red supuso una gran oportunidad para poder acometer proyectos que, por su complejidad o dimensión, difícilmente se podrían gestar o implementar por grupos individuales, pero a pesar del gran avance que supuso, el Consorcio se disolvió en el año 2012 por problemas presupuestarios.

Sin embargo, el Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 asume la importancia de las políticas de ciencia e innovación y publica una convocatoria específica para plataformas de apoyo a la Investigación en Ciencias y Tecnologías de la Salud, una de ellas la Plataforma de Unidades de Investigación Clínica y Ensayos Clínicos.

Esta plataforma, Spanish Clinical Research Network (SCReN), es una estructura de soporte con funcionamiento en red, en la que hay un reparto descentralizado de las tareas, aprovechamiento de los recursos y donde el contacto directo con los investigadores es el elemento esencial. La plataforma actual tiene un presupuesto ajustado y se basa en el aprovechamiento de los recursos, lo que pretende es reducir los gastos y las tasas de abandono de proyectos y subvenciones. Los problemas a los que se intentó dar respuesta con la creación del CAIBER siguen existiendo, por lo que es fundamental esta red cuyos objetivos son prestar servicios de apoyo a la investigación clínica, promover proyectos transversales propios e internacionalización de la actividad, y la prioridad son los ensayos clínicos de promotor independiente. La plataforma está formada por cuatro programas, Coordinación y Formación, Regulación y Monitorización, Farmacovigilancia y Metodología, Estadística y Gestión de datos avanzada y está formada por 29 Centros. El Hospital Ramón y Cajal es uno de los Centros integrantes de SCReN, en este caso como Instituto de Investigación (IRYCIS), que integra a varios grupos de investigadores de excelencia pertenecientes al Hospital Universitario Ramón y Cajal, la Universidad de Alcalá, la Universidad Complutense y la Universidad Autónoma de Madrid y que dispone de una cartera de servicios que contempla no solo los servicios científico-técnicos que prestan las Unidades Centrales de Apoyo a la Investigación del Instituto, sino también los que otros grupos y unidades ponen a disposición de la investigación que se desarrolla. Gracias a los recursos de la plataforma y con el apoyo del IRYCIS, en este momento hay en marcha más de 20 ensayos clínicos independientes además de al menos 10 finalizados, de los cuales el estudio objeto de esta tesis es uno de ellos.

Para poder llevar a cabo este estudio fue necesario buscar financiación para cumplir con todos los requisitos que establece nuestra legislación (RD223/2004 de Ensayos Clínicos con Medicamentos), que son: aporte de la medicación, contrato de una póliza de seguros específica para el ensayo, pago de las tasas a la AEMPS para su evaluación, compensación económica por las molestias a los sujetos voluntarios participantes en

el estudio, y pago al laboratorio que realizó la determinación de las concentraciones plasmáticas.

En este caso se obtuvo la ayuda de una convocatoria privada de la Fundación de la Mutua Madrileña, pero no se hubiera podido llevar a cabo, cumpliendo con los estándares éticos y científicos que exige la legislación vigente, sin contar con un Equipo Investigador formado, un monitor de ensayos clínicos y un experto en farmacovigilancia que forman parte del personal contratado a través de SCReN. Por lo tanto se ha tratado de un ensayo clínico independiente financiado con fondos públicos y privados que son los que han asegurado, en este caso, que el estudio se haya realizando acorde con el cumplimiento de las Normas de Buena Práctica Clínica y la legislación vigente que aplica a los Ensayos Clínicos con medicamentos. Según estas Normas de BPC el promotor, investigador y monitor están obligados a cumplir con una serie de responsabilidades desde la puesta en marcha hasta el desarrollo y cierre del estudio. El monitor ha sido el encargado de poder verificar que cada parte ha cumplido con sus responsabilidades además de comprobar que los datos recogidos y, por tanto, analizados, son verídicos y que se ha asegurado en todo momento la protección y seguridad de los sujetos incluidos en el mismo.

Para poder continuar con esta línea de investigación es necesario concurrir a todas las convocatorias de financiación tanto públicas como privadas que sea posible y en nuestro caso para ello contamos con personal del IRYCIS que nos asesora y con el personal de SCReN que se ocupa de realizar los trámites. Además, el laboratorio que distribuye el medicamento en nuestro país y el fabricante de la silibina-fosfatidilcolina han mostrado interés en desarrollar una nueva formulación con una dosis tres veces superior o con características que mejoren la biodisponibilidad del principio activo.

Al estar dentro del IRYCIS contamos con su Unidad de Innovación que se ha incorporado a la RED de Innovación en Tecnologías Sanitarias (ITEMAS). La RETICS o Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud es una agrupación de profesionales pertenecientes a distintas instituciones, con líneas y objetivos de investigación, desarrollo e innovación comunes con el fin de promover la complementariedad de actuaciones compartiendo objetivos y recursos. Uno de los objetivos de esta Unidad es trasladar las ideas seleccionadas hacia propuestas de nuevos proyectos de investigación. También contamos con su apoyo en el caso de que

se genere una patente y para buscar socios o servir de contacto con los laboratorios interesados. Incluso nos ayudarían en el caso de concurrir a una convocatoria de ayudas para colaboraciones publico-privadas como por ejemplo «Retos-Colaboración», los organismos de investigación en este caso pueden conseguir financiación en subvención a fondo perdido y las empresas en forma de préstamos. Otras líneas de financiación, como las convocatorias de Proyectos Estratégicos CIEN y Proyectos de I+D de CDTI, premian que haya algún tipo de cooperación publico-privada. Esta cooperación es posible gracias a la normativa europea que rige las ayudas de Estado a la I+D que impulsa esta colaboración, permitiendo que los límites máximos de las ayudas a los beneficiarios sean más altos en el caso de colaboraciones efectivas entre organismos de investigación y empresas.

Teniendo en cuenta toda esta información, nuestro equipo investigador, podría optar por realizar todo el desarrollo clínico mencionado dentro de nuestro centro de investigación contando con la colaboración entre los Servicios de Farmacología Clínica, Gastroenterología, Enfermedades Infecciosas y Farmacia, del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

5.6. ASPECTOS ECONÓMICOS

Es importante señalar que obtener una formulación oral que consiguiera concentraciones séricas similares a las alcanzadas con la formulación intravenosa, supondría reducir los costes, debidos tanto a la propia formulación como a los que se generan en las visitas de ingreso o ambulatorias en las que estos pacientes reciben su dosis intravenosa. Si lo comparamos con las pautas de tratamiento con AADs recomendadas a día de hoy, con precios muy elevados, también estaríamos hablando de un ahorro importante, en el supuesto de que en un futuro los pacientes que ahora son tratados con AADs llegasen a ser tratados con silibina.

Este ahorro sería muy importante para contribuir a la sostenibilidad de nuestro Sistema Nacional de Salud.

Haciendo una estimación aproximada del coste de los tratamientos:

- **TRATAMIENTO CON SILIBINA IV:**

- 1 vial de Legalón Sil: 117,57 Euros por vial. Una media de 4 viales por dosis (en un paciente de 70 kg) durante 21 días: 9.876,51 Euros

TOTAL aproximado: $9876,51/21$ días= **470,31 Euros por día**

A esto habría que sumar las visitas al centro para recibir la administración intravenosa del fármaco, que según el BOE son de 329,87 (estancia en hospital de día sin pernoctación), teniendo en cuenta, que si no hay mayores complicaciones tras el TH el paciente trasplantado es dado de alta entre los 7 y 10 días tras el mismo. El resto de días de tratamiento debería acudir al hospital exclusivamente a recibir la dosis intravenosa.

Coste total= $9.876,51 + 3.298,70 = 13.175,21 / 21$ días= **627, 39 €/día.**

Si contásemos con la formulación oral, esta podría administrarse desde que el paciente pueda tragar, de modo que disminuiría considerablemente el número de dosis iv y por tanto del coste por día.

- **TRATAMIENTO CON SILIBINA ORAL:**

Para la formulación oral estaríamos únicamente hablando del precio de la propia formulación (alrededor de 4 g, según los datos de este trabajo), que aunque no se puede estimar aún, siempre va a ser menor que el coste de una formulación intravenosa o que la de los AADs.

TOTAL aproximado: Teniendo en cuenta que un paciente debería tomar al día aproximadamente 4 g de silibina, esto supondría tomar 100 cápsulas de Silyfit®. Cada caja de Silyfit contiene 60 cápsulas con un PVP aproximado de 25 Euros.

Consideramos para la estimación del coste 120 cápsulas de silyit® (2 cajas de 60 cápsulas) equivalentes a 4,8 gramos de silibina, con lo que el precio nunca superaría los **50 €/día.**

Además hay que tener en cuenta que fabricar este tipo de formulaciones industrialmente y con una formulación adecuada que permita disminuir el número de cápsulas, abarataría enormemente los costes de producción, viéndose reducido considerablemente el precio por día (hasta por debajo de 25 euros al día).

- **TRATAMIENTO CON NUEVOS AADs:**

Actualmente existen una gran cantidad de fármacos disponibles para el tratamiento de la infección por VHC y además hay numerosas pautas de tratamiento condicionadas por la situación clínica del paciente y por el propio virus (genotipo). Por todo esto se ha realizado esta estimación eligiendo un caso concreto: VHC genotipo 1, naive y sin cirrosis.

Se debe tener en cuenta para la interpretación de este apartado, que en paciente recién trasplantados estos fármacos no tienen indicación a día de hoy sumado a que la situación clínica de estos pacientes lo hace inviable, como ya se ha comentado previamente en este trabajo.

Según un análisis realizado por la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH), publicado en el **Informe GENESIS-SEFH de 29/07/2015**, en el que se hizo un **análisis de sensibilidad** modificando el precio de Sofosbuvir y Simeprevir a la baja, suponiendo un coste de adquisición de 8.177 € por envase de sofosbuvir, 8.533 € por envase de Simeprevir y 9.650 € de Daclatasvir, los costes calculados serían los siguientes:

	PegINF+RBV+SOF	SOF+RBV	SOF+SMV	SOF+DCV
Coste mensual	8.688 €	8.210 €	16.710 €	17.827 €
Coste tto. completo	26.065 € (12 semanas)* 52.130 € (24 semanas)**	24.632 € (12 semanas) 49.264 € (24 semanas)***	50.130 € (12 sem) 100.260 € (24 sem)***	53.481 € (12 sem) 106.962 € (24 sem)***
<p>*VHC Genotipo 2: SOF + RBV 12 sem **VHC genotipo 3 : SOF+ RBV 24 sem/SOF + RBV + PegINF 12 sem ***Se debe contemplar la posible ampliación de la duración del tratamiento hasta 24 sem; especialmente para los subgrupos que tienen uno o más factores históricamente asociados a menores tasas de respuesta a los tratamientos con interferón (p. ej. fibrosis/cirrosis avanzada, elevadas concentraciones virales basales, raza negra, genotipo IL28B no CC, previa respuesta nula al tto. con PegINF+RBV).</p>				

Tomando como referencia una de las pautas recomendada por las Autoridades Sanitarias para un paciente infectado por el VHC genotipo 1, naive y sin cirrosis, por ejemplo: SOF+SMV+RBV, se ha realizado una estimación del coste según los datos del **Informe GENESIS-SEFH de 29/07/2015**. Dicho coste sería: 50.130 € (SOF+SMV) + 100,80 € de RBV= **50.230,80 €** / 12 semanas:**84 días** = **597,98 € /día**

Por último destacar que dado el favorable perfil de seguridad de la silibina, disponer de una formulación oral eficaz, podría evitar costes añadidos. Estos costes adicionales podrían derivarse del uso de otros fármacos o incluso de los posibles ingresos hospitalarios o consultas médicas, asociados a las reacciones adversas derivadas del tratamiento con otro tipo de antiviral (como AADs).

Sería necesario completar estos datos con un estudio farmacoeconómico de los costes derivados de las actuales terapias antivirales aprobadas para el tratamiento de la infección por el VHC, teniendo en cuenta todos estos posibles costes añadidos.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha llevado a cabo un ensayo clínico con medicamentos fase I, en voluntarios sanos, de acuerdo con las Normas de Buena Práctica Clínica, la normativa legal vigente y las guías europeas para la realización de estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad. Asegurándose por tanto, la seguridad de los pacientes que se han incluido y la veracidad y calidad de los datos obtenidos que aportan nueva información acerca de esta línea de investigación del tratamiento de la infección por el VHC.
2. El objetivo principal del estudio, que es, describir la biodisponibilidad absoluta de la silibina oral tras la administración de la misma dosis por vía oral e intravenosa, se ha cumplido, siendo esta de **un 35%**.
3. El dato de biodisponibilidad absoluta (35%) indica que para alcanzar por vía oral concentraciones plasmáticas similares a las alcanzadas por vía intravenosa, habría que multiplicar por **2,8** la dosis intravenosa específica para cada paciente.
4. Se han cumplido todos los objetivos secundarios. Se ha descrito el perfil farmacocinético (Cmax, Tmax, t1/2) tras dosis única de ambos preparados.
5. Se ha obtenido el coeficiente de variación interindividual para ambas vías de administración. Este coeficiente de variación no supera el 30% en ninguno de los parámetros farmacocinéticos en ambas vías de administración.

6. Se ha evaluado el perfil de seguridad y tolerabilidad. La administración de ambos tratamientos fue bien tolerada en este estudio y no se produjo ninguna reacción adversa grave.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Shepard CW, Finelli L and Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 2005;5:558-67
2. Fraser CS, Doudna JA. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:29-38
3. Siridechadilok B, Fraser CS, Hall RJ, Doudna JA and Nogales E. Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* 2005;310:1513-5
4. Dusheiko G, Simmonds P. Sequence variability of hepatitis C virus and its clinical relevance. *J Viral Hepat* 1994;1:3-15
5. Colina R, Casane D, Vasquez S, et al. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2004;85:31-7
6. María Soledad Llanes, Natalia Soledad Palacios, Magalí Piccionea, María Guillermina Ruiz a y Carla Layana. Aspectos moleculares de la respuesta antiviral contra el virus de la hepatitis C importantes para el desarrollo de vacunas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(4):273–280
7. Sobchak DM, Korochkina OV and Monakova EA. [Cytokine spectrum in patients with chronic hepatitis C in the treatment with interferon-alpha drugs]. *Ter Arkh* 2005;77:70-2
8. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, et al. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:3468-72
9. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, et al. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2755-9
10. Alberti A. Optimizing PEG-interferon and ribavirin combination therapy for patients infected with HCV-2 or HCV-3: is the puzzle completed? *J Hepatol* 2004;40:1032-5
11. Bain C, Inchauspe G. [Dendritic cells and hepatitis C virus]. *Pathol Biol (Paris)* 2001;49:464-5
12. Sung VM, Shimodaira S, Doughty AL, et al. Establishment of B-cell lymphoma cell lines persistently infected with hepatitis C virus in vivo and in vitro: the apoptotic effects of virus infection. *J Virol* 2003;77:2134-46
13. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 2002;21:5017-25
14. Lozach PY, Amara A, Bartosch B, et al. C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004;279:32035-45
15. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998;282:938-41

16. Hsu M, Zhang J, Flint M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7271-6
17. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49:1335.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Testing for HCV infection: an update of guidance for clinicians and laboratorians. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013; 62:362.
19. Xu F, Moorman AC, Tong X, Gordon SC, Rupp LB, Lu M, Teshale EH, Spradling PR, Boscarino JA, Trinacty CM, Schmidt MA, Holmberg SD;CHECS Investigators. All-cause mortality and progression risks to hepatic decompensation and hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C. *Clin Infect Dis*. 2015 Sep 28.
20. Lawrence SP. Advances in the treatment of hepatitis C. *Adv Intern Med*. 2000;45:65-105.
21. Francisco Díaz de León Fernández de Castro and Pérez Corzo, 2003.
22. Sun J, Li K, Shata MT and Chan TS. The immunologic basis for hepatitis C infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:598-602
23. Kanno A, Kazuyama Y. Immunoglobulin G antibody avidity assay for serodiagnosis of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2002;68:229-33
24. Zibert A, Meisel H, Kraas W, Schulz A, Jung G and Roggendorf M. Early antibody response against hypervariable region 1 is associated with acute self-limiting infections of hepatitis C virus. *Hepatology* 1997;25:1245-9
25. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, Wie-land SF, Uprichard SL, Wakita T, Chisari FV: Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005,102(3):773-778.
26. Miguel Bruguera, , Xavier Forns. Hepatitis C en España. *Medicina Clínica*. Volume 127, Issue 3, June 2006, Pages 113–117)
27. McNamara, B. C., Losikoff, P. T., Huguenin, L., Macalino, G. E., Rich, J. D., and Gregory, S. H. (2013). Increasing Hepatitis C Prevalence and Associated Risk Behaviors among Incarcerated Young Adults. *J Urban Health*
28. Liu C, Vachharajani N, Song S, Cooke R, Kangrga I, Chapman WC, Grossman BJ. A quantitative model to predict blood use in adult orthotopic liver transplantation. *Transfus Apher Sci*. 2015 Aug 10. pii: S1473-0502(15)00143-3. doi: 10.1016/j.transci.2015.07.008.
29. McCaughan GW, Zekry A. Mechanisms of HCV reinfection and allograft damage after liver transplantation. *J Hepatol*. 2004;40(3):368-74.
30. Berenguer M, Ferrell L, Watson J, Prieto M, Kim M, Rayon M, et al. HCV-related fibrosis progression following liver transplantation: increase in recent years. *J Hepatol*. 2000;32(4):673-84.
31. Berenguer M, Prieto M, Rayon JM, Mora J, Pastor M, Ortiz V, et al. Natural history of clinically compensated hepatitis C virus-related graft cirrhosis after liver transplantation. *Hepatology*. 2000;32(4 Pt 1):852-8.

