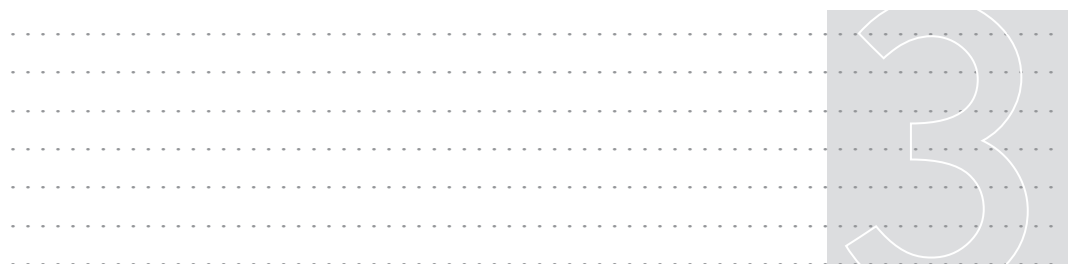

■ Capítulo 3

**Bioequivalencia media vs.
individual: el caso de Fenitoína**



El tratamiento moderno de la epilepsia comenzó con el bromuro de potasio. Su primera mención se encuentra en la edición de Lancet de mayo de 1857 en el trabajo presentado por el Dr. E. Sieveking en la Sociedad Real Inglesa de Medicina y Cirugía titulado “Análisis de 52 casos de epilepsia observados por el autor”. El presidente de dicha sociedad, Sir Charles Locock, obstetra de la reina Victoria, compartió con la audiencia su entusiasmo por el bromuro de potasio en mujeres jóvenes con “epilepsia histérica relacionada con el periodo menstrual”. Si bien no hay estudios aleatorizados con bromuro, hay evidencia clínica suficiente para apoyar su título de primera droga efectiva contra la epilepsia (Brodie, 2010). De hecho, el bromuro es hoy en día una droga de tercera elección para el tratamiento de niños con epilepsia (Korinthenberg et al., 2007).

La era farmacológica de la terapia con drogas antiepilépticas (AEDs) comenzó con el descubrimiento casual de las propiedades anticonvulsivas del fenobarbital (PB), que se comercializaba como hipnótico (Luminal) hasta que fue utilizado para sedar a pacientes epilépticos. No solo se observó que los pacientes tenían menos episodios durante esa noche, sino que tampoco convulsionaban al día siguiente. El PB continúa siendo uno de los AEDs más ampliamente prescritos y permanece como una primera opción en muchos países debido a su moderado costo (Kwan & Brodie, 2004).

Cuando en 1934 el Dr. Tracy Putnam fue designado director de la unidad neurológica en el Hospital de Boston se dedicó a buscar un AED menos sedativo que el PB. Ensayó numerosos fenil-derivados de PB y mediante experimentos en gatos encontró que la Fenitoína (PHT) era el único de esos compuestos que resultaba efectivo para proteger a los gatos de las convulsiones inducidas eléctricamente, con una toxicidad aceptable para su administración rutinaria. En 1936 la PHT se ensayó clínicamente, y actualmente continúa siendo el AED más ampliamente utilizado en EEUU (Brodie, 2010).

Su actividad antiepiléptica incluye convulsiones tónico-clónicas generalizadas y crisis parciales. No es eficaz frente a ausencias, mioclonías o convulsiones febriles. Inhibe los canales de sodio, bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Regula la actividad de la ATPasa- Na^+/K^+ y tiende a restablecer el desequilibrio iónico provocado por un exceso de despolarización. Afecta más las neuronas normales que propagan las descargas que las del foco epiléptico y las que descargan anormalmente más que la transmisión normal, careciendo de acción sedante (Armijo & Herranz, 1998).