32. Narang TK, Ahrens W, Russo MW. Post-liver transplant cholestatic hepatitis C: a systematic review of clinical and pathological findings and application of consensus criteria. *Liver Transpl.* 2010;16(11):1228-35.
33. Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol.* 2001;35(5):666-78.
34. Guillouche P, Feray C. Systematic review: anti-viral therapy of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33(2):163-74.
35. Roche B, Samuel D. Risk factors for hepatitis C recurrence after liver transplantation. *J Viral Hepat.* 2007;14 Suppl 1:89-96.
36. Ballardini G, De Raffe E, Groff P, Bioulac-Sage P, Grassi A, Ghetti S, et al. Timing of reinfection and mechanisms of hepatocellular damage in transplanted hepatitis C virus-reinfected liver. *Liver Transpl.* 2002;8(1):10-20.
37. Garcia-Retortillo M, Fornis X, Feliu A, Moitinho E, Costa J, Navasa M, et al. Hepatitis C virus kinetics during and immediately after liver transplantation. *Hepatology.* 2002;35(3):680-7.
38. Berenguer M. What determines the natural history of recurrent hepatitis C after liver transplantation? *J Hepatol.* 2005;42(4):448-56.
39. Guerrero RB, Batts KP, Burgart LJ, Barrett SL, Germer JJ, Poterucha JJ, et al. Early detection of hepatitis C allograft reinfection after orthotopic liver transplantation: a molecular and histologic study. *Mod Pathol.* 2000;13(3):229-37.
40. Sansonno D, Lauletta G, De Re V, Tucci FA, Gatti P, Racanelli V, et al. Intrahepatic B cell clonal expansions and extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Eur J Immunol.* 2004;34(1):126-36.
41. Sreekumar R, Gonzalez-Koch A, Maor-Kendler Y, Batts K, Moreno-Luna L, Poterucha J, et al. Early identification of recipients with progressive histologic recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Hepatology.* 2000;32(5):1125-30.
42. Rosen HR, Hinrichs DJ, Gretch DR, Koziel MJ, Chou S, Houghton M, et al. Association of multispecific CD4(+) response to hepatitis C and severity of recurrence after liver transplantation. *Gastroenterology.* 1999;117(4):926-32.
43. Rosen HR, Miner C, Sasaki AW, Lewinsohn DM, Conrad AJ, Bakke A, et al. Frequencies of HCV-specific effector CD4+ T cells by flow cytometry: correlation with clinical disease stages. *Hepatology.* 2002;35(1):190-8.
44. Schirren CA, Jung M, Worzfeld T, Mamin M, Baretton GB, Gruener NH, et al. Cytokine profile of liver- and blood-derived nonspecific T cells after liver transplantation: T helper cells type 1/0 lymphokines dominate in recurrent hepatitis C virus infection and rejection. *Liver Transpl.* 2000;6(2):222-8.
45. Rodriguez-Luna H, Vargas HE. Management of hepatitis C virus infection in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(5):479-89.
46. Aytaman A, Kaufman M, Terrault NA. Management of posttransplant hepatitis C infection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(3):301-9.

47. Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroenterol*. 2008;14(31):4849-60.
48. Porter SB, Reddy KR. Factors that influence the severity of recurrent hepatitis C virus following liver transplantation. *Clin Liver Dis*. 2003;7(3):603-14.
49. Ficha Técnica Interferón disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/000281/WC500034679.pdf
50. Ficha Técnica Ribavirina disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/73658/FT_73658.pdf
51. Ficha técnica de Boceprevir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/002332/WC500109786.pdf
52. Ficha técnica de Telaprevir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/002313/WC500115529.pdf
53. Ficha Técnica de Simeprevir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/002777/WC500167867.pdf
54. Ficha Técnica de Sofosbuvir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/002798/WC500160597.pdf
55. Ficha técnica de Dasabuvir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/003837/WC500182233.pdf
56. Ficha técnica Daclatasvir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/003768/WC500172848.pdf
57. Ficha técnica de Ledipasvir disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR-Product_Information/human/003850/WC500177995.pdf
58. Informe de Posicionamiento Terapéutico de Harvoni disponible en: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-ledipasvir-sofosbuvir-harvoni.pdf>
59. Informe de Posicionamiento Terapéutico de Viekirax disponible en: <http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/informesPublicos/docs/IPT-viekirax-exviera.pdf>
60. European Association for the Study of the Liver (EASL). Recommendations on Treatment of Hepatitis C. 2014. Disponible en: <http://files.easl.eu/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-C/index.html>. Último acceso: diciembre de 2014.
61. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis infection. WHO April 2014. Disponible en:

- http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755_eng.pdf?ua=1&ua=1
62. Infectious Diseases Society of America (IDSA), American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) and the International Antiviral Society–USA (IAS–USA). Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C. Disponible en: <http://www.hcvguidelines.org/fullreport>
 63. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433-1444.
 64. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*. 2009;49(4):1335-1374.
 65. European Association for the Study of the Liver. Recommendations on treatment of hepatitis C. 2014 <http://files.easl.eu/easl-recommendations-on-treatment-of-hepatitis-C.pdf> (Accessed on April 14, 2014).
 66. Miller MH, Agarwal K, Austin A, et al. Review article: 2014 UK consensus guidelines - hepatitis C management and direct-acting anti-viral therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39:1363.
 67. World Health Organization. Guidelines for the screening, care, and treatment of persons with hepatitis C infection. April 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111747/1/9789241548755_eng.pdf?ua=1 (Accessed on April 14, 2014).
 68. <http://epidemiologiamolecular.com/tratamiento-hepatitis-cronica-vhc/>
 69. http://www.uptodate.com/contents/investigational-therapies-for-hepatitis-c-virus-infection?source=see_link
 70. Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway J. Regulation of hepatitis C virion production via phosphorylation of the NS5A protein. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000032.
 71. Bartels DJ1, Sullivan JC, Zhang EZ, Tigges AM, Dorrian JL, De Meyer S, Takemoto D, Dondero E, Kwong AD, Picchio G, Kieffer TL. Hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to direct-acting antivirals (DAAs) were rarely observed in DAA-naïve patients prior to treatment. *J Virol*. 2013 Feb;87(3):1544-53. doi: 10.1128/JVI.02294-12. Epub 2012 Nov 14.
 72. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009 Oct 8; 461 (7265): 798–801. doi: 10.1038/nature08463.
 73. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 2009 Sep 17;461(7262):399-401. doi: 10.1038/nature08309.
 74. Gastón R, Picchio. Resistencia a antivirales de acción directa contra el virus de la hepatitis C. *ISSN.actualizaciones en sida*. agosto 2012. vol 20; 77:87-94)

75. Watashi K, Hijikata M, Hosaka M, et al. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38:1282.
76. Yang F, Robotham JM, Nelson HB, et al. Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro. *J Virol* 2008; 82:5269.
77. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309:1577.
78. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; 327:198.
79. Walker CM, Grakoui A Hepatitis C virus: why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection *Curr Opin Immunol.* 2015 Aug;35:137-43. doi: 10.1016/j.coi.2015.06.010. Epub 2015 Aug
80. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, Grove J, Brimacombe C, McKeating JA, Pécheur EI, Graf TN, Oberlies NH, Lohmann V, Cao F, Tavis JE, Polyak SJ. Multiple Effects of silymarin on the Hepatitis C Virus Lifecycle. *Hepatology.* 2010 Jun;51(6):1912-21. doi: 10.1002/hep.23587.
81. Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, Rutter K, Beinhardt S, Hofer H, Schöniger-Hekele M, Holzmann H, Steindl-Munda P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/rivabirin therapy. *Gastroenterology* 2008; 135:1561-1567
82. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.* 2001;61(14):2035-63.
83. Miguez MP1, Anundi I, Sainz-Pardo LA, Lindros KO. Hepatoprotective mechanism of silymarin: no evidence for involvement of cytochrome P450 2E1. *Chem Biol Interact.* 1994 Apr;91(1):51-63.
84. Bosisio E1, Benelli C, Pirola O. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes *Pharmacol Res.* 1992 Feb-Mar;25(2):147-54.
85. Sonnenbichler J, Zetl I. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Prog Clin Biol Res.* 1986;213:319-31.
86. Baer-Dubowska W1, Szaefer H, Krajka-Kuzniak V. Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds. *Xenobiotica.* 1998 Aug;28(8):735-43.
87. Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Med.* 1989 Oct;55(5):417-9.
88. Dehmlow C1, Erhard J, de Groot H Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology.* 1996 Apr;23(4):749-54.

89. Fuchs EC1, Weyhenmeyer R, Weiner OH. Effects of silibinin and of a synthetic analogue on isolated rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Arzneimittelforschung*. 1997 Dec;47(12):1383-7.
90. Deák G, Müzes G, Láng , Niederland V, Nékám K, Gonzalez-Cabello R, Gergely P, Fehér J. [Immunomodulator effect of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases]. *Orv Hetil*. 1990 Jun 17;131(24):1291-2, 1295-6.
91. Janela McClure, Erica S. Lovelace, Shokrollah Elahi, Nicholas J. Maurice, Jessica Wagoner, Joan Dragavon, John E. Mittler, Zane Kraft, Leonidis Stamatatos, Helen Horton, Stephen C. De Rosa Robert W. Coombs, and Stephen J. Polyak. Silibinin Inhibits HIV-1 Infection by Reducing Cellular Activation and Proliferation. *PLoS One*. 2012;7(7):e41832. doi:10.1371/journal.pone.0041832. Epub 2012 Jul 25.
92. Boari C, Montanari FM, Galletti GP, et al. Epatopatie tossiche professionali. Effetti terapeutici della silimarina. *MinervavMed* 1981; 72: 2679-88
93. Barzaghi N, Crema F, Gatti G, et al. Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin-phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1990; 15: 333-8
94. Szilard S, Szentgyorgyi D, Demeter I. Protective effect of Legalon in workers exposed to organic solvents. In: *Acta Med Hung* 1988; 45: 249-56
95. Ficha Técnica de Legalón disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/59430/FT_59430.pdf
96. Ferenci P, Scherzer TM, Kerschner H, Rutter K, Beinhardt S, Hofer H, Schöniger-Hekele M, Holzmann H, Steindl-Munda P. Silibinin is a potent antiviral agent in patients with chronic hepatitis C not responding to pegylated interferon/rivabirin therapy. *Gastroenterology* 2008; 135:1561-156
97. Bárcena R, Moreno A, Rodríguez-Gandía MA, Albillos A, Arocena C, Blesa C, García-Hoz F, Graus J, Nuño J, López-Hervás P, Gajate L, Martínez A, Bermejo T, Mateos ML, Del Campo S; Hospital Ramón y Cajal Liver Transplant Group. Safety and anti-HCV effect of prolonged intravenous silibinin in HCV genotype 1 subjects in the immediate liver transplant period. *J Hepatol*. 2013 Mar;58(3):421-6
98. Ficha Técnica de Legalón oral disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/52190/FT_52190.pdf
99. Fukumoto T, Berg T, Ku Y, Bechstein WO, Knoop M, Lemmens HP et al. Viral dynamics of hepatitis C early after orthotopic liver transplantation: evidence for rapid turnover of serum virions. *Hepatology* 1996; 24(6):1351-1354.
100. Neumann UP, Biermer M, Eurico D, Neuhaus P, Berg T. Successful prevention of hepatitis C Virus (VHC) liver graft reinfection by silibinin monotherapy. *Journal of Hepatology*, 2010; 52: 951-954
101. Beinhardt S, Rasoul-Rockenschaub S, Scherzer TM, Ferenci P. Silibinin monotherapy prevents graft infection after orthotopic liver transplantation in a patient with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 54(3):591-592.
102. Eurich D; Bahra M; Berg T; Boas-Knoop S; Biermer M; Neuhaus R; Neuhaus P; Neumann U. Treatment of hepatitis C-Virus-reinfection after liver

- transplant with Silibinin in Nonresponders to Peginterferon-based therapy. *Experimental and Clinical Transplantation*. 2011;9
103. Hawke R, Schrieber S, Soule T, Wen Z, Smith P, Reddy R, Washed A, Belle S, Afdhal N, Navarro V, Bermen J, Liu Q, Doo E and Fried M. Silymarin Ascending Multiple Oral Dosing Phase I Study in Non-cirrhotic Patients with Chronic Hepatitis C. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2010; 50:434- 449.
 104. Orlando R, Fragasso A, Lampertico M and Arena C. Silybin kinetics in patient with liver cirrhosis: A comparative study of a silybin-phosphatidylcholine complex and silymarin. *Medical Science Research*, 1990; 18: 861-863.
 105. Silybin-Phosphatidylcholine Complex- Monograph. *Alternative Medicine Review*, 2009; 14 (4): 385-390.
 106. Abenavoli L, Capasso R, Milic N and Capasso F. Milk Thistle in Liver Diseases: Past, Present, Future. *Phytotherapy Research*, 2010; 24: 1423-1432
 107. Biermer M and Berg T. Rapid Suppression of Hepatitis C Viremia Induced by Intravenous Silybin Plus Rivabirin. *Gastroenterology*, 2009; 137:390-396
 108. Payer BA, Reiberger T, Rutter K, Beinhardt S, Staettermayer AF, Peck-Radosavljevic M and Ferenci P. Successful HCV eradication and inhibition of HIV replication by Intravenous Silybinin in an HIV-HCV Coinfected Patient. *Journal of Clinical Virology*, 2010; 49: 131-133.
 109. Falasca K, Ucciferri C, Mancino P, Vitacolonna E, De Tuillo D, Pizzigallo E, Conti P and Vechiet J. Treatment With Silybin-Vitamin E-Phospholipid Complex in Patients With Hepatitis C Infection. *Journal of Medical Virology*, 2008; 80:1900–1906.
 110. Kid P, Head K. A Review of the Bioavailability and Clinical Efficacy of Milk Thistle Phytosome: A Silybin-Phosphatidylcholine Complex (Siliphos®). *Alternative Medicine Review*, 2005; 10 (3): 193-203.
 111. Kid P. Bioavailability and Activity of Phytosome Complexes from Botanical Polyphenols: The Silymarin, Curcumin, Green Tea and Grape Seed Extract. *Alternative Medicine Review*, 2009. 14 (3): 226-246.
 112. Barzaghi N, Crema F, Gatti G, Pifferi G and Perucca E. Pharmacokinetic Studies on IdB 1016, a Silybin-Phosphatidylcholine Complex, in healthy human subjects. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1990; 15 (4): 333-338.
 113. Flaig T, Gustafson D, Su LJ, Zirrolli J, Crighton F, Harrison G, Pierson S, Agarwal R and Glodé LM. A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients. *Invest New Drugs*, 2007; 25:139-146.
 114. Flaig T, Glodé M, Gustafson D, Van Bockoven A, Tao Y, Wilson S, Su LJ, Li Y, Harrison G, Agarwal R, Crawford ED, Lucia MS and Pollak M. A Study of High-Dose Oral Silybin-Phytosome Followed by Prostatectomy in Patients with Localized Prostate Cancer. *The prostate* 2010; 70: 848-855.
 115. Bakke OM, Carné X, García Alonso F. Ensayos en sujetos sanos. En: Bakke OM, Carné X, García-Alonso F (ed). "Ensayos clínicos con medicamentos". Mosby/Doyma Libros, Madrid,1994: 138-156

116. Spilker B. Dosing schedule. En: Spilker B (ed). "Guide to clinical trials". Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996: 93-101)
117. Bakke OM, Carné X, García Alonso F. Ensayos de búsqueda de dosis. En: Bakke OM, Carné X, García-Alonso F (ed). "Ensayos clínicos con medicamentos". Mosby/Doyma Libros, Madrid, 1994: 157-168.)
118. Sheiner LB, Beal SL, Sambol NC. Study design for dose-ranging. Clinical Pharmacology & Therapeutics 1989; 46: 63-77

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I: FARMACOCINÉTICA Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Concentraciones de Silibina total administrada a la dosis de 360 mg (Sylifit) por vía oral

ng/ml	Voluntarios							
Tiempo de la extracción	Vol 01	Vol 02	Vol 03	Vol 04	Vol 05	Vol 06	Vol 07	Vol 08
0,000	0	0	0	0	0	0	0	0
0,083	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,166	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0,333	0	0	0	129.898	0	0	25.392	0
0,666	1069.518	677.071	220.537	937.866	0	55.939	119.769	15.158
1	1646.305	1232.314	1130.78	1087.72	6.439	186.208	213.517	162.711
1,333	2039.58	1282.682	1229.605	1797.577	413.162	296.033	257.408	276.536
1,666	2072.804	1323.28	1247.255	2874.923	813.676	512.468	292.096	331.932
2	1650.387	1623.164	1222.967	2523.271	904.386	1212.412	420.999	647.138
2,5	1451.482	2058.547	1179.237	2375.289	1368.761	2099.741	463.047	1208.785
3	1196.114	2300.735	1044.524	1813.07	2042.086	2162.162	533.237	1780.48
4	624.214	1679.73	695.599	1174.641	940.098	1982.221	1799.018	1363.62
6	348.934	1004.411	345.771	806.207	818.32	934.632	800.894	481.884
8	225.156	526.991	251.15	495.34	528.771	573.992	384.83	234.629
12	154.386	233.748	150.279	268.867	284.526	295	153.531	117.71

Concentraciones de Silibina total administrado a la dosis de 350 (Legalon) por vía iv

ng/ ml	Voluntarios							
Tiempo de la extracción	Vol 01	Vol 02	Vol 03	Vol 04	Vol 05	Vol 06	Vol 07	Vol 08
0,000	0	0	0	0	0	0	0	0
0,083	1477.562	2114.668	1892.512	1684.2	1507.655	1966.394	2659.038	2600.18
0,166	2305.729	2844.616	2914.362	3003.932	3295.602	2589.587	2649.914	2656.034
0,333	2865.109	3575.191	3716.179	3697.655	3581.634	3818.268	3576.34	3059.38
0,666	3452.788	4836.17	4629.656	4735.33	4222.238	4290.208	4265.2	3873.91
1	3926.474	5554.061	5978.503	6354.431	5004.068	5965.786	5646.544	4416.843
1,333	4529.586	5602.838	6936.362	7078.485	5596.472	6623.622	5778.988	5476.264
1,666	4904.175	6445.086	7109.37	7772.07	6335.492	6400.768	6174.503	6544.199
2	4981.405	6850.185	9246.989	12070.9	7412.533	7941.036	7274.817	6954.632
2,5	2245.072	4639.643	4372.989	6791.596	4878.865	5235.348	4457.876	4052.831
3	1291.012	2799.851	2930.317	4343.77	3292.444	2860.202	2739.411	2714.27
4	792.932	1773.442	1756.26	3156.32	1928.117	1650.652	1620.335	1629.321
6	411.1	984.991	896.585	1850.57	949.278	754.718	894.175	812.758
8	256.188	698.824	565.72	1168.154	584.373	482.406	527.703	440.569
12	127.858	389.77	270.862	706.707	404.474	233.74	296.919	217.808

Análisis farmacocinético individual

Análisis para Sylifit. Silibina total

Start Time: 13:19:37 04-07-2014

End Time: 13:19:37 04-07-2014

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (V02.0A)

Core Version 18May98

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (V02.0A)

Core Version 18May98

Listing of input commands

MODEL 200
NVARIABLES 6
NPOINTS 100
XNUMBER 2
YNUMBER 6
DTIME 0
NCONSTANTS 1
CONSTANTS 350
METHOD 2 'Linear trapezoidal'
NCATRANS
MISSING 'Missing'
NOBSERVATIONS 15
DATA 'WINNLIN.DAT'

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Noncompartmental Analysis for Extravascular Administration

Voluntario=1

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	1070.			178.1	118.6	
1.000	1646.			631.6	512.5	
1.333	2040.			1245.	1239.	
1.666	* 2073.	1583.	489.7	1930.	2267.	1.000
2.000	* 1650.	1450.	200.1	2552.	3395.	1.000
2.500	* 1451.	1272.	179.4	3327.	5127.	1.000
3.000	* 1196.	1116.	80.39	3989.	6931.	1.000
4.000	* 624.2	858.3	-234.1	4899.	9974.	1.000
6.000	* 348.9	508.0	-159.0	5872.	.1456E+05	1.000
8.000	* 225.2	300.6	-75.46	6447.	.1846E+05	1.000
12.00	* 154.4	105.3	49.10	7206.	.2577E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9140
Rsq(adjusted)	.8997
Corr(x:y)	-.9561
Tlag	.3330
Tmax	1.6660
Cmax	2072.8040
No._points_Lambda_z	8
Tlast	12.0000
Clast	154.3860
AUClast	7205.6541
Lambda_z	.2623
Lambda_z_lower	1.6660
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	2.6427
AUCall	7205.6541
AUCINF(observed)	7794.2724
AUCINF(observed)/D	21.6508
AUC_%Extrap(obs.)	7.5519

Vz(observed)/F	.1761
Cl(observed)/F	.0462
AUCINF(predicted)	7607.0742
AUCINF(predicted)/D	21.1308
AUC_%Extrap(pred.)	5.2769
Vz(predicted)/F	.1804
Cl(predicted)/F	.0473
AUMClast	25767.1460
AUMCINF(observed)	35074.7554
AUMC_%Extrap(obs.)	26.5365
AUMCINF(predicted)	32114.6572
AUMC_%Extrap(pred.)	19.7652
MRTlast	3.5760
MRTINF(observed)	4.5001
MRTINF(predicted)	4.2217

Voluntario=2

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	677.1			112.7	75.08	
1.000	1232.			431.6	356.2	
1.333	1283.			850.3	846.0	
1.666	1323.			1284.	1498.	
2.000	1623.			1776.	2408.	
2.500	2059.			2697.	4506.	
3.000	* 2301.	2167.	133.9	3787.	7518.	1.000
4.000	* 1680.	1678.	1.917	5777.	.1433E+05	1.000
6.000	* 1004.	1006.	-1.517	8461.	.2707E+05	1.000
8.000	* 527.0	603.1	-76.11	9992.	.3732E+05	1.000
12.00	* 233.7	216.8	16.96	.1151E+05	.5136E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9919
Rsq(adjusted)	.9892
Corr(x:y)	-.9959
Tlag	.3330
Tmax	3.0000
Cmax	2300.7350
No._points_Lambda_z	5
Tlast	12.0000
Clast	233.7480
AUClast	11513.7970
Lambda_z	.2558
Lambda_z_lower	3.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	2.7098

AUCall	11513.7970
AUCINF(observed)	12427.6230
AUCINF(observed)/D	34.5212
AUC_%Extrap(obs.)	7.3532
Vz(observed)/F	.1132
Cl(observed)/F	.0290
AUCINF(predicted)	12361.3209
AUCINF(predicted)/D	34.3370
AUC_%Extrap(pred.)	6.8563
Vz(predicted)/F	.1139
Cl(predicted)/F	.0291
AUMClast	51358.5633
AUMCINF(observed)	65897.0314
AUMC_%Extrap(obs.)	22.0624
AUMCINF(predicted)	64842.2021
AUMC_%Extrap(pred.)	20.7945
MRTlast	4.4606
MRTINF(observed)	5.3025
MRTINF(predicted)	5.2456

Voluntario=3

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	220.5			36.72	24.46	
1.000	1131.			262.4	237.8	
1.333	1230.			655.4	699.0	
1.666	1247.			1068.	1318.	
2.000	1223.			1480.	2073.	
2.500	1179.			2081.	3422.	
3.000	1045.			2637.	4942.	
4.000	695.6			3507.	7900.	
6.000	* 345.8	339.6	6.163	4548.	.1276E+05	1.000
8.000	* 251.2	258.0	-6.868	5145.	.1684E+05	1.000
12.00	* 150.3	148.9	1.345	5948.	.2447E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9968
Rsq(adjusted)	.9936
Corr(x:y)	-.9984
Tlag	.3330
Tmax	1.6660
Cmax	1247.2550
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	150.2790
AUClast	5948.0195
Lambda_z	.1374
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000

t1/2_Lambda_z	5.0454
AUCall	5948.0195
AUCINF(observed)	7041.8983
AUCINF(observed)/D	19.5608
AUC_%Extrap(obs.)	15.5339
Vz(observed)/F	.3721
Cl(observed)/F	.0511
AUCINF(predicted)	7032.1056
AUCINF(predicted)/D	19.5336
AUC_%Extrap(pred.)	15.4162
Vz(predicted)/F	.3726
Cl(predicted)/F	.0512
AUMClast	24466.2173
AUMCINF(observed)	45555.0922
AUMC_%Extrap(obs.)	46.2931
AUMCINF(predicted)	45366.2993
AUMC_%Extrap(pred.)	46.0696
MRTlast	4.1133
MRTINF(observed)	6.4691
MRTINF(predicted)	6.4513

Voluntario=4

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	129.9			10.85	3.612	
.6660	937.9			188.6	114.8	
1.000	1088.			526.9	400.8	
1.333	1798.			1007.	980.8	
1.666	2875.			1785.	2177.	
2.000	2523.			2687.	3820.	
2.500	2375.			3911.	6566.	
3.000	1813.			4959.	9410.	
4.000	* 1175.	1142.	32.83	6452.	.1448E+05	1.000
6.000	* 806.2	787.5	18.75	8433.	.2402E+05	1.000
8.000	* 495.3	543.1	-47.73	9735.	.3282E+05	1.000
12.00	* 268.9	258.3	10.57	.1126E+05	.4719E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9906
Rsq(adjusted)	.9859
Corr(x:y)	-.9953
Tlag	.1660
Tmax	1.6660
Cmax	2874.9230
No._points_Lambda_z	4
Tlast	12.0000
Clast	268.8670
AUClast	11263.1679
Lambda_z	.1858
Lambda_z_lower	4.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.7309
AUCall	11263.1679

AUCINF(observed)	12710.3733
AUCINF(observed)/D	35.3066
AUC_%Extrap(obs.)	11.3860
Vz(observed)/F	.1525
Cl(observed)/F	.0283
AUCINF(predicted)	12653.4704
AUCINF(predicted)/D	35.1485
AUC_%Extrap(pred.)	10.9875
Vz(predicted)/F	.1531
Cl(predicted)/F	.0285
AUMClast	47193.3672
AUMCINF(observed)	72349.5699
AUMC_%Extrap(obs.)	34.7704
AUMCINF(predicted)	71360.4490
AUMC_%Extrap(pred.)	33.8662
MRTlast	4.1901
MRTINF(observed)	5.6922
MRTINF(predicted)	5.6396

Voluntario=5

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	.0000			.0000	.0000	
1.000	6.439			1.075	1.075	
1.333	413.2			70.94	93.85	
1.666	813.7			275.2	411.3	
2.000	904.4			562.1	939.7	
2.500	1369.			1130.	2247.	
3.000	2042.			1983.	4634.	
4.000	940.1			3474.	9578.	
6.000	* 818.3	789.2	29.12	5233.	.1825E+05	1.000
8.000	* 528.8	558.3	-29.54	6580.	.2739E+05	1.000
12.00	* 284.5	279.4	5.109	8206.	.4268E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9918
Rsq(adjusted)	.9837
Corr(x:y)	-.9959
Tlag	.6660
Tmax	3.0000
Cmax	2042.0860
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	284.5260
AUClast	8206.3173
Lambda_z	.1731
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	4.0054
AUCall	8206.3173

AUCINF(observed)	9850.4854
AUCINF(observed)/D	27.3625
AUC_%Extrap(obs.)	16.6912
Vz(observed)/F	.2112
Cl(observed)/F	.0365
AUCINF(predicted)	9820.9631
AUCINF(predicted)/D	27.2805
AUC_%Extrap(pred.)	16.4408
Vz(predicted)/F	.2118
Cl(predicted)/F	.0367
AUMClast	42677.0915
AUMCINF(observed)	71908.1346
AUMC_%Extrap(obs.)	40.6505
AUMCINF(predicted)	71383.2683
AUMC_%Extrap(pred.)	40.2142
MRTlast	5.2005
MRTINF(observed)	7.3000
MRTINF(predicted)	7.2685

Voluntario=6

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	55.94			9.314	6.203	
1.000	186.2			49.75	43.52	
1.333	296.0			130.0	140.2	
1.666	512.5			264.7	348.1	
2.000	1212.			552.7	895.6	
2.500	2100.			1381.	2814.	
3.000	2162.			2446.	5748.	
4.000	1982.			4518.	.1296E+05	
6.000	* 934.6	894.2	40.42	7435.	.2649E+05	1.000
8.000	* 574.0	613.3	-39.35	8944.	.3669E+05	1.000
12.00	* 295.0	288.6	6.449	.1068E+05	.5296E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9898
Rsq(adjusted)	.9796
Corr(x:y)	-.9949
Tlag	.3330
Tmax	3.0000
Cmax	2162.1620
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	295.0000
AUClast	10681.8824
Lambda_z	.1885
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.6769

AUCall	10681.8824
AUCINF(observed)	12246.7653
AUCINF(observed)/D	34.0188
AUC_%Extrap(obs.)	12.7779
Vz(observed)/F	.1559
Cl(observed)/F	.0294
AUCINF(predicted)	12212.5570
AUCINF(predicted)/D	33.9238
AUC_%Extrap(pred.)	12.5336
Vz(predicted)/F	.1564
Cl(predicted)/F	.0295
AUMClast	52956.0740
AUMCINF(observed)	80035.8845
AUMC_%Extrap(obs.)	33.8346
AUMCINF(predicted)	79443.9196
AUMC_%Extrap(pred.)	33.3416
MRTlast	4.9576
MRTINF(observed)	6.5353
MRTINF(predicted)	6.5051

Voluntario=7

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	25.39			2.120	.7060	
.6660	119.8			26.29	15.39	
1.000	213.5			81.95	64.37	
1.333	257.4			160.4	157.1	
1.666	292.1			251.8	295.2	
2.000	421.0			370.9	517.1	
2.500	463.0			591.9	1017.	
3.000	533.2			841.0	1706.	
4.000	1799.			2007.	6104.	
6.000	* 800.9	740.7	60.20	4607.	.1811E+05	1.000
8.000	* 384.8	432.7	-47.85	5793.	.2599E+05	1.000

12.00 * 153.5 147.6 5.883 6870. .3583E+05 1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9844
Rsq(adjusted)	.9688
Corr(x:y)	-.9922
Tlag	.1660
Tmax	4.0000
Cmax	1799.0180
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	153.5310
AUClast	6869.5046
Lambda_z	.2688
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	2.5787
AUCall	6869.5046
AUCINF(observed)	7440.6914
AUCINF(observed)/D	20.6686
AUC_%Extrap(obs.)	7.6765
Vz(observed)/F	.1800
Cl(observed)/F	.0484
AUCINF(predicted)	7418.8064
AUCINF(predicted)/D	20.6078
AUC_%Extrap(pred.)	7.4042
Vz(predicted)/F	.1805
Cl(predicted)/F	.0485
AUMClast	35831.6813
AUMCINF(observed)	44810.9290
AUMC_%Extrap(obs.)	20.0381
AUMCINF(predicted)	44466.8902
AUMC_%Extrap(pred.)	19.4194
MRTlast	5.2161
MRTINF(observed)	6.0224
MRTINF(predicted)	5.9938

Voluntario=8

Farmaco=SIL

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	.0000			.0000	.0000	
.1660	.0000			.0000	.0000	
.3330	.0000			.0000	.0000	
.6660	15.16			2.524	1.681	
1.000	162.7			32.23	30.54	
1.333	276.5			105.4	119.0	
1.666	331.9			206.7	272.5	
2.000	647.1			370.2	581.0	
2.500	1209.			834.2	1660.	
3.000	* 1780.	1554.	227.0	1581.	3751.	1.000
4.000	* 1364.	1136.	227.7	3154.	9149.	1.000
6.000	* 481.9	607.4	-125.5	4999.	.1749E+05	1.000
8.000	* 234.6	324.7	-90.11	5716.	.2226E+05	1.000
12.00	* 117.7	92.83	24.88	6420.	.2884E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9494
Rsq(adjusted)	.9325
Corr(x:y)	-.9744
Tlag	.3330
Tmax	3.0000
Cmax	1780.4800
No._points_Lambda_z	5
Tlast	12.0000
Clast	117.7100
AUClast	6420.2192
Lambda_z	.3131
Lambda_z_lower	3.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	2.2142
AUCall	6420.2192

AUCINF(observed)	6796.2276
AUCINF(observed)/D	18.8784
AUC_%Extrap(obs.)	5.5326
Vz(observed)/F	.1692
Cl(observed)/F	.0530
AUCINF(predicted)	6716.7654
AUCINF(predicted)/D	18.6577
AUC_%Extrap(pred.)	4.4150
Vz(predicted)/F	.1712
Cl(predicted)/F	.0536
AUMClast	28842.0456
AUMCINF(observed)	34555.2534
AUMC_%Extrap(obs.)	16.5335
AUMCINF(predicted)	33347.8766
AUMC_%Extrap(pred.)	13.5116
MRTlast	4.4924
MRTINF(observed)	5.0845
MRTINF(predicted)	4.9649

Análisis para Legalon®. Silibina total

Input File: Data - [T:\FARMAC~1\UEC\ESTUDI~1\ESTUDI~2\PK-SIL~1\UEC\POST-D~1\RESULT~1\MODELO~1\LEGALON.WDO]

Voluntario=1

Farmaco=LEG

Start Time: 09:38:41 05-08-2014

End Time: 09:38:41 05-08-2014

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM (V02.0A)

Core Version 18May98

Listing of input commands

MODEL 202
 NVARIABLES 6
 NPOINTS 100
 XNUMBER 2
 YNUMBER 6
 DTIME 0
 NCONSTANTS 2
 CONSTANTS 350,2
 METHOD 2 'Linear trapezoidal'
 NCATRANS
 MISSING 'Missing'
 NOBSERVATIONS 15
 DATA 'WINNLIN.DAT'
 BEGIN

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	1478.			61.32	5.089	
.1660	2306.			218.3	26.06	
.3330	2865.			650.1	137.7	