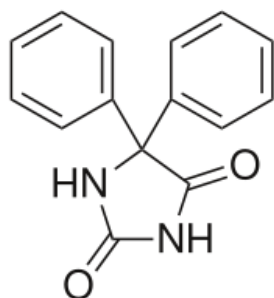


Figura 3-1. Estructura química de la PHT

Su absorción oral es completa (> 95%) pero lenta ($T_{max} = 3 - 12$ horas, que puede llegar a 30 horas cuando se administran dosis altas), y los alimentos aumentan su absorción. Se une el 90% a la albúmina; su concentración en el líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial del cerebro, y saliva se corresponde con la concentración libre (10%), aunque la concentración cerebral pueda resultar mayor debido a acumulación en componentes no acuosos de las células. No tiene metabolitos activos y se elimina casi totalmente por hidroxilación en el microsoma hepático (> 95%), reacción que se satura con concentraciones por encima de 10 mg/l dando lugar a una cinética dosis-dependiente tipo Michaelis-Menten. Como consecuencia, cuando se utilizan dosis altas se alcanzan concentraciones mayores a las esperadas (ver Figura 3-2), lo que dificulta el ajuste de la dosis, se alarga la semivida de eliminación (desde 15 horas a dosis bajas hasta 120 horas a dosis altas) y tarda más tiempo en alcanzarse el estado estacionario.

Por ello, se debe tener extremo cuidado cuando se intercambian formulaciones, ya que los niveles plasmáticos pueden modificarse considerablemente entre un producto y otro. Dichos intercambios deben estar siempre acompañados de monitoreos terapéuticos que garanticen la eficacia y seguridad del tratamiento (Goodman & Gilman, 2006). En estudios controlados con PHT se ha encontrado aumento (Mikati et al., 1992), disminución (Rosenbaum et al., 1994) o ningún cambio (Chen et al., 1982) en los niveles plasmáticos cuando se intercambió el producto líder por uno genérico. También se han reportado diferencias en el efecto de la comida sobre el producto de marca respecto a una FG: la comida producía una disminución significativa de la BD de la FG pero no del producto de marca (Wilder et al., 2001). Análogamente, otros investigadores encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de PHT en pacientes epilépticos cuando éstos pasaban del producto de marca a una FG, tanto adultos (Burkhardt et al., 2004) como pediátricos (Hodges et al., 1986).

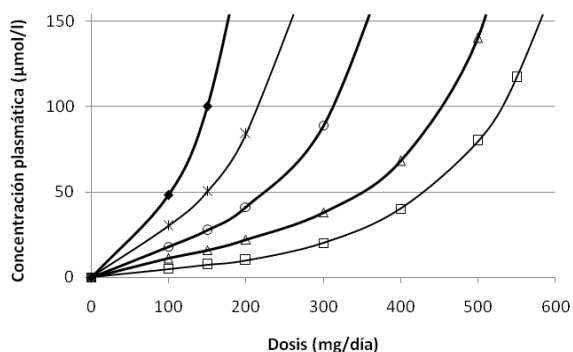


Figura 3-2. Gráfico de las concentraciones plasmáticas de PHT en función de la dosis administrada en cinco pacientes diferentes (cada curva representa un paciente). Se observa el aumento no-lineal de las concentraciones a dosis elevadas (pérdida de linealidad aproximadamente a partir de concentraciones > 10 mg/l = 40 μmol/l). *Adaptado de Cohen & Pradeau, 1998*

El ajuste de dosis de PHT también se torna difícil debido a la gran variabilidad individual en su metabolismo, junto con la cinética no lineal saturable. Estudios recientes han mostrado la influencia de la farmacogenética en el metabolismo de drogas, y más precisamente se cree que el polimorfismo en el gen que codifica para el citocromo P450 2C19 (CYP2C19) es el responsable de la mayoría de las variaciones inter individuales encontradas durante la terapéutica con PHT (Bergen, 2009). Por otro lado, se trata de una droga de estrecho margen terapéutico ya que el intervalo óptimo de niveles séricos habitualmente reconocido es de 10 a 20 mg/l, si bien hay muchos pacientes que responden a niveles de 5 a 10 mg/l cuando la PHT se utiliza como primera opción de tratamiento. Por el contrario, hay pacientes resistentes en los que se necesitan niveles de hasta 25 mg/l, aunque niveles por encima de 20 mg/l suelen producir efectos tóxicos inaceptables (Armijo & Herranz, 1998).