Tesis Doctoral: M^a Luisa Serrano Olmeda

ENSAYO CLÍNICO FASE I, ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBINA ORAL

.6660	3453.		1702.	679.4	
1.000	3926.		2934.	1719.	
1.333	4530.		4342.	3378.	
1.666	4904.		5913.	5744.	
2.000	4981.		7564.	8772.	
2.500	2245.		9371.	.1267E+05	
3.000	1291.		.1025E+05	.1504E+05	
4.000	792.9		.1130E+05	.1856E+05	
6.000	* 411.1	396.6	14.47	.1250E+05	.2420E+05 1.000
8.000	* 256.2	270.3	-14.15	.1317E+05	.2871E+05 1.000
12.00	* 127.9	125.6	2.271	.1394E+05	.3588E+05 1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9935
Rsq(adjusted)	.9870
Corr(x:y)	-.9967

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	4981.4050
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	127.8580
AUClast	13935.9283
Lambda_z	.1917
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.6164
AUCall	13935.9283
AUCINF(observed)	14603.0148
AUCINF(observed)/D	41.7229
AUC_%Extrap(obs.)	4.5681
Vz(observed)	.1250
Cl(observed)	.0240
AUCINF(predicted)	14591.1681
AUCINF(predicted)/D	41.6891
AUC_%Extrap(pred.)	4.4907
Vz(predicted)	.1252
Cl(predicted)	.0240

AUMClast	35881.8761
AUMCINF(observed)	47367.3727
AUMC_%Extrap(obs.)	24.2477
AUMCINF(predicted)	47163.4030
AUMC_%Extrap(pred.)	23.9201
MRTlast	1.5748
MRTINF(observed)	2.2437
Vss(observed)	.0538
MRTINF(predicted)	2.2323
Vss(predicted)	.0535

Voluntario=2

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	2115.			87.76	7.284	
.1660	2845.			293.6	34.16	
.3330	3575.			829.6	173.0	
.6660	4836.			2230.	907.5	
1.000	5554.			3965.	2373.	
1.333	5603.			5823.	4541.	
1.666	6445.			7829.	7573.	
2.000	6850.			.1005E+05	.1165E+05	
2.500	4640.			.1292E+05	.1798E+05	
3.000	2800.			.1478E+05	.2298E+05	
4.000	1773.			.1707E+05	.3072E+05	
6.000	* 985.0	970.7	14.34	.1983E+05	.4373E+05	1.000
8.000	* 698.8	714.4	-15.54	.2151E+05	.5523E+05	1.000
12.00	* 389.8	386.9	2.847	.2369E+05	.7576E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9983
Rsq(adjusted)	.9966
Corr(x:y)	-.9991

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	6850.1850
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	389.7700
AUClast	23687.6094

Lambda_z	.1533
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	4.5218
AUCall	23687.6094
AUCINF(observed)	26230.2915
AUCINF(observed)/D	74.9437
AUC_%Extrap(obs.)	9.6937
Vz(observed)	.0870
Cl(observed)	.0133
AUCINF(predicted)	26211.7209
AUCINF(predicted)/D	74.8906
AUC_%Extrap(pred.)	9.6297
Vz(predicted)	.0871
Cl(predicted)	.0134
AUMClast	75764.7459
AUMCINF(observed)	122864.2330
AUMC_%Extrap(obs.)	38.3346
AUMCINF(predicted)	122520.2390
AUMC_%Extrap(pred.)	38.1614
MRTlast	2.1985
MRTINF(observed)	3.6841
Vss(observed)	.0492
MRTINF(predicted)	3.6743
Vss(predicted)	.0491

Voluntario=3

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	1893.			78.54	6.519	
.1660	2914.			278.0	33.11	
.3330	3716.			831.7	176.8	
.6660	4630.			2221.	896.3	
1.000	5979.			3993.	2410.	
1.333	6936.			6143.	4944.	
1.666	7109.			8482.	8456.	
2.000	9247.			.1121E+05	.1352E+05	
2.500	4373.			.1462E+05	.2088E+05	
3.000	2930.			.1644E+05	.2581E+05	
4.000	1756.			.1879E+05	.3372E+05	
6.000	* 896.6	873.3	23.32	.2144E+05	.4612E+05	1.000
8.000	* 565.7	588.5	-22.81	.2290E+05	.5603E+05	1.000
12.00	* 270.9	267.3	3.546	.2458E+05	.7158E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9967
Rsq(adjusted)	.9933
Corr(x:y)	-.9983

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	9246.9890
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	270.8620
AUClast	24575.6936

Lambda_z	.1973
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.5131
AUCall	24575.6936
AUCINF(observed)	25948.5310
AUCINF(observed)/D	74.1387
AUC_%Extrap(obs.)	5.2906
Vz(observed)	.0684
Cl(observed)	.0135
AUCINF(predicted)	25930.5578
AUCINF(predicted)/D	74.0873
AUC_%Extrap(pred.)	5.2250
Vz(predicted)	.0684
Cl(predicted)	.0135
AUMClast	71580.0160
AUMCINF(observed)	95012.1547
AUMC_%Extrap(obs.)	24.6623
AUMCINF(predicted)	94705.3820
AUMC_%Extrap(pred.)	24.4182
MRTlast	1.9126
MRTINF(observed)	2.6616
Vss(observed)	.0359
MRTINF(predicted)	2.6523
Vss(predicted)	.0358

Voluntario=4

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	1684.			69.89	5.801	
.1660	3004.			264.5	32.30	
.3330	3698.			824.0	176.7	
.6660	4735.			2228.	906.9	
1.000	6354.			4080.	2495.	
1.333	7078.			6317.	5124.	
1.666	7772.			8789.	8851.	

2.000	.1207E+05			.1210E+05	.1504E+05	
2.500	6792.			.1682E+05	.2532E+05	
3.000	* 4344.	3791.	552.3	.1960E+05	.3283E+05	1.000
4.000	* 3156.	3100.	55.88	.2335E+05	.4566E+05	1.000
6.000	* 1851.	2073.	-222.7	.2836E+05	.6938E+05	1.000
8.000	* 1168.	1386.	-218.2	.3138E+05	.8983E+05	1.000
12.00	* 706.7	619.9	86.79	.3513E+05	.1255E+06	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (D_{TIME}) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rs _q	.9636
Rs _q (adjusted)	.9515
Corr(x:y)	-.9817

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

T _{max}	2.0000
C _{max}	12070.9000
No._points_Lambda_z	5
T _{last}	12.0000
C _{last}	706.7070
AUC _{last}	35127.9368
Lambda_z	.2012
Lambda_z_lower	3.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t _{1/2} _Lambda_z	3.4448
AUC _{call}	35127.9368
AUC _{INF} (observed)	38640.1434
AUC _{INF} (observed)/D	110.4004
AUC_%Extrap(obs.)	9.0895
V _z (observed)	.0450
Cl(observed)	.0091
AUC _{INF} (predicted)	38208.8033
AUC _{INF} (predicted)/D	109.1680
AUC_%Extrap(pred.)	8.0632
V _z (predicted)	.0455
Cl(predicted)	.0092
AUM _{clast}	125484.5768
AUM _{CINF} (observed)	185086.0899
AUMC_%Extrap(obs.)	32.2020
AUM _{CINF} (predicted)	177766.3267

AUMC_%Extrap(pred.)	29.4104
MRTlast	2.5722
MRTINF(observed)	3.7900
Vss(observed)	.0343
MRTINF(predicted)	3.6525
Vss(predicted)	.0335

Voluntario=5

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	1508.			62.57	5.193	
.1660	3296.			261.9	33.09	
.3330	3582.			836.2	178.4	
.6660	4222.			2135.	845.1	
1.000	5004.			3676.	2150.	
1.333	5596.			5441.	4226.	
1.666	6335.			7428.	7225.	
2.000	7413.			9724.	.1146E+05	
2.500	* 4879.	3328.	1551.	.1280E+05	.1822E+05	1.000
3.000	* 3292.	2926.	366.5	.1484E+05	.2374E+05	1.000
4.000	* 1928.	2262.	-334.0	.1745E+05	.3253E+05	1.000
6.000	* 949.3	1352.	-402.8	.2033E+05	.4594E+05	1.000
8.000	* 584.4	808.2	-223.8	.2186E+05	.5631E+05	1.000
12.00	* 404.5	288.7	115.7	.2384E+05	.7537E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsqr	.8907
Rsqr(adjusted)	.8634
Corr(x:y)	-.9438

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	7412.5330
No._points_Lambda_z	6
Tlast	12.0000
Clast	404.4740
AUClast	23838.5692
Lambda_z	.2573
Lambda_z_lower	2.5000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	2.6938
AUCall	23838.5692
AUCINF(observed)	25410.4737
AUCINF(observed)/D	72.6014
AUC_%Extrap(obs.)	6.1860
Vz(observed)	.0535
Cl(observed)	.0138
AUCINF(predicted)	24960.7046
AUCINF(predicted)/D	71.3163
AUC_%Extrap(pred.)	4.4956
Vz(predicted)	.0545
Cl(predicted)	.0140
AUMClast	75368.8834
AUMCINF(observed)	100340.6196
AUMC_%Extrap(obs.)	24.8870
AUMCINF(predicted)	93195.4555
AUMC_%Extrap(pred.)	19.1282
MRTlast	2.1616
MRTINF(observed)	2.9488
Vss(observed)	.0406
MRTINF(predicted)	2.7337
Vss(predicted)	.0383

Voluntario=6

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	1966.			81.61	6.773	
.1660	2590.			270.7	31.39	
.3330	3818.			805.7	173.4	
.6660	4290.			2156.	860.9	
1.000	5966.			3869.	2334.	
1.333	6624.			5965.	4798.	
1.666	6401.			8133.	8043.	
2.000	7941.			.1053E+05	.1248E+05	
2.500	5235.			.1382E+05	.1972E+05	
3.000	2860.			.1585E+05	.2514E+05	
4.000	1651.			.1810E+05	.3273E+05	
6.000	* 754.7	736.6	18.16	.2051E+05	.4386E+05	1.000
8.000	* 482.4	500.4	-17.96	.2174E+05	.5225E+05	1.000
12.00	* 233.7	230.9	2.830	.2318E+05	.6557E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9970
Rsq(adjusted)	.9941
Corr(x:y)	-.9985

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	7941.0360
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	233.7400
AUClast	23176.5218
Lambda_z	.1933
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.5854
AUCall	23176.5218
AUCINF(observed)	24385.5704
AUCINF(observed)/D	69.6731
AUC_%Extrap(obs.)	4.9580

Vz(observed)	.0742
Cl(observed)	.0144
AUCINF(predicted)	24370.9319
AUCINF(predicted)/D	69.6312
AUC_%Extrap(pred.)	4.9010
Vz(predicted)	.0743
Cl(predicted)	.0144
AUMClast	65574.6288
AUMCINF(observed)	86337.1626
AUMC_%Extrap(obs.)	24.0482
AUMCINF(predicted)	86085.7803
AUMC_%Extrap(pred.)	23.8264
MRTlast	1.8294
MRTINF(observed)	2.5405
Vss(observed)	.0365
MRTINF(predicted)	2.5323
Vss(predicted)	.0364

Voluntario=7

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	2659.			110.4	9.159	
.1660	2650.			330.7	36.57	
.3330	3576.			850.6	172.7	
.6660	4265.			2156.	844.0	
1.000	5647.			3811.	2261.	
1.333	5779.			5714.	4484.	
1.666	6175.			7704.	7479.	
2.000	7275.			9950.	.1163E+05	
2.500	4458.			.1288E+05	.1805E+05	
3.000	2739.			.1468E+05	.2289E+05	
4.000	* 1620.	1433.	187.2	.1686E+05	.3024E+05	1.000
6.000	* 894.2	944.0	-49.86	.1938E+05	.4209E+05	1.000
8.000	* 527.7	621.9	-94.15	.2080E+05	.5167E+05	1.000
12.00	* 296.9	269.8	27.08	.2245E+05	.6724E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9657
Rsq(adjusted)	.9486
Corr(x:y)	-.9827

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	7274.8170
No._points_Lambda_z	4
Tlast	12.0000
Clast	296.9190
AUClast	22448.0852
Lambda_z	.2087
Lambda_z_lower	4.0000
Lambda_z_upper	12.0000
t1/2_Lambda_z	3.3209
AUCall	22448.0852
AUCINF(observed)	23870.6217
AUCINF(observed)/D	68.2018
AUC_%Extrap(obs.)	5.9594
Vz(observed)	.0702
Cl(observed)	.0147
AUCINF(predicted)	23740.8589
AUCINF(predicted)/D	67.8310
AUC_%Extrap(pred.)	5.4454
Vz(predicted)	.0706
Cl(predicted)	.0147
AUMClast	67243.6105
AUMCINF(observed)	91129.4082
AUMC_%Extrap(obs.)	26.2109
AUMCINF(predicted)	88950.5628
AUMC_%Extrap(pred.)	24.4034
MRTlast	1.9955
MRTINF(observed)	2.8176
Vss(observed)	.0413
MRTINF(predicted)	2.7467
Vss(predicted)	.0405

Voluntario=8

Farmaco=LEG

Noncompartmental Analysis for Constant Infusion Administration

Linear Trapezoidal Rule Used to Compute AUC, AUMC

X	Y	Pred.	Res.	AUC	AUMC	WEIGHT
.0000	.0000			.0000	.0000	
.8300E-01	2600.			107.9	8.956	
.1660	2656.			326.0	36.21	
.3330	3059.			803.3	158.1	
.6660	3874.			1958.	757.3	
1.000	4417.			3342.	1926.	
1.333	5476.			4989.	3877.	
1.666	6544.			6991.	6907.	
2.000	6955.			9245.	.1105E+05	
2.500	4053.			.1200E+05	.1706E+05	
3.000	2714.			.1369E+05	.2163E+05	
4.000	1629.			.1586E+05	.2896E+05	
6.000	* 812.8	754.5	58.22	.1830E+05	.4035E+05	1.000
8.000	* 440.6	492.5	-51.96	.1956E+05	.4875E+05	1.000
12.00	* 217.8	209.9	7.946	.2087E+05	.6103E+05	1.000

*) Starred values were included in estimation of Lambda_z.

@) Note - the concentration at time zero (DTIME) was added for extrapolation purposes

Dosing_time	.0000
Rsq	.9777
Rsq(adjusted)	.9555
Corr(x:y)	-.9888

Note - the MRT values in the table below are adjusted for infusion time.

Tmax	2.0000
Cmax	6954.6320
No._points_Lambda_z	3
Tlast	12.0000
Clast	217.8080
AUClast	20872.7366
Lambda_z	.2133
Lambda_z_lower	6.0000
Lambda_z_upper	12.0000

t1/2_Lambda_z	3.2500
AUCall	20872.7366
AUCINF(observed)	21893.9856
AUCINF(observed)/D	62.5542
AUC_%Extrap(obs.)	4.6645
Vz(observed)	.0750
Cl(observed)	.0160
AUCINF(predicted)	21856.7297
AUCINF(predicted)/D	62.4478
AUC_%Extrap(pred.)	4.5020
Vz(predicted)	.0751
Cl(predicted)	.0160
AUMClast	61031.4355
AUMCINF(observed)	78074.8119
AUMC_%Extrap(obs.)	21.8295
AUMCINF(predicted)	77453.0566
AUMC_%Extrap(pred.)	21.2020
MRTlast	1.9240
MRTINF(observed)	2.5660
Vss(observed)	.0410
MRTINF(predicted)	2.5437
Vss(predicted)	.0407

Resumen de los parámetros cinéticos

Datos de silibina total para las dos formulaciones

Nº Vol.	Tratamiento	AUC ₀₋₁₂ (ng*h/ml)	AUC _{0-∞} (ng*h/ml)	AUC % Extrap	Tmax (h)	Cmax (ng/ml)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	Cl (l/h)	Vd (l)
01	LEG	13935.93	14603.01	4.57	2.00	4981.41	3.62	1.57	24	125
01	SIL	7205.65	7794.27	7.55	1.67	2072.80	2.64	3.58	16.2	176.1
02	LEG	23687.61	26230.29	9.69	2.00	6850.19	4.52	2.20	13.3	87
02	SIL	11513.80	12427.62	7.35	3.00	2300.74	2.71	4.46	29	113.2
03	LEG	24575.69	25948.53	5.29	2.00	9246.99	3.51	1.91	13.5	68.4
03	SIL	5948.02	7041.90	15.53	1.67	1247.26	5.05	4.11	51.1	372.1
04	LEG	35127.94	38640.14	9.09	2.00	12070.9	3.44	2.57	9.1	45
04	SIL	11263.17	12710.37	11.39	1.67	2874.92	3.73	4.19	28.3	152.5
05	LEG	23838.57	25410.47	6.19	2.00	7412.53	2.69	2.16	13.8	53.5
05	SIL	8206.32	9850.49	16.69	3.00	2042.09	4.01	5.20	36.5	211.2
06	LEG	23176.52	24385.57	4.96	2.00	7941.04	3.59	1.83	14.4	74.2
06	SIL	10681.88	12246.77	12.78	3.00	2162.16	3.68	4.96	29.4	155.9
07	LEG	22448.09	23870.62	5.96	2.00	7274.82	3.32	2.00	14.7	70.2
07	SIL	6869.50	7440.69	7.68	4.00	1799.02	2.58	5.22	48.4	180
08	LEG	20872.74	21893.99	4.66	2.00	6954.63	3.25	1.92	16	75
08	SIL	6420.22	6796.23	5.53	3.00	1780.48	2.21	4.49	53	169.2

Estadística de parámetros PK de silibina total para las dos formulaciones

	Tratamiento	Media	DE	Min	Mediana	Max	CV
AUC₀₋₁₂ <i>(ng*h/ml)</i>	LEG	23457.89	5807.47	13935.93	23432.07	35127.94	24.76
AUC₀₋₁₂ <i>(ng*h/ml)</i>	SIL	8513.57	2290.83	5948.02	7705.99	11513.80	26.91
AUC_{0-∞} <i>(ng*h/ml)</i>	LEG	25122.83	6632.30	14603.01	24898.02	38640.14	26.40
AUC_{0-∞} <i>(ng*h/ml)</i>	SIL	9538.54	2592.19	6796.23	8822.38	12710.37	27.18
AUC % Extrap	LEG	6.30	2.00	4.57	5.63	9.69	31.70
AUC % Extrap	SIL	10.56	4.16	5.53	9.53	16.69	39.34
MRT (h)	LEG	2.02	0.30	1.57	1.96	2.57	14.64
MRT (h)	SIL	4.53	0.57	3.58	4.48	5.22	12.69
Cl (l/h)	LEG	14.80	4.20	9.10	14.10	24.00	28.38
Cl (l/h)	SIL	40.20	10.60	28.30	41.40	53.00	26.37
Vd (l)	LEG	74.80	24.10	45.00	72.20	125.00	32.22
Vd (l)	SIL	191.30	78.20	113.20	172.70	372.10	40.88
t_{1/2} (h)	LEG	3.49	0.51	2.69	3.48	4.52	14.57
t_{1/2} (h)	SIL	3.33	0.95	2.21	3.19	5.05	28.63
Cmax <i>(ng/ml)</i>	LEG	7841.56	2081.47	4981.41	7343.68	12070.90	26.54
Cmax <i>(ng/ml)</i>	SIL	2034.93	468.24	1247.26	2057.45	2874.92	23.01
Tmax (h)	LEG	2.00	0.00	2.00	2.00	2.00	0.00
Tmax (h)	SIL	2.62	0.86	1.67	3.00	4.00	32.88

Medias de concentraciones a cada tiempo.

Tiempo de Extracción	Legalon i.v		Sylifit v.o	
	Media	Desviación Estandar	Media	Desviación Estandar
0	0.00	0.00	0.00	0.00
0.083	1987.78	452.65	NA	NA
0.166	2782.47	300.39	NA	NA
0.333	3486.22	338.26	19.41	45.52
0.666	4288.19	461.55	386.98	439.19
1	5355.84	839.16	708.25	630.71
1.333	5952.83	863.29	949.07	731.29
1.666	6460.71	816.93	1183.55	908.86
2	7841.56	2081.47	1275.59	664.17
2.5	4584.28	1264.96	1525.61	622.79
3	2871.41	836.11	1609.05	619.85
4	1788.42	649.78	1282.39	510.94
6	944.27	408.02	692.63	261.60
8	590.49	266.17	402.61	147.51
12	331.02	176.60	207.26	70.83

Análisis estadístico

AUC0-inf

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM (V02.0A)Core Version 16Jun98

Dependent variable: AUCINF(observed)

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 1229783179.431291 df 9

Error Sum of Squares: 96645151.337295 df 6

Mean Square Error: 16107525.222883

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	93186158.493941	1	5.79	0.0529
Voluntario(Secuencia	156224622.561128	6	1.62	0.2872
Periodo	8892402.318896	1	0.55	0.4855
Farmaco	971479996.057325	1	60.31	0.0002

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob	
Secuencia	93186158.493941	1	5.79	0.0529	
Voluntario(Secuencia	156224622.561128	6	1.62	0.2872	
Periodo	8892402.318896	1	0.55	0.4855	
Farmaco	971479996.057325	1	60.31	0.0002	Contrasts

Dependent variable: AUCINF(observed)

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast

Effect	SS	df	F	Prob
SIL vs LEG	971479996.057326	1	60.31	0.0002

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Dependent variable: AUCINF(observed)

Effect	SS	df	F	Prob
--------	----	----	---	------

Weighted Squares of Means (Type 3) Test

Secuencia	93186158.493941	1	3.58	0.1074
-----------	-----------------	---	------	--------

Using Voluntario(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Dependent variable: AUCINF(observed)

Farmaco	Value	Std. Error
LEG	25122.829005	1418.957594
SIL	9538.542078	1418.957594

Bioavailability Statistics

Dependent variable: AUCINF(observed)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower= 0.800 (A.H.)Upper= 1.200

Transformation = NONE Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: Farmaco

Reference : LEG Least squares mean=25122.829005, s.e.= 1418.957594

Test : SIL Least squares mean= 9538.542078, s.e.= 1418.957594

Difference = -15584.2869, s.e.d.= 2006.7091, df= 6

Ratio = 37.9676

	Classical	Westlake
--	-----------	----------

C.L. 80% = (26.4657 , 49.4696) (30.7332 , 169.2668)

C.L. 90% = (**22.4423 , 53.4930**) (26.4674 , 173.5326)

C.L. 95% = (18.4176 , 57.5176) (22.4462 , 177.5538)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.9991 Prob(> 120%)=0.0000 Max=0.9991 Total=0.9991

A.H. p-value = 0.9990

Power = 0.5228

AUC0-12

WINNONLIN ANALYSIS OF VARIANCE PROGRAM (V02.0A)Core Version 16Jun98

Dependent variable: Ln(AUClast)

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 4.848454 df 9

Error Sum of Squares: 0.237164 df 6

Mean Square Error: 0.039527

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.351282	1	8.89	0.0246
Voluntario(Secuencia	0.338650	6	1.43	0.3382
Periodo	0.016010	1	0.41	0.5480
Farmaco	4.142512	1	104.80	0.0001

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.351282	1	8.89	0.0246
Voluntario(Secuencia	0.338650	6	1.43	0.3382
Periodo	0.016010	1	0.41	0.5480
Farmaco	4.142512	1	104.80	0.0001

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 4.848454 df 9
 Error Sum of Squares: 0.237164 df 6
 Mean Square Error: 0.039527

Contrasts

Dependent variable: Ln(AUClast)

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast

Effect	SS	df	F	Prob
LEG vs SIL	4.142512	1	104.80	0.0001

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Dependent variable: Ln(AUClast)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.351282	1	6.22	0.0469

Using Voluntario(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Dependent variable: Ln(AUClast)

Farmaco	Value	Std. Error
LEG	10.035789	0.070292
SIL	9.018131	0.070292

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Ln(AUClast)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower= 0.800 (A.H.)Upper= 1.200

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: Farmaco

Reference : LEG Least squares mean= 10.035789, s.e.= 0.070292

Test : SIL Least squares mean= 9.018131, s.e.= 0.070292

Difference = -1.0177, s.e.d.= 0.0994, df= 6

Ratio = 36.1440

Classical Westlake

C.L. 80% = (31.3235 , 41.7065) (33.0320 , 166.9680)

C.L. 90% = (**29.7937 , 43.8480**) (31.3241 , 168.6759)

C.L. 95% = (28.3381 , 46.1001) (29.7951 , 170.2049)

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.9999 Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.9999 Total=0.9999

A.H. p-value = 0.9999

Power = 0.4247

C max

Dependent variable: Ln(Cmax)

Total Observations: 16 Observations Used: 16

Model Sum of Squares: 7.730225 df 9

Error Sum of Squares: 0.360705 df 6

Mean Square Error: 0.060117

Sequential Analysis of Variance (Type 1)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.181870	1	3.03	0.1326
Voluntario(Secuencia)	0.311950	6	0.86	0.5677
Periodo	0.005927	1	0.10	0.7642

Farmaco	7.230478	1	120.27	0.0001
---------	----------	---	--------	--------

Weighted Squares of Means (Type 3)

Effect	SS	df	F	Prob
Secuencia	0.181870	1	3.03	0.1326
Voluntario(Secuencia)	0.311950	6	0.86	0.5677
Periodo	0.005927	1	0.10	0.7642
Farmaco	7.230478	1	120.27	0.0001

Contrasts

Dependent variable: Ln(Cmax)

Weighted Squares of Means (Type 3) Contrast

Effect	SS	df	F	Prob
LEG vs SIL	7.230478	1	120.27	0.0001

Contrast: 1 -1

Hypothesis Tests

Dependent variable: Ln(Cmax)

Effect	SS	df	F	Prob
--------	----	----	---	------

Weighted Squares of Means (Type 3) Test

Secuencia	0.181870	1	3.50	0.1106
-----------	----------	---	------	--------

Using Voluntario(Secuencia) as error term

Least Squares Means

Dependent variable: Ln(Cmax)

Farmaco	Value	Std. Error
LEG	8.938271	0.086687
SIL	7.593794	0.086687

Bioavailability Statistics

Dependent variable: Ln(Cmax)

Alpha=0.0500 Bioequivalence Limits: (A.H.)Lower= 0.800 (A.H.)Upper= 1.200

Transformation = LN Percent of Reference to Detect = 0.20

Formulation variable: Farmaco

Reference : LEG Least squares mean= 8.938271, s.e.= 0.086687

Test : SIL Least squares mean= 7.593794, s.e.= 0.086687

Difference = -1.3445, s.e.d.= 0.1226, df= 6

Ratio = 26.0676

	Classical	Westlake
--	-----------	----------

C.L. 80%	= (21.8491 , 31.1006)	(23.3281 , 176.6719)
----------	------------------------	-----------------------

C.L. 90%	= (20.5407 , 33.0816)	(21.8497 , 178.1503)
----------	---------------------------------------	-----------------------

C.L. 95%	= (19.3103 , 35.1895)	(20.5419 , 179.4581)
----------	------------------------	-----------------------

Two One Sided T-tests

Prob(< 80%)=0.1000 Prob(> 125%)=0.0000 Max=0.1000 Total=0.1000

A.H. p-value = 0.9999

Power = 0.2794

8.2. ANEXO II:

- **CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO**
- **CARACTERÍSTICAS DE LOS VOLUNTARIOS INCLUIDOS**
- **RESULTADOS DE PRUEBAS ANALÍTICAS Y REGISTROS DE CONSTANTES VITALES Y ECG**

ANEXO II

Características del estudio

Aleatorización

Los tratamientos correspondientes a cada uno de las ramas de tratamiento fueron los siguientes:

- **A:** SilyFit[®], 9 capsulas de 40 mg de silibina-fosfatidilcolina por via oral
- **B:** LEGALON SIL 1 amp 350mg de silibina por via IV

Nº DE SCREENING	Nº DE RANDOMIZACIÓN	SECUENCIA ASIGNADA
PK-10	1	AB
PK-03	2	BA
PK-12	3	AB
PK-01	4	BA
PK-06	5	AB
PK-02	6	BA

PK-15	7	BA
PK-05	8	AB

Voluntarios no incluidos

NUMERO DE SCREENING	FECHA CI	MOTIVO DE EXCLUSIÓN
PK-04	30/09/2013	Voluntario de reserva
PK-07	30/09/2013	Análisis de sangre: Neutropenia y FA elevada
PK-08	30/09/2013	Análisis de sangre: Bilirrubina elevada
PK-11	30/09/2013	Análisis de sangre: Bilirrubina elevada
PK-09	30/09/2013	Tratamiento con paracetamol en las 48 horas previas al ingreso
PK-13	30/09/2013	Decide no participar por fechas
PK-14	30/09/2013	Decide no participar por fechas

Características de los voluntarios incluidos

Características demográficas

Voluntario	Sexo	Secuencia	Raza	Edad	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (peso/talla ²)
01	VARÓN	AB	Caucásica	22	99.9	189.8	28
02	VARÓN	BA	Caucásica	22	75.2	180.6	23.2
03	VARÓN	AB	Caucásica	24	62.0	168.5	22.0
04	VARÓN	BA	Caucásica	24	76.7	172.7	25.9
05	VARÓN	AB	Caucásica	39	74.7	173.7	25.0
06	VARÓN	BA	Caucásica	26	81	182.0	24.4
07	VARÓN	BA	Caucásica	36	67.9	167.0	24.4
08	VARÓN	AB	Caucásica	23	75.4	179.7	23.5

	Edad	Peso (Kg)	Talla (cm)	IQ (peso/talla ²)
Media	27	76.60	176.75	24.55
Desviación estándar	6.65	11.07	7.66	1.83
Coefficiente de variación	0.25	0.14	0.04	0.07
Media geométrica	26.37	75.95	176.61	24.49
Mediana	24	75.30	176.70	24.40
Valor máximo	39	99.9	189.8	28
Valor mínimo	22	62	167	22
N	8	8	8	8

Antecedentes personales

VOLUNTARIO	Intervenciones quirurgicas previas	Reacciones Medicamentosas	Ingresos hospitalarios	Tratamiento farmacologico habitual
01	Menisco rodilla izda. Por artroscopia (2011)	No	No	ninguno
02	No	No	No	ninguno
03	No	No	No	ninguno
04	Ligamento cruzado (2008)	No	Problemas GI	ninguno
05	Fractura MSI (1987)	No	No	ninguno
06	No	No	No	ninguno
07	No	No	No	ninguno
08	No	No	No	ninguno

Antecedentes familiares

VOLUNTARIO	ANTECEDENTES FAMILIARES
01	Ninguno
02	Ninguno
03	Madre: HTA
04	Padre y abuelo materno: IAM
05	Ninguno
06	Ninguno
07	Ninguno
08	Madre: enfermedad tiroidea

ANEXOS

RESULTADOS ANALÍTICOS

VISITA DE RECLUTAMIENTO. BIOQUÍMICA

VOL	Glucosa (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Ácido Úrico (mg/dl)	Calcio (mg/dl)	Sodio (mM/l)	Potasio (mM/l)	Proteínas totales (g/dl)	Bilirrubina Total (mg/dl)	AST/G OT (U/L)	ALT/G PT (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
01	78	0.98	37	4.3	10.2	138	4.0	7.9	0.26	17	19	17	212	84	174	111
02	70	1.04	32	6.4	9.9	140	4.0	7.6	0.93	21	20	44	204	56	154	85
03	75	0.48	22	6.2	9.7	139	4.1	7.1	1.03	16	12	14	146	40	151	50
04	68	0.96	39	6.7	9.7	140	3.5	7.6	0.70	33	24	24	236	84	213	94
05	83	1.02	34	6.2	10.2	139	4.1	8.0	0.67	21	28	35	180	54	235	94
06	77	0.84	28	5.2	9.7	138	4.0	7.1	0.90	16	13	11	176	59	157	57
07	71	0.81	18	5.8	9.0	139	4.0	7.4	1.04	24	23	14	176	93	161	96
08	80	1.19	22	6.4	9.7	139	3.6	6.9	1.29	26	34	32	214	69	213	179

ANEXOS

VISITA DE RECLUTAMIENTO. BIOQUÍMICA (MEDIAS)

VOL	Glucosa (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Ácido Úrico (mg/dl)	Calcio (mg/dl)	Sodio (mM/l)	Potasio (mM/l)	Proteínas totales (g/dl)	Bilirrubina Total (mg/dl)	AST/G OT (U/L)	ALT/G PT (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
Media	75.25	0.92	29.00	5.90	9.76	139.00	3.91	7.45	0.85	21.75	21.63	23.88	193.00	67.38	182.25	95.75
Desviación estándar	5.23	0.21	7.73	0.79	0.38	0.76	0.23	0.40	0.31	5.85	7.35	11.97	28.61	18.28	32.96	39.42
Coefficient e variación	0.07	0.23	0.27	0.13	0.04	0.01	0.06	0.05	0.36	0.27	0.34	0.50	0.15	0.27	0.18	0.41
Media geométrica	75.09	0.89	28.05	5.85	9.76	139.00	3.91	7.44	0.78	21.12	20.50	21.36	191.09	65.11	179.76	89.41
Mediana	76.00	0.97	30.00	6.20	9.70	139.00	4.00	7.50	0.92	21.00	21.50	20.50	192.00	64.00	167.50	94.00
Valor máximo	83	1.19	39	6.7	10.2	140	4.1	8	1.29	33	34	44	236	93	235	179
Valor mínimo	68	0.48	18	4.3	9	138	3.5	6.9	0.26	16	12	11	146	40	151	50
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

ANEXOS

VISITA DE SEGUIMIENTO. BIOQUÍMICA

VOL	Glucosa (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Ácido Úrico (mg/dl)	Calcio (mg/dl)	Sodio (mM/l)	Potasio (mM/l)	Proteínas totales (g/dl)	Bilirrubina Total (mg/dl)	AST/GOT (U/L)	ALT/GPT (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
01	92	0.93	28	3.7	10.2	137	4.2	7.7	0.47	16	17	15	150	78	192	58
02	80	0.95	33	6.7	9.8	138	4.2	7.1	0.69	19	20	37	152	50	141	69
03	80	0.84	27	6.0	9.5	135	4.1	7.4	1.10	18	13	14	229	38	157	42
04	76	0.84	30	6.1	9.7	137	4.0	7.0	0.69	24	24	23	201	78	190	260
05	97	1.03	28	6.1	9.9	140	4.5	7.2	0.42	19	32	37	158	51	241	80
06	74	0.85	42	5.6	9.8	135	4.1	7.3	1.22	18	16	12	182	59	150	57
07	80	0.79	24	5.6	9.0	137	3.7	7.5	0.98	30	32	18	185	101	163	117
08	87	1.05	30	5.1	9.2	141	4.7	6.4	0.49	17	25	21	177	57	203	100