Debido a esto, la PHT fue una de las primeras drogas para las cuales las Agencias Regulatorias requirieron estudios de bioequivalencia (BE) como etapa previa a la introducción de una formulación en el mercado. Más aun, la PHT ha sido propuesta como candidata para estudios de BE Individual (BEI) ya que reúne todos los factores que afectan negativamente la equivalencia terapéutica y la BE: baja solubilidad en agua, farmacocinética no-lineal y estrecho margen terapéutico (Anderson, 2008). Por ello elegimos esta droga como modelo para evaluar el desempeño de dos diseños estadísticos para estudios de BE: BE media (BEM) y BEI.

Si bien estos diseños no son los únicos posibles para esta clase de estudios, según se estableció en el Capítulo 1, resulta interesante compararlos ya que la BEI fue el modelo propuesto inicialmente para asegurar la “intercambiabilidad” de medicamentos. Anderson y Hauck (Anderson & Hauck, 1990) como así también Sheiner (Sheiner, 1992) fueron los primeros en establecer la diferencia entre “recetabilidad” e “intercambiabilidad”, según si la nueva formulación es introducida al principio o durante el tratamiento con un determinado fármaco, respectivamente. En sus trabajos establecían que en el primer caso era suficiente que la nueva formulación fuera BEM respecto al producto de referencia para asegurar la eficacia y seguridad del tratamiento, mientras que en el segundo era necesario conocer la variabilidad intra individual de la respuesta a la droga, por lo que se requerían estudios de BEI (Endrenyi & Midha, 1998; Midha et al., 1999).

Como se discutió en el Capítulo 1, demostrar estadísticamente que dos formulaciones T y R son similares significa que cierta función comparadora de los parámetros de la distribución estadística de T y R, $f(\theta_T, \theta_R)$ debe caer dentro de límites preestablecidos (ver Ecuación 1-1). En el caso de la BE media, el criterio toma la siguiente forma:

$$(\mu_T - \mu_R)^2 \leq \theta_M^2 \Rightarrow -\theta_M \leq (\mu_T - \mu_R) \leq \theta_M$$

■ Ecuación 3-1

Donde μ_T y μ_R son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados de T y R, respectivamente, y θ_M es el límite de BE, tal que $\theta_M = \ln(1,25)$.

En dicho capítulo también se introdujo el concepto de BEI, como aquel que permitía evaluar, además de las medias de T y R, las variabilidades intra individuales de ambas formulaciones junto con la interacción Individuo*Formulación (I*F). Este concepto fue inicialmente propuesto por Anderson y Hauck en 1990 (Anderson & Hauck, 1990) si bien luego se desarrollaron numerosos métodos de cálculo aplicables al mismo. Dichos procedimientos pueden clasificarse en: métodos basados en momentos estadísticos, que evalúan funciones de las distribuciones de los parámetros farmacocinéticos, y métodos basados en el cálculo de la probabilidad de que la diferencia entre las características farmacocinéticas de BD sea pequeña (Endrenyi & Midha, 1998). Se demostró luego que ambas clases de métodos presentaban gran correlación en sus resultados (Hauck & Anderson, 1994; Holder & Hsuan, 1993; Schall, 1995).

En el presente trabajo se aplica un método correspondiente a la primera categoría, y sólo se detallarán las ecuaciones y métodos de cálculo correspondientes al mismo. El criterio de BEI mencionado fue propuesto por Schall y Luus en 1993 (Schall & Luus, 1993) y fue el que adoptó la guía correspondiente de la FDA (FDA/CDER, 2001).