ANEXOS

VISITA DE SEGUIMIENTO. BIOQUÍMICA(MEDIAS)

VOL	Glucosa (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Urea (mg/dl)	Ácido Úrico (mg/dl)	Calcio (mg/dl)	Sodio (mM/l)	Potasio (mM/l)	Proteínas totales (g/dl)	Bilirrubina Total (mg/dl)	AST/G OT (U/L)	ALT/G PT (U/L)	GGT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dl)	Triglicéridos (mg/dl)
Media	83.25	0.91	30.25	5.61	9.64	137.50	4.19	7.20	0.76	20.13	22.38	22.13	179.25	64.00	179.63	97.88
Desviación estándar	8.01	0.10	5.42	0.90	0.39	2.14	0.30	0.39	0.31	4.64	7.15	9.86	26.84	20.27	33.23	69.89
Coefficiente variación	0.10	0.10	0.18	0.16	0.04	0.02	0.07	0.05	0.40	0.23	0.32	0.45	0.15	0.32	0.19	0.71
Media geométrica	82.92	0.91	29.87	5.54	9.63	137.49	4.18	7.19	0.70	19.72	21.37	20.40	177.56	61.33	177.06	83.36
Mediana	80.00	0.89	29.00	5.80	9.75	137.00	4.15	7.25	0.69	18.50	22.00	19.50	179.50	58.00	176.50	74.50
Valor máximo	97	1.05	42	6.7	10.2	141	4.7	7.7	1.22	30	32	37	229	101	241	260
Valor mínimo	74	0.79	24	3.7	9	135	3.7	6.4	0.42	16	13	12	150	38	141	42
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

ANEXOS

VISITA DE RECLUTAMIENTO. HEMATOLOGÍA

VOL	Hematíes (10 ⁶ /microl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	ADE (%)	Plaquetas (10 ³ /microl)	Leucocitos (10 ³ /microl)	Neutrófilos (10 ³ /microl)	Linfocitos (10 ³ /microl)	Monocitos (10 ³ /microl)	Eosinófilos (10 ³ /microl)	Basófilos (10 ³ /microl)
01	4.67	15.1	43.5	93.1	32.3	34.7	13.0	205	9.30	6.10	2.10	0.90	0.10	0.00
02	5.36	16.6	49.7	92.8	31.1	33.5	11.7	258	10.00	6.36	2.34	0.87	0.36	0.06
03	5.11	14.5	44.4	86.8	28.5	32.8	11.8	260	4.31	2.26	1.79	0.18	0.06	0.01
04	5.69	16.4	49.5	87.0	28.9	33.2	12.0	295.0	8.62	4.07	3.51	0.72	0.27	0.04
05	5.38	16.4	49.5	92.1	30.4	33.0	11.1	486	5.28	2.85	1.95	0.43	0.03	0.00
06	5.02	16.0	47.9	95.5	31.9	33.4	12.3	194.0	5.07	3.08	1.36	0.55	0.05	0.01
07	4.64	13.3	40.1	86.5	28.6	33.1	11.7	198	5.67	4.06	1.16	0.21	0.18	0.03
08	5.13	15.6	45.3	88.3	30.4	34.4	11.3	148	7.22	4.30	2.04	0.48	0.37	0.01

ANEXOS

VISITA DE RECLUTAMIENTO. HEMATOLOGÍA (MEDIAS)

VOL	Hematías (10 ⁶ /microl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	ADE (%)	Plaquetas (10 ³ /microl)	Leucocitos (10 ³ /microl)	Neutrófilos (10 ³ /microl)	Linfocitos (10 ³ /microl)	Monocitos (10 ³ /microl)	Eosinófilos (10 ³ /microl)	Basófilos (10 ³ /microl)
Media	5.13	15.49	46.24	90.26	30.26	33.51	11.86	255.50	6.93	4.14	2.03	0.54	0.18	0.03
Desviación estándar	0.36	1.14	3.49	3.50	1.48	0.68	0.59	104.14	2.16	1.47	0.71	0.27	0.14	0.02
Coefficiente variación	0.07	0.07	0.08	0.04	0.05	0.02	0.05	0.41	0.31	0.36	0.35	0.50	0.79	0.77
Media geométrica	5.11	15.45	46.12	90.20	30.23	33.51	11.85	240.54	6.64	3.91	1.93	0.47	0.12	0.02
Mediana	5.12	15.80	46.60	90.20	30.40	33.30	11.75	231.50	6.45	4.07	2.00	0.52	0.14	0.02
Valor máximo	5.69	16.6	49.7	95.5	32.3	34.7	13	486	10	6.36	3.51	0.9	0.37	0.06
Valor mínimo	4.64	13.3	40.1	86.5	28.5	32.8	11.1	148	4.31	2.26	1.16	0.18	0.03	0.01
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

ANEXOS

VISITA DE SEGUIMIENTO. HEMATOLOGÍA

VOL	Hematías (10 ⁶ /microl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	ADE (%)	Plaquetas (10 ³ /microl)	Leucocitos (10 ³ /microl)	Neutrófilos (10 ³ /microl)	Linfocitos (10 ³ /microl)	Monocitos (10 ³ /microl)	Eosinófilos (10 ³ /microl)	Basófilos (10 ³ /microl)
01	4.87	15.6	47.3	97.0	32.0	33.0	11.6	244	5.76	3.09	2.13	0.37	0.15	0.01
02	4.75	15.2	44.0	92.7	31.9	34.4	12.9	244.0	6.80	4.10	1.90	0.60	0.20	0.10
03	4.94	14.5	43.1	87.3	29.2	33.5	12.4	258	5.25	2.59	2.08	0.45	0.11	0.02
04	5.46	15.8	48.7	89.2	28.9	32.5	12.0	336	9.76	4.98	3.32	0.89	0.52	0.04
05	4.97	15.1	46.6	93.8	30.5	32.5	11.1	463	6.31	3.02	2.61	0.54	0.11	0.01
06	5.06	16.2	49.2	97.2	32.1	33.0	12.4	240	6.12	3.70	1.68	0.65	0.07	0.00
07	4.34	12.6	37.5	86.3	29.0	33.7	13.3	182.0	5.50	3.80	1.10	0.40	0.20	0.00
08	4.66	14.6	43.4	93.1	31.3	33.6	11.5	160	6.97	3.78	2.32	0.48	0.34	0.03

ANEXOS

VISITA DE SEGUIMIENTO. HEMATOLOGÍA (MEDIAS)

Vol	Hematías (10 ⁶ /microl)	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (g/dl)	ADE (%)	Plaquetas (10 ³ /microl)	Leucocitos (10 ³ /microl)	Neutrófilos (10 ³ /microl)	Linfocitos (10 ³ /microl)	Monocitos (10 ³ /microl)	Eosinófilos (10 ³ /microl)	Basófilos (10 ³ /microl)
Media	4.88	14.95	44.98	92.08	30.61	33.28	12.15	265.88	6.56	3.63	2.14	0.55	0.21	0.04
Desviación estándar	0.32	1.11	3.83	4.13	1.40	0.65	0.74	95.40	1.42	0.74	0.65	0.17	0.15	0.03
Coefficiente variación	0.07	0.07	0.09	0.04	0.05	0.02	0.06	0.36	0.22	0.20	0.31	0.31	0.70	0.97
Media geométrica	4.87	14.91	44.83	91.99	30.58	33.27	12.13	252.84	6.44	3.57	2.05	0.53	0.18	0.02
Mediana	4.91	15.15	45.30	92.90	30.90	33.25	12.20	244.00	6.22	3.74	2.11	0.51	0.18	0.03
Valor máximo	5.46	16.2	49.2	97.2	32.1	34.4	13.3	463	9.76	4.98	3.32	0.89	0.52	0.1
Valor mínimo	4.34	12.6	37.5	86.3	28.9	32.5	11.1	160	5.25	2.59	1.1	0.37	0.07	0.01
N	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

ANEXOS

VISITA DE RECLUTAMIENTO. ANÁLISIS DE ORINA

Vol	Glucosa	Proteínas	Bilirrubina	Urobilinógeno	pH	Densidad	Hemoglobina	Cuerpos cetónicos	Nitritos	Leucocitos	Sedimento
01	0	0	0	0.2	5.5	1023	0	0	0	0	Normal
02	0	0	0	0.2	6.0	1018	+	0	0	0	3-5 hematies/campo
03	0	0	0	0.2	5.5	1024	0	0	0	0	Normal
04	0	0	0	0.2	5.5	1026	0	0	0	0	Normal
05	0	0	0	0.2	6.0	1018	0	0	0	0	Normal
06	0	0	0	0.2	5.5	1010	0	0	0	0	Normal
07	0	0	0	0.2	5.0	1009	0	0	0	0	10-20 leucos/campo
08	0	0	0	0.2	5.5	1015	0	0	0	0	Normal

* El valor de 0 equivale a negativo

ANEXOS

VISITA DE SEGUIMIENTO. ANÁLISIS DE ORINA

Vol	Glucosa	Proteínas	Bilirrubina	Urobilinógeno	pH	Densidad	Hematíes	Cuerpos cetónicos	Nitritos	Leucocitos	Sedimento
01	0	0	0	0.2	5.5	1014	0	0	0	0	Normal
02	0	0	0	0.2	5.5	1020	+	0	0	0	Hematíes y leucos aislados
03	0	0	0	0.2	5.5	1014	0	0	0	0	Normal
04	0	0	0	0.2	6.5	1019	0	0	0	0	Normal
05	0	0	0	0.2	5.5	1026	0	0	0	0	Normal
06	0	0	0	0.2	5.5	1015	0	0	0	0	Normal
07	0	0	0	0.2	5.5	1009	0	0	0	++	10-20 leucos/campo
08	0	10mg/dl	0	1.0	7.0	1028	0	0	0	0	Normal

* El valor de 0 equivale a negativo

ANEXOS

SEROLOGÍA.

Visita de reclutamiento

VOL	VHB	VHC	VIH	DROGAS DE ABUSO
01	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
02	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
03	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
04	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
05	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
06	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
07	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
08	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Exploración física, Constantes vitales y ECG

Visita de reclutamiento

Exploración física

VOL	EXPLORACION FÍSICA EN LA VISITA DE RECLUTAMIENTO
01	Normal
02	Normal
03	Normal
04	Normal
05	Normal
06	Normal
07	Pectum excavatum
08	Normal

Constantes vitales

VOL	Decúbito supino			Bipedestación			FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
	TAS	TAD	FC	TAS	TAD	FC		
01	128	68	68	141	97	94	14	36.2
02	115	79	55	119	78	77	12	36.2
03	133	84	65	143	97	71	15	36.2
04	121	83	52	129	90	61	12	36.2
05	138	86	78	143	95	96	14	35.3
06	130	75	82	127	79	87	14	36.7
07	97	59	75	103	68	82	14	36.5
08	142	68	64	139	92	70	14	36.3

VOL	Decúbito supino			Bipedestación			FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
	TAS	TAD	FC	TAS	TAD	FC		
Media	125,50	75.25	67.38	130.50	87.00	79.75	13.63	36.20
Desviación estándar	14,41	9.53	10.64	14.13	10.72	12.28	1.06	0.41
Coficiente variación	0,11	0.13	0.16	0.11	0.12	0.15	0.08	0.01
Media geométrica	124,72	74.70	66.62	129.78	86.39	78.91	13.59	36.20
Mediana	129,00	77.00	66.50	134.00	91.00	79.50	14.00	36.20
Valor máximo	142	86	82	143	97	96	15	36.7
Valor minimo	97	59	52	103	68	61	12	35.3
N	8	8	8	8	8	8	8	8

Electrocardiograma

VOL	ECG EN LA VISITA DE RECLUTAMIENTO
01	Bloqueo incompleto de rama derecha. Sin relevancia clínica
02	Bradicardia sinusal. Bloqueo incompleto de rama decha + hemibloqueo anterior izqdo. Crecimiento aurícula derecha. Sin relevancia clínica
03	Arritmia respiratoria. Crecimiento ventrículo izquierdo. Sin relevancia clínica
04	Bloqueo incompleto de rama derecha. Bradicardia sinusal. Arritmia respiratoria. Sin relevancia clínica
05	Trastornos inespecíficos de la conducción intraventricular. Sin relevancia clínica
06	Bloqueo de rama dcha. Hemibloqueo anterior izdo. PR en el límite. Crecimiento aurícula izda. Sin relevancia clínica
07	Bloqueo incompleto de rama dcha. Sin relevancia clínica
08	Normal

VOL	FC	PR	QRS	QTC
01	77	152	90	412
02	50	136	110	409
03	64	132	104	401
04	55	148	100	410
05	77	148	102	367
06	77	212	104	449
07	72	156	82	390
08	68	152	82	405

VOL	FC	PR	QRS	QTC
Media	67.50	154.50	96,75	405,38
Desviación estándar	10.46	24.65	10,69	23,02
Coficiente variación	0.15	0.16	0,11	0,06
Media geométrica	66.73	153.01	96,21	404,81
Mediana	70.00	150.00	101,00	407,00

Valor máximo	77	212	110	449
Valor mínimo	50	132	82	367
N	8	8	8	8

Periodo 1

Exploración física

VOL	EXPLORACION FÍSICA
01	Normal
02	Normal
03	Normal
04	Normal
05	Normal
06	Normal
07	Pectum excavatum
08	Normal

Constantes vitales

VOL	TAS	TAD	FC	TEMPERATURA
01	123	71	59	36.2
02	115	69	47	36.2
03	127	86	56	36.3
04	118	69	53	36.2
05	144	84	83	36.2

06	115	72	71	36.3
07	96	57	72	36.9
08	132	71	69	36.5

VOL	TAS	TAD	FC	TEMPERATURA
Media	121.25	72.38	63.75	36.35
Desviación estándar	14.12	9.13	11.94	0.24
Coficiente variación	0.12	0.13	0.19	0.01
Media geométrica	120.51	71.87	62.77	36.35
Mediana	120.50	71.00	64.00	36.25
Valor máximo	144	86	83	36.9
Valor mínimo	96	57	47	36.2
N	8	8	8	8

Electrocardiograma

VOL	ECG EN EL PERIODO 1
01	Sin cambios respecto al previo
02	Sin cambios respecto al previo
03	Sin cambios respecto al previo
04	Sin cambios respecto al previo
05	Sin cambios respecto al previo
06	Sin cambios respecto al previo
07	Sin cambios respecto al previo
08	Sin cambios respecto al previo

VOL	FC	PR	QRS	QTC
01	53	132	86	376
02	49	136	112	401
03	51	128	100	365
04	51	148	98	424
05	92	136	82	416
06	68	212	94	439
07	69	136	86	369
08	73	152	80	388

VOL	FC	PR	QRS	QTC
Media	63.25	147.50	92.25	397.25
Desviación estándar	15.05	27.25	10.82	27.25
Coefficiente variación	0.24	0.18	0.12	0.07
Media geométrica	61.80	145.67	91.71	396.44
Mediana	60.50	136.00	90.00	394.50
Valor máximo	92	212	112	439
Valor mínimo	49	128	80	365
N	8	8	8	8

Periodo 2

Exploración física

VOL	EXPLORACION FÍSICA
01	Normal
02	Normal
03	Normal
04	Normal
05	Normal
06	Normal
07	Pectum excavatum
08	Normal

Constantes vitales

VOL	TAS	TAD	FC	TEMPERATURA
01	125	61	56	36.2
02	106	65	47	36.3
03	128	87	57	36.3
04	125	80	60	35.2
05	140	84	87	35.1
06	117	71	69	36.6
07	100	63	86	36.7
08	124	72	73	35.2

VOL	TAS	TAD	FC	TEMPERATURA
Media	120.63	72.88	66.88	35.95
Desviación estándar	12.72	9.85	14.50	0.67
Coficiente variación	0.11	0.14	0.22	0.02
Media geométrica	120.02	72.30	65.51	35.94
Mediana	124.50	71.50	64.50	36.25
Valor máximo	140	87	87	36.7
Valor mínimo	100	61	47	35.1
N	8	8	8	8

Electrocardiograma

VOL	ECG EN EL PERIODO 2
01	Sin cambios respecto al previo
02	Sin cambios respecto al previo
03	Sin cambios respecto al previo
04	Sin cambios respecto al previo
05	Sin cambios respecto al previo
06	Sin cambios respecto al previo
07	Sin cambios respecto al previo
08	Sin cambios respecto al previo

VOL	FC	PR	QRS	QTC
01	49	140	94	372
02	50	144	114	413
03	61	132	102	387
04	63	164	98	443
05	82	144	86	411
06	68	208	106	416
07	75	144	86	376
08	69	152	84	390

VOL	FC	PR	QRS	QTC
Media	64.63	153.50	96.25	401.00
Desviación estándar	11.43	23.90	10.77	23.95
Coefficiente variación	0.18	0.16	0.11	0.06
Media geométrica	63.72	152.08	95.73	400.38
Mediana	65.50	144.00	96.00	400.50
Valor máximo	82	208	114	443
Valor mínimo	49	132	84	372
N	8	8	8	8

*Visita de seguimiento**Exploración física*

VOL	EXPLORACION FÍSICA EN LA VISITA DE SEGUIMIENTO
01	Normal
02	Normal
03	Normal
04	Normal
05	Normal
06	Normal
07	Pectum excavatum
08	Normal

Constantes vitales

VOL	Decúbito supino			Bipedestación			FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
	TAS	TAD	FC	TAS	TAD	FC		
01	129	75	59	133	83	67	12	36.3
02	110	68	47	111	74	61	13	36.5
03	121	84	56	139	99	76	14	36.8
04	123	78	54	132	90	55	14	36.5
05	131	78	81	114	85	91	12	36.3
06	106	67	62	121	79	69	12	36.3
07	95	54	69	103	64	80	18	36.5
08	117	64	62	124	86	72	13	36.4

VOL	Decúbito supino			Bipedestación			FRECUENCIA RESPIRATORIA	TEMPERATURA
	TAS	TAD	FC	TAS	TAD	FC		
Media	116.50	71.00	61.25	122.13	82.50	71.38	13.50	36.45
Desviación estándar	12.21	9.61	10.28	12.31	10.52	11.22	2.00	0.17
Coefficiente variación	0.10	0.14	0.17	0.10	0.13	0.16	0.15	0.00
Media geométrica	115.92	70.40	60.53	121.57	81.89	70.61	13.39	36.45
Mediana	119.00	71.50	60.50	122.50	84.00	70.50	13.00	36.45
Valor máximo	131	84	81	139	99	91	18	36.8
Valor mínimo	95	54	47	103	64	55	12	36.3
N	8	8	8	8	8	8	8	8

Electrocardiograma

VOL	ECG EN LA VISITA DE SEGUIMIENTO
01	Sin cambios respecto al previo
02	Sin cambios respecto al previo
03	Sin cambios respecto al previo
04	Sin cambios respecto al previo
05	Sin cambios respecto al previo
06	Sin cambios respecto al previo
07	Sin cambios respecto al previo
08	Sin cambios respecto al previo

VOL	FC	PR	QRS	QTC
01	54	144	88	372
02	47	128	110	400
03	62	128	100	390
04	60	156	98	444
05	77	148	100	390
06	62	208	98	423
07	68	128	82	375
08	69	152	92	420

VOL	FC	PR	QRS	QTC
Media	62.38	149.00	96.00	401.75
Desviación estándar	9.27	26.43	8.55	25.21
Coficiente variación	0.15	0.18	0.09	0.06
Media geométrica	61.75	147.20	95.66	401.07
Mediana	62.00	146.00	98.00	395.00
Valor máximo	77	208	110	444
Valor mínimo	47	128	82	372
N	8	8	8	8

8.3. ANEXO III: DOCUMENTOS ESPECÍFICOS DEL ESTUDIO:

8.3.1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

8.3.2. DICTÁMEN DEL CEIC QUE LO EVALUÓ (HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL)

8.3.3. APROBACIÓN DE LA AEMPS

8.3.4. CERTIFICADO DE PÓLIZA DE SEGURO

8.3.5. CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO

8.3.6. CONCESIÓN DE LA AYUDA POR LA MUTUA MADRILEÑA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

	<p style="text-align: center;">Hospital Universitario Ramón y Cajal <i>Unidad de Ensayos Clínicos</i></p>	 Comunidad de Madrid
---	---	--

CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACION DE VOLUNTARIOS

ENSAYO CLINICO ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBILINA ORAL

Código de protocolo: PK-SIL-FARMA-03

Versión: 2 de 10 de octubre de 2012

**PROMOTOR: FUNDACION PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DEL
HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL**

Investigador principal: Dra. Mónica Aguilar Jiménez

Teléfono de contacto: 91 3368825

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre el desarrollo del ensayo clínico en el que se le propone participar. Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

Lea detenidamente la información que a continuación le detallamos, consulte con quién crea necesario y pregunte cualquier duda.

Su participación en el estudio sólo es posible si entiende perfectamente el objetivo, justificación, procedimientos, riesgos y derechos contemplados en esta hoja de información.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La silibilina es el flavanolignano mayoritario y más activo de la silimarina, mas conocido como cardo mariano. De entre sus múltiples acciones, destaca su actividad hepatoprotectora, antioxidante, antifibrótica y antiinflamatoria, propiedades que la convierten en un producto potencialmente útil para el tratamiento de enfermedades crónicas hepáticas.

Silibilina en su forma intravenosa esta comercializada con el nombre de Legalon SIL®. Este tratamiento está aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios desde el año 1977 y se utiliza para el tratamiento de la intoxicación por setas, específicamente la intoxicación por amanita phalloides.

La concentración en sangre de silibilina que se alcanzan tras su administración oral mejora cuando se conjuga la silibilina con fosfatidilcolina. Desde hace mas de 30 años se utilizan diferentes preparados que contienen silibilina para su administración por vía oral. Actualmente existe una planta medicinal comercializada con el nombre de SilyFit® que contiene ambos compuestos.

Diversos estudios han demostrado que la silibilina es un potente agente antiviral en pacientes con hepatitis crónica C que no han respondido a la terapia habitual con interferón pegilado y ribavirina. Silibilina alcanza bajas concentraciones en sangre si se administra por vía oral, por lo que, con el fin de asegurar concentraciones en sangre eficaces, en un principio se ha decidido administrar por vía intravenosa a la dosis de 20mg/Kg/día.

No existen datos publicados en la literatura que describan las características farmacocinéticas (absorción, metabolismo, distribución y excreción) de la silibilina intravenosa, ni ningún estudio en el que se compare ésta con la silibilina administrada por vía oral (ya sea conjugada con fosfatidilcolina o sin conjugar), por lo que es imposible estimar la dosis oral que necesitaría administrarse para conseguir el mismo efecto terapéutico que se consigue tras la administración intravenosa.

Con este estudio pretendemos describir las características farmacocinéticas de las dos formulaciones de silibilina: producto liofilizado para infusión intravenosa y conjugada con fosfatidilcolina para administración oral, y calcular la dosis oral que necesitaríamos administrar para conseguir el mismo efecto terapéutico con ambas.

Tanto la silibilina conjugada como el Legalon SIL® serán aportados por el promotor del estudio.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN

Silibilina es un compuesto que presenta una buena tolerabilidad avalada por sus más de 30 años en el mercado.

Los efectos adversos de la silibilina son, en general, leves y transitorios. Los más frecuentes son: diarrea y dolor abdominal. Raramente puede producir reacciones en la piel aunque se han descrito casos de sensación de calor en la zona de infusión cuando se administra por vía intravenosa.

Estudios en los que se ha administrado altas dosis de silibilina conjugada con fosfatidilcolina han demostrado que es un producto seguro y bien tolerado incluso administrado a dosis altas, ya que el único efecto adverso observado fue un leve aumento de los niveles de bilirrubina sin síntomas asociados que mejoraba tras la suspensión del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

Para que usted pueda participar en el estudio deberá cumplir todos los criterios de inclusión especificados en el protocolo del ensayo. Usted está recibiendo información por escrito pero también recibirá información adicional oral, momento en el que podrá aclarar todas sus dudas referentes a cualquier aspecto del estudio, y así, estando de acuerdo, firmar la hoja de consentimiento que le adjuntamos.

En el estudio van a participar 8 varones voluntarios sanos y será desarrollado en la Unidad de Ensayos Clínicos, en la planta 7ª izquierda, del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

En el estudio no pueden participar fumadores ni consumidores de drogas de abuso, tampoco las personas que hayan recibido tratamiento farmacológico de prescripción en los últimos 15 días o algún tipo de medicamento en las 48 horas antes de recibir la medicación en estudio. Durante el estudio tampoco podrán realizar esfuerzos físicos intensos ni consumir zumo de pomelo ni bebidas que contengan té, café, cacao, cola o alcohol desde 48h antes de cada día de ingreso. Tampoco se puede participar si se ha donado sangre, participado en otro estudio con fármacos en investigación en los 3 meses previos o se tiene antecedentes de alergias a medicamentos.

Los procedimientos del estudio son los siguientes:

- Se le administrará 1 vial de Legalon® vía intravenosa y 9 cápsulas de silibilina-conjugada vía oral, ambos administrados una sola vez. Todos los voluntarios recibirán los 2 tratamientos. Para ello deberá ingresar en la Unidad de Ensayos Clínicos en 2 ocasiones con una separación entre ingresos de 1 semana, dónde se le administrará el tratamiento correspondiente. El orden en el que lo reciban se asignará al azar.

Los dos días de ingreso deberá acudir a la Unidad de Ensayos Clínicos a las 08:00h de la mañana, en ayunas desde las 22 horas del día previo, dónde se le administrará el tratamiento correspondiente y donde quedará ingresado durante 12 horas para observación y extracción de muestras de sangre. Tras la extracción correspondiente a las 12h, abandonará la Unidad de Ensayos.

Los fármacos se administrarán de la siguiente forma:

- Legalon SIL®, producto liofilizado para infusión intravenosa. A cada paciente se le administrará 1 vial de Legalon SIL® en una sola administración que se realizará en infusión lenta intravenosa de 2 horas de duración.
- Silibilina conjugada con fosfatidilcolina, para administración por vía oral. A cada paciente se le dará 9 cápsulas de SilyFit® en una sola administración.

La participación en el estudio, cuya duración es de aproximadamente 2 meses, se llevará a cabo de la siguiente manera:

Antes de comenzar se realizará una historia clínica, una exploración física, electrocardiograma y un control analítico que incluye un análisis rutinario de sangre (hemograma y bioquímica), y de orina y los marcadores serológicos de detección del virus de la inmunodeficiencia humana (Virus del SIDA, VIH) y los virus de la hepatitis B y C.

Pasados unos días, si todas estas pruebas son normales y se reúnen los criterios de inclusión especificados en el protocolo del estudio, podrá ser elegido como voluntario participante en el estudio.

Antes de la administración de cada uno de los preparados se realizará toma de constantes (frecuencia cardíaca y tensión arterial), exploración física y electrocardiograma y se le colocará una vía intravenosa (catéter en la vena) a través de la que se extraerán todas las muestras de sangre, en ese momento se obtendrá la primera (basal). Durante el ingreso se extraerán más muestras de sangre de unos 10 ml cada una correspondientes a los siguientes tiempos: una basal antes de recibir el tratamiento y después, tras la administración de cada uno de los tratamientos: 20min, 40min, 1h, 1h20min, 1h40min, 2h, 2h30min, 3h, 4h, 6h, 8h y 12 horas. El día que reciba usted el preparado intravenoso se realizarán además extracciones a los 5min y 10min. Tras la extracción correspondiente a las 12h, los voluntarios podrán abandonar la Unidad de Ensayos Clínicos. En todo el ensayo se le extraerá una cantidad de

sangre no superior a lo que supone una donación. Durante su estancia en la Unidad se encontrarán bajo la supervisión de un médico y de una enfermera.

Durante cada uno de estos dos días de ingreso se preguntará en distintas ocasiones al respecto de los posibles efectos adversos que pudieran aparecer.

Por último, aproximadamente una semana después de recibir la última dosis se repetirán las pruebas analíticas iniciales y la exploración.

PREGUNTAS E INFORMACIÓN

Cualquier nueva información referente a la medicación recibida que se descubra mientras dure la participación, será debidamente comunicada y se dará la oportunidad de interrumpir el estudio.

En caso de dudas sobre el estudio o sus derechos, podrá contactar con la Dra. Aguilar o cualquiera de los médicos del equipo de investigación en el teléfono 913368825 o 917291890.

COMPENSACIÓN POR PARTICIPACIÓN

La participación en este estudio tiene una compensación de 350€ que se abonarán mediante un cheque nominativo o transferencia a cuenta corriente, una vez finalizado. Se abonará una cantidad proporcional a la participación en el estudio en caso de que no se completara.

SEGURO Y COMPENSACIONES POR LESIONES

Si fuera necesario, durante el estudio y en su fase ambulatoria, se proporcionará asistencia médica inmediata en el Servicio de Urgencias del Hospital Ramón y Cajal. El Promotor del estudio dispone de una póliza de seguros que se ajusta a la legislación vigente (Real Decreto 223/2004), que le proporcionará la compensación e indemnización en caso de menoscabo de su salud o de lesiones que pudieran producirse.

OTRAS CONSIDERACIONES IMPORTANTES

Si decide participar en este estudio debe saber que lo hace voluntariamente y que podrá, así mismo, abandonarlo en cualquier momento. También debe saber que puede ser (será) excluido del ensayo si los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos, ya que usted al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto. Entre los procedimientos que debe cumplir, además de las visitas debe cumplir con las instrucciones, como abstenerse de tomar café o té, chocolate y productos de herbolario (sin previa consulta al investigador), si tiene que tomar algún medicamento debe comunicárselo al investigador. Por supuesto para participar en el estudio no puede ser fumador ni consumidos de tóxicos (alcohol y drogas) y así mismo se compromete a no hacerlo durante el estudio.

Todos los datos que usted nos facilitará, tanto para la elaboración de su Historia clínica, como para el resto de documentos del estudio, quedarán archivados en nuestro Servicio, en soporte papel y en formato informático. Los datos recogidos para

el estudio estarán identificados mediante un código y solo el investigador principal/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica.

Los datos serán incluidos en una base de datos que sigue la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal. Sólo aquellos datos de la historia clínica que estén relacionados con el estudio serán objeto de comprobación. Esta comprobación se hará en la medida de lo posible en presencia del Investigador Principal/Investigadores Colaboradores, responsables de garantizar la confidencialidad de todos los datos de las historias clínicas pertenecientes a los sujetos participantes en el ensayo clínico. Usted tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento.

A los datos sólo podrán acceder los miembros del Servicio de Farmacología Clínica, que gestionan la base y que están obligados a mantener la confidencialidad de la información en ella recogida. Podrán tener acceso a los datos del ensayo, identificados mediante un código numérico para mantener el anonimato, un representante de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal y/o de las Autoridades Sanitarias. Tampoco se revelará su identidad si se publican los resultados del estudio.

En caso de duda respecto a sus derechos debe dirigirse al Comité Ético de Investigación Clínica o al Servicio de Atención al Paciente del Hospital. Cualquier nueva información referente a los fármacos utilizados en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada.

El protocolo del Ensayo ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética en la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario "Ramón y Cajal".

Firma del Voluntario

Por el Equipo Investigador

Nombre

Dr/a.

Fecha:

Fecha:

CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

Título del Ensayo: **ENSAYO CLINICO ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBILINA POR VÍA ORAL**

Promotor : **FUNDACION PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMEDICA DEL HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL**

Yo (nombre y apellidos)

.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con:

.....

(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1º Cuando quiera

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

FECHA :

FECHA :

DICTÁMEN DEL CEIC QUE LO EVALUÓ (HOSPITAL RAMÓN Y CAJAL)

 SaludMadrid	Hospital Universitario Ramón y Cajal Comité Ético de Investigación Clínica	 Comunidad de Madrid
--	--	--

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. SONSOLES SANCHO GARCIA, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor: **FUNDACION INVESTIGACION BIOMEDICA HOSPITAL RAMON Y CAJAL** para que se realice el ensayo clínico con código de protocolo del promotor: **PK-SIL-FARMA-03** Versión: **Versión 2** de fecha **10/octubre/2012** que incluye la enmienda n.º1. N.º EudraCT : **2012-004641-33**

Título:

ENSAYO CLINICO ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBILINA ORAL.

y considera que:

El ensayo se plantea siguiendo los requisitos del Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero y las normas que lo desarrollan y su realización es pertinente.

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, teniendo en cuenta los beneficios esperados.

El seguro o la garantía financiera previstos son adecuados.

El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo: * **Hoja de información al paciente/consentimiento informado versión 2 de fecha 10/octubre/2012** (actualizada según aclaraciones realizadas por el CEIC) y el plan de reclutamiento de sujetos previstos son adecuados, así como las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

La capacidad del investigador y sus colaboradores y las instalaciones y medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

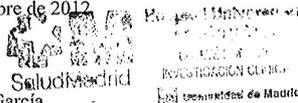
Por tanto, este CEIC actuando como comité de referencia, habiendo tenido en cuenta los dictámenes de los demás CEICs implicados **ACEPTA** que dicho ensayo clínico sea realizado en los centros siguientes por los investigadores principales que se relacionan a continuación:

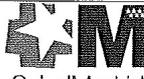
- **Hospital U. Ramón y Cajal/Dra. Mónica Aguilar Jiménez**

Lo que firmo en Madrid a 5 de noviembre de 2012

S. Sancho

Firmado: Dra. Sonsoles Sancho García



 SaludMadrid	Hospital Universitario Ramón y Cajal Comité Ético de Investigación Clínica	 Comunidad de Madrid
--	--	--

Nº EUDRACT: 2012-004641-33

CÓDIGO: PK-SIL-FARMA-03

VERSIÓN: Versión 2 de fecha 10/octubre/2012 que incluye la enmienda nº1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE: Hoja de información al paciente/consentimiento informado versión 2 de fecha 10/octubre/2012

TÍTULO: ENSAYO CLINICO ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBILINA ORAL.