Matemáticamente, se puede expresar de la siguiente manera:

$$(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2) \leq \Delta_I^2$$

■ Ecuación 3-2

Donde μ_T y μ_R son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados mientras que $\sigma_{T,intra}^2$ y $\sigma_{R,intra}^2$ son las varianzas intra individuales de T y R, respectivamente; σ_D^2 es la varianza debida a la interacción I*F y Δ_I^2 es el límite de BE.

La Ecuación 3-2 representa un único criterio correspondiente al límite superior de un test unilateral, a diferencia de la BEM donde, como se ve en la Ecuación 3-1 (y como ya se comentó en el Capítulo 1), se deben comparar ambos extremos del intervalo para concluir BE entre las formulaciones estudiadas.

Si bien el criterio básico es el descrito por la Ecuación 3-2, la guía de la FDA lo adoptó en su forma “escalada”, es decir, normalizada por un valor determinado. Como a su vez también se estableció que este escalado podía realizarse de dos maneras, se llamó a todo el procedimiento “*mixed-scaled approach*”, es decir, “aproximación de escalado mixto”. Los dos posibles escalados son:

- respecto a la varianza intra individual del producto de referencia, $\sigma_{R,intra}^2$ (*reference-scaled*):

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2)}{\sigma_{R,intra}^2} \leq \theta_I^2$$

■ Ecuación 3-3

- respecto a una constante, $\sigma_{0,intra}^2$ (*constant-scaled*):

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_D^2 + (\sigma_{T,intra}^2 - \sigma_{R,intra}^2)}{\sigma_{0,intra}^2} \leq \theta_I^2$$

■ Ecuación 3-4

Se utiliza uno u otro tipo de escalado en función del valor de la relación entre $\sigma_{R,intra}^2$ y $\sigma_{0,intra}^2$, si la primera es mayor se emplea el primer criterio, y viceversa. Es decir, el método de escalado tiene como consecuencia ensanchar o flexibilizar el criterio de aceptación de BEI para drogas altamente variables. Ahora bien, si la droga presentara baja variabilidad el criterio se volvería muy exigente, por ello se utiliza el escalado mixto: en el caso de drogas con baja variabilidad el denominador se convierte en una constante.

Por otro lado, a partir de las ecuaciones anteriores puede verse que la BEI se reduce a la BEM cuando los productos T y R presentan iguales variabilidades y no existe interacción I*F, ya que en ese caso la Ecuación 3-2 se transforma en la 3-1. También se observa que si la formulación T presenta menor variabilidad que R ello es “recompensado” por el criterio, ya que la diferencia de las varianzas se vuelve negativa y por lo tanto es permitida una mayor diferencia entre las medias.

Resta establecer el valor de las constantes, $\sigma_{0,intra}^2$ y θ_I^2 . La primera es el valor de corte a partir del cual se emplea un criterio u otro, y su valor numérico fue establecido de acuerdo al siguiente razonamiento: suponiendo un valor máximo de θ_I^2 de 1,25 (por analogía con la BEM), ¿cuánto debe valer $\sigma_{0,intra}^2$ para dos formulaciones cuyo cociente de medias geométricas es 1,25 si las mismas no presentan interacción I*F y las varianzas intra individuales de T y R son iguales? Eso arroja un valor de $\sigma_{0,intra}^2 = 0,04$, valor sugerido por la guía de la FDA (FDA/CDER, 2001).

$$\frac{(\mu_T - \mu_R)^2}{\theta_I^2} \cong \sigma_{0,intra}^2 \Rightarrow \frac{(\ln 1,25)^2}{1,25} \cong 0,04$$

■ Ecuación 3-5

Por lo tanto, $\sigma_{0,intra} = 0,2$. En cuanto a la determinación del valor del criterio de aceptación θ_I^2 , éste debe basarse en el criterio de la BEM más los términos debidos a la varianza (los que se agrupan bajo la denominación ε_I). El valor recomendado para la diferencia de varianzas intra individuales entre T y R es de 0,02, mientras que para la interacción se acepta hasta 0,03 (FDA/CDER, 2001), lo que genera un valor $\varepsilon_I = 0,05$. El criterio queda definido por lo tanto según la siguiente expresión:

$$\theta_I^2 = \frac{(\ln 1,25)^2 + \varepsilon_I}{\sigma_{0,intra}^2} = \frac{(\ln 1,25)^2 + 0,03 + 0,02}{0,04} = 2,495$$