PROMOTOR: FUNDACION INVESTIGACION BIOMEDICA HOSPITAL RAMON Y CAJAL

Dra. Sonsoles Sancho García, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL,

HACE CONSTAR QUE:

1º En la reunión celebrada el día 29 de octubre de 2012 correspondiente al Acta nº 260, se evaluó el Estudio de referencia y tras recibir el dictamen de los CEICs implicados se decide su **APROBACIÓN**.

2º En dicha reunión se cumplieron los requisitos establecidos en la legislación vigente -Real Decreto 223/2004 y Decreto 39/94 de la Comunidad de Madrid – para que la decisión del citado CEIC sea válida.

3º El CEIC del Hospital Ramón y Cajal, tanto en su composición, como en sus PNTs cumple con las normas de BPC.

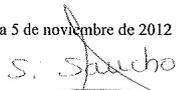
4º La composición del CEIC del Hospital Ramón y Cajal en la citada fecha, era la siguiente:

- Dra. Mª Jesús Blanchard Rodríguez (Hematología).
- Dña Irene Cabrera Troye (Licenciada en Derecho. No vinculada laboralmente al hospital)
- Dra. Itziar de Pablo López de Abechuco. (Farmacóloga Clínica).
- Dr. Alejandro del Río Busto (Cardiología).
- Dra. María de los Ángeles Gálvez Múgica. (Farmacóloga Clínica).
- Dr. José Manuel Garrido Jiménez (Cirugía Cardiovascular).
- Dra. Carmen Guillén Ponce (Oncología Médica).
- Dra. Elena Molina Martín (Servicio de Farmacia Área 4 A. Primaria).
- D. Alfonso Muriel García. (Bioestadística Clínica).
- Dr. José Antonio Pérez Molina (Enfermedades Infecciosas)
- Dra. Cristina Pueyo López. (Licenciada en Farmacia y Master de Bioética).
- D. Cristóbal Francisco Rodríguez Martín. (DUE Psiquiatría).
- Dña. Carmen Ruiz Ballesteros. (Licenciada en Derecho. No vinculada laboralmente al Hospital).
- D. Javier Sánchez Casajús (Licenciado en Económicas. No vinculado laboralmente al Hospital)
- Dra. Sonsoles Sancho García. (Oncología Radioterápica).
- Dr. José Luis San Millán López (Genética Molecular).
- Dra. Sonia Soto Díaz (Médico de Familia, Atención Primaria).

Según nuestros PNTs, en las evaluaciones de los protocolos en los que algún miembro del CEIC actúa como investigador/colaborador, éste se ausenta de la reunión durante la discusión del mismo.

Para que conste donde proceda, y a petición del promotor,

Madrid a 5 de noviembre de 2012


 Fdo: Dra. Sonsoles Sancho García
 Presidenta del CEIC


 Hospital Universitario
 Ramón y Cajal
 SaludMadrid
 Comunidad de Madrid

APROBACIÓN DE LA AEMPS

Friday 30 of Aug 2013, M.S.SS.I M. S. S.S. I Page 1 of 5

Fecha:08/30/13

Número de páginas:5

Para:913368825@fax.msc.es

Remitente:notificaciones_fax_ecm@aemps.es

Compañía

Departamento :

Fax number :913368825

Subject:Solicitud de autorización del ensayo clínico con EudraCT: 2012-004641-33 - Autorización Ensayo

Correo automático generado en contestación a su solicitud de autorización del ensayo clínico descrito en el asunto

Se le remite el oficio **Autorización Ensayo** como respuesta a esta solicitud:

Datos de la solicitud

N° EudraCT: 2012-004641-33

N° AEMPS: 13-0356

Código Protocolo: PK-SIL-FARMA-03

Título Protocolo: Ensayo clínico abierto, cruzado y aleatorizado de biodisponibilidad absoluta de silibina oral

Agencia Española del Medicamento

Área de Ensayos Clínicos

Departamento de Medicamentos de Uso Humano

Email: aecaem@aemps.es

Teléfono: (+34) 902 101 322

Fax: (+34) 91 822 50 76

Si desea que esta unidad de ayuda ponga en contacto con la siguiente dirección de contacto de la

Friday 30 of Aug 2013, M.S.SS.I

Page 2 of 5

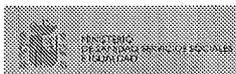
M.S.SS.I
Siempre que este email ha sido enviado por error póngase en contacto con la siguiente dirección de soporte de la aplicación: incidensayos@aemps.es

Este mensaje va dirigido, de manera exclusiva, a su destinatario y la información contenida en este e-mail y en cualquiera de sus ficheros adjuntos es RESERVADA y CONFIDENCIAL. Si Usted lee este mensaje y no es el destinatario indicado (o responsable de remitirlo a la persona indicada), no revele estos contenidos a ninguna otra persona y no los utilice para otra finalidad, está prohibido y puede ser ilegal. Por ello le informamos de que está totalmente prohibido el acceso a este mensaje a cualquier otra persona distinta a los indicados y, está también prohibida, cualquier utilización, duplicación, divulgación, distribución y/o reproducción de esta comunicación, total o parcial, en medio alguno, cualquier uso de la información contenida o cualquiera otra acción u omisión tomada en relación con el mismo sin autorización expresa en virtud de la legislación vigente. Por último, si ha recibido este mensaje por error, le rogamos y agradeceríamos tenga la amabilidad de notificarlo/reenviarlo inmediatamente a su emisor, por esta vía, a su dirección electrónica, y proceda, a su eliminación de su sistema, junto, en su caso, con sus ficheros anexos sin leerlo ni grabarlo.

Friday 30 of Aug 2013, M.S.SS.I

Page 3 of 5

M. S. S. I



agencia española de
medicamentos y
productos sanitarios

DEPARTAMENTO
DE MEDICAMENTOS
DE USO HUMANO
Área de Ensayos Clínicos

DESTINATARIO

Fundación para la Investigación biomédica del
Hospital
Carretera de Colmenar Viejo Km 9.100
28034 Madrid (España)

REFERENCIA: MUH/AEC

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EUDRACT 2012-004641-33

Adjunto se remite la resolución sobre el ensayo clínico titulado **Ensayo clínico abierto, cruzado y aleatorizado de biodisponibilidad absoluta de silibilina oral**, Nº EudraCT: 2012-004641-33.

El promotor o solicitante nombrado por éste deberá notificar la fecha de inicio del ensayo en España, remitir la información pertinente o solicitar autorización a la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, según proceda y de acuerdo con lo que establece el Real Decreto 223/2004, de las modificaciones relevantes a la documentación del ensayo, informes de seguimiento, sospechas de reacciones adversas graves e inesperadas, finalización del ensayo y demás circunstancias que establezca la legislación vigente.

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios Localizador: 6LP6T7FD1F
Fecha de la firma: 29/08/2013

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO

Página 1 de 3

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel: 918225073
Fax: 918225043

snhaem@aemps.es



Referencia: MUH/CLIN

ASUNTO: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DEL ENSAYO CLINICO Nº EUDRACT 2012-004641-33

DESTINATARIO: Fundación para la Investigación biomédica del Hospital
Carretera de Colmenar Viejo Km 9.100
28034 Madrid (España)

Vista la solicitud formulada por **Fundación para la Investigación biomédica del Hospital** para la realización del ensayo clínico número **2012-004641-33**, titulado **Ensayo clínico abierto, cruzado y aleatorizado de biodisponibilidad absoluta de silibilina oral**, código de protocolo del promotor **PK-SIL-FARMA-03**, cuyo promotor es **Fundación para la Investigación biomédica del Hospital** se emite resolución a tenor de los siguientes:

ANTECEDENTES DE HECHO

PRIMERO: Con fecha **17/06/2013**, solicita la autorización de este ensayo clínico.

A estos antecedentes de hecho les es de aplicación los siguientes:

FUNDAMENTOS DE DERECHO

Único.- Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, modificada por la Ley 4/1999, de 13 de enero; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004 de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal «Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios» y se aprueba su Estatuto, y demás normas aplicables.

Así, del expediente se deduce que se cumplen los requisitos establecidos para su autorización de acuerdo con el artículo 22 del Real Decreto 223/2004.

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios	Localizador: 6LP6T7FD1F
Fecha de la firma: 29/08/2013	

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO
smhaem@aemps.es

Página 2 de 3

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043



Por todo lo anteriormente expuesto la Directora de la Agencia de Medicamentos y Productos Sanitarios en el ejercicio de sus competencias **RESUELVE:**

1º.- AUTORIZAR la realización de este ensayo clínico con número EudraCT 2012-004641-33

Contra esta Resolución, que pone fin a la vía administrativa, puede interponerse potestativamente Recurso de Reposición ante el/la Director/a de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios en el plazo de un mes, conforme a lo dispuesto en el artículo 116 y 117 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones públicas y del Procedimiento Administrativo Común, o interponerse Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses a contar desde el día siguiente a la recepción de la presente notificación, conforme a lo dispuesto en la Ley Reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa de 13 de julio de 1998, y sin perjuicio de cualquier otro recurso que pudiera interponerse.

LA DIRECTORA DE LA AGENCIA ESPAÑOLA
DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS

D^a. Belén Crespo Sánchez-Eznarriaga

Firmado digitalmente por: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

Localizador: 6LP6T7FD1F

Fecha de la firma: 29/08/2013

Puede comprobar la autenticidad del documento en la aplicación Localizador de la Web de la AEMPS

CORREO ELECTRÓNICO

Página 3 de 3

C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8
28022 MADRID
Tel.: 918225073
Fax: 918225043

smhaem@aemps.es

CERTIFICADO DE PÓLIZA DE SEGURO

HDI

Seguros

CERTIFICADO

La Compañía **HDI HANNOVER INTERNACIONAL (ESPAÑA) Seguros y Reaseguros, S.A.**, con domicilio en **Madrid, C/ Luchana 23,**

CERTIFICA:

Que esta Compañía de Seguros tiene contratada y en vigor una Póliza de Responsabilidad Civil, registrada con el número **130/001/008865** cuyo Tomador del Seguro es **FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO RAMÓN Y CAJAL**; con domicilio en **C./ Ctra. Colmenar Viejo Km 9,100. Planta - 2 Dcha (Investigación) (28034) MADRID.**

Que la citada Póliza garantiza, en sus términos, la Responsabilidad Civil Legal del Promotor derivada del Ensayo Clínico abajo detallado, por los **daños personales** causados en los sujetos como consecuencia del Ensayo Clínico, así como los **perjuicios económicos** que se deriven directamente de los mismos, de acuerdo con el art. 61 de la Ley 29/2006 de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, el cual prescribe la contratación obligatoria de la correspondiente cobertura de Seguro y con el art. 8 del Real Decreto 223/2004, de 6 de Febrero, **(B. O. E de 7 de Febrero de 2004)**, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos y de acuerdo con las limitaciones expresamente pactadas en Póliza con el Tomador del Seguro, No contradiciendo estas limitaciones a los establecido en el Real Decreto antes mencionado. No obstante, la Póliza cumple con los requerimientos legales establecidos en la legislación española al día de su emisión.

Además de la Responsabilidad Civil Legal del promotor del ensayo clínico, queda amparada la Responsabilidad Civil Legal del Investigador y sus colaboradores, la del hospital, centro o Fundación donde el ensayo se realice, así como la del titular del mismo.

Título del ensayo: "Ensayo Clínico abierto, cruzado y aleatorizado de biodisponibilidad absoluta de silibilina oral".

Código de protocolo: PK-SIL-FARMA-03
Centro Investigador: Hospital Ramón y Cajal
Fundación: Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Ramón y Cajal.

Investigador Ppal. Dr. Mónica Aguilar Jiménez

Duración prevista del ensayo: 01.09.2013 - 30.06.2015

En caso de prolongarse el Ensayo mas tiempo de su fecha de validez, la póliza suscrita se prorrogará hasta la finalización del mismo.

Se amparan los siniestros ocurridos dentro del periodo de duración del ensayo o de los 36 meses siguientes a la finalización del mismo.

De acuerdo con lo establecido en el artículo 15 de la Ley de Contrato de Seguro 50/1980, la presente póliza no tendrá validez en el caso de que la prima no se encuentre al corriente de pago en la fecha de inicio del ensayo asegurado

Límite máximo asegurado por año:	€ 3.000.000-
Sublímite por sujeto sometido a ensayo (aplicable sobre el sublímite anual):	€ 350.000-
Sublímite por daños materiales:	€ 30.000.-

Se extiende este Certificado a efectos informativos no confiriendo al solicitante ningún derecho diferente al establecido en la póliza. Los derechos y obligaciones de las partes se encuentran regulados en los términos que se establece en la póliza y en los suplementos emitidos. Este Certificado no modifica, amplía ni extiende la cobertura acordada por las partes contratantes en la póliza mencionada.

En caso de no ser aprobado el ensayo por los organismos competentes para ello, el presente Certificado carecerá de todo tipo de validez.

Y para que así conste, se emite el presente Certificado en Madrid, a 11 de Junio de 2013.

HDI HANNOVER INTERNACIONAL ESPAÑA
 Cia. de Seguros y Reaseguros, S.A.

HDI HANNOVER INTERNACIONAL (ESPAÑA)
 SEGUROS Y REASEGUROS, S.A.
 Luchana, 23
 28010 MADRID

Tel. 91 444 20 00
 Fax 91 444 20 19
 E-mail hie@hdi.es

Targobank
 Cta. Cle.: 0216 1083 01 0600041206
 IBAN: ES84 0216 1083 0106 0004 1206
 SWIFT CODE: POHIESMM

HDI HANNOVER INTERNACIONAL ESPAÑA Seguros y Reaseguros, S.A. (Sociedad Unipersonal) inscrita en el R.M. de Madrid, tomo: 9.848, L. Ibro: 0. Folio: 129, Sección 8. Hoja M-158031. Inscripción 1.ª. Autorizada por O.M. de fecha 22-12-1985. Inscrita en el Registro de Entidades Aseguradoras N.º C - 726. C.I.F. A81250243.

Mod. 1001

CONFORMIDAD DE LA DIRECCIÓN DEL CENTRO



Conformidad de la Dirección del Centro

Dra. **VICTORIA UREÑA VILARDELL**, Subdirectora Médico de Docencia e Investigación del Hospital "Ramón y Cajal" y vista la autorización del Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital.

CERTIFICA

Que conoce la propuesta realizada por el Promotor: **FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOMEDICA DEL HOSPITAL RAMON Y CAJAL** para que sea realizado en este Hospital el Ensayo Clínico con código de Protocolo: **PK-SIL-FARMA-03** , Nº Eudract: **2012-004641-33** , titulado:

ENSAYO CLINICO ABIERTO, CRUZADO Y ALEATORIZADO DE BIODISPONIBILIDAD ABSOLUTA DE SILIBILINA ORAL.

**Versión 2 de fecha 10/octubre/2012 que incluye la enmienda nº1
Hoja de información al paciente/consentimiento informado versión 2 de fecha 10/octubre/2012**

Y que será realizado por la **Dra. Mónica Aguilar Jiménez** como Investigadora Principal.

Que dicho ensayo clínico ha obtenido financiación de la Mutua, convocatoria 2012.

Que está de acuerdo con el contrato firmado entre la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, el Promotor y el Investigador, en el que se especifican todos los aspectos económicos de este Ensayo Clínico.

Que acepta la realización de dicho Ensayo Clínico en este Hospital.

Lo que firma en Madrid a 13 de Noviembre de 2012

Fdo. Dra. Victoria Ureña Vilardell



Ctra. Colmenar, km. 9,100 - 28034 MADRID (Planta -2 Dcha)
Tlf.: 91 336 8322

E-mail: ceic.hrc@salud.madrid.org

CONCESIÓN DE LA AYUDA ECONÓMICA POR LA FUNDACIÓN “MUTUA MADRILEÑA”

FUNDACIÓN
MUTUA MADRILEÑA

Fortuny, 18
28010 Madrid
Tel.: 991 592 28 36
info@fundacionmutua.es
www.fundacionmutua.es

Dra. Monica Aguilar Jiménez

Madrid, 30 de mayo de 2012

Estimada Dra. Aguilar ,

Tengo el gusto de comunicarle que el proyecto de investigación en el que Ud. figura como investigador principal, y que fue presentado a la IX Convocatoria de Ayudas a la Investigación de la Fundación Mutua Madrileña, ha sido evaluado favorablemente por su Consejo Rector de Investigación y aprobado por el Patronato de la Fundación en su reunión del pasado día 22 de Mayo.

Sin embargo, le informo que el importe solicitado por usted ha sido rebajado a 35.000,00 €, dada la gran cantidad de solicitudes presentadas (más de 800) y de su cuantía económica (más de 55 millones de euros), que nos ha obligado a un mayor esfuerzo en la evaluación, selección y distribución de las ayudas. Espero que esta modificación no suponga un inconveniente para la realización de los trabajos previstos en su proyecto, ya que desde la Fundación Mutua Madrileña queremos seguir contribuyendo, en la medida de nuestras posibilidades, al avance de la investigación médica en España.

En los próximos días recibirá por correo electrónico, en la dirección que figura en su solicitud, las indicaciones relacionadas con los trámites necesarios para proceder al ingreso del importe concedido.

Si necesita cualquier aclaración, no dude en contactar con nosotros.

Reciba un cordial saludo,



Otilia Fernández López
Gerente Fundación Mutua Madrileña

FM21_E007_1009


barcelona
world race