■ Ecuación 3-6

En la segunda parte de este capítulo (sección 3.2) se detalla un estudio de BEI del principio activo PHT realizado en voluntarios sanos y se comparan sus resultados y métodos de cálculo con los de las BEM que se pueden obtener a partir de los mismos datos experimentales. En la siguiente parte del capítulo (sección 3.3) se continúa el análisis mediante simulaciones de estudios de BEI que permitieron evaluar su desempeño cuando se modificaban diferentes variables. Finalmente, se analizan los resultados que permiten responder a la premisa planteada en la primera de nuestras hipótesis:

Los estudios de bioequivalencia individual (BEI), si bien brindan mayor información que los de bioequivalencia media (BEM) al replicar la administración de los productos en los voluntarios, en la mayoría de los casos no presentan ventajas significativas que justifiquen su aplicación para la evaluación comparativa de la biodisponibilidad (BD) de dos medicamentos.

Ensayos realizados

3.1 Desarrollo y validación del método analítico

Método para la determinación de PHT en saliva de voluntarios sanos

Se aplicó un método por HPLC para la determinación de PHT en saliva de voluntarios sanos (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*).

● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemania), 125 x 4 mm d. i. y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil consistió en una mezcla de metanol: acetonitrilo: isopropanol: agua (20:20:3:57) llevada a pH 3 con H₃PO₄ 10%, desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Se trabajó de manera isocrática y a temperatura ambiente, con un flujo de 1,3 ml/min y con detección UV a 210 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock se prepararon en metanol, en el caso de PHT la concentración fue de 50 µg/ml y se preparó a partir de PHT Sustancia de Referencia (SR, título: 99,11% sdtc). En el caso del estándar interno (SI), Propilparabeno (PPB), la concentración fue 15 µg/ml. Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante once meses a -20 °C). Las soluciones de referencia utilizadas luego para la validación del método (así como también durante la valoración de las muestras) se prepararon por dilución de estas soluciones stock con saliva blanco y se almacenaron a -20 °C.

● Preparación de las muestras

Sobre 1 ml de muestra salival se agregaron 30 µl de la solución stock de PPB (15 µg/ml, SI) y 2 ml de cloroformo. Se agitó en vortex durante 1 min y luego se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. La fase orgánica se separó y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C en un baño de agua. El residuo se resuspendió con 100 µl de metanol, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

Validación del método analítico

● Especificidad

El método es específico respecto a la matriz biológica ya que no se observaron picos cercanos (interferencias endógenas) a los tiempos de retención de PHT y PPB cuando se analizaron muestras de saliva blanco provenientes de ocho fuentes independientes. En la Figura 3-3 se muestran dos cromatogramas: uno correspondiente a saliva blanco y otro a la misma matriz inoculada con soluciones de referencia de PHT y PPB.

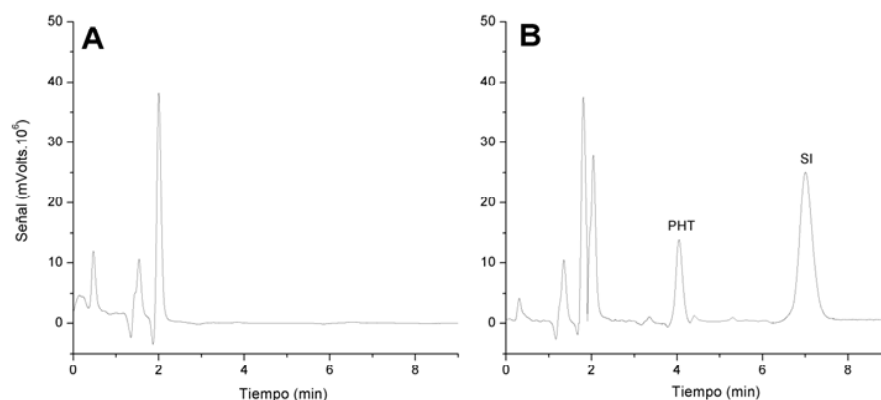


Figura 3-3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva blanco (A) y saliva blanco más soluciones de referencia de PHT y PPB (estándar interno, SI) (B)

● Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se trabajó con muestras correspondientes a cinco niveles de concentración con tres replicados independientes a cada uno ($N = 15$), dentro del rango $0,0075-1,00 \mu\text{g/ml}$, preparadas inoculando saliva blanco con solución stock de PHT y de PPB.

El método ajustó al modelo lineal, con la concentración como variable independiente x y la relación de áreas de pico ($Ra=A_{\text{pht}}/A_{\text{ppb}}$) como variable dependiente y , de acuerdo al test de Student ($p < 0,0001$). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3-1.

Tabla 3-1. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB. Se ensayaron tres réplicas independientes a cinco niveles diferentes de concentración ($N = 15$) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo del 95% de Confianza. R^2 : coeficiente de determinación

Rango ($\mu\text{g/ml}$)	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	R^2	Suma de residuales
0,0075 - 1,00	0,0016 [-0,0064 - 0,0096]	2,3847 [2,3691 - 2,4003]	0,9999	$2,129.10^{-13}$

Se considera como límite de cuantificación la concentración $0,0075 \mu\text{g/ml}$ ya que para las muestras correspondientes se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y el pico era identificable, discreto y reproducible con una precisión de al menos el 20% y una exactitud de entre el 80-120% (Shah et al., 1991).

● Exactitud y precisión

Se prepararon muestras de PHT (adicionadas de PPB) a cinco niveles de concentración (los mismos de la linealidad), tres replicados independientes a cada nivel. Para ello se inoculó saliva blanco con cantidades adecuadas de soluciones de referencia. Las

concentraciones finales y los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3-2, donde se observa que el método posee exactitud y precisión aceptables en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó el cociente de áreas (Ra) entre PHT/PPB.

Las muestras fueron preparadas, procesadas y analizadas el mismo día, de modo que la precisión obtenida es intra-día. Esto se hizo así para intentar simular la situación real de aplicación del método: procesar todas las muestras correspondientes a un voluntario en el mismo día.

Tabla 3-2. Exactitud y precisión (intra-día) obtenidas con muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Intra-día	
	Exactitud (%)	CV (%)
0,0075	100,50	2,50
0,050	99,58	1,49
0,250	100,40	1,24
0,500	100,67	0,65
1,000	99,79	0,87

● **Recuperación**

Los porcentajes recuperados luego de la etapa de extracción se evaluaron a tres niveles de concentración diferentes (el menor, medio y mayor de la curva de calibración), con tres réplicas a cada nivel, mediante la comparación del área de pico de PHT en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco más solución de referencia) con el área obtenida con soluciones de referencia sin extraer, es decir, soluciones de igual concentración que las anteriores pero preparadas por simple dilución de la solución stock en metanol.

La Tabla 3-3 muestra los resultados: los porcentajes recuperados obtenidos fueron cercanos al 80% y relativamente constantes, lo que motivó el uso de SI ya que, como se observa en la Tabla 3-2, cuando en vez de áreas de pico los cálculos se realizan utilizando el parámetro Ra los porcentajes recuperados se aproximan al 100%.

Tabla 3-3. Exactitud y precisión (intra-día) obtenidas con muestras salivales inoculadas con solución de referencia de PHT. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
0,0075	80,04	1,67
0,250	82,01	4,67
1,000	81,78	1,37

● Estabilidad

Las soluciones stock de las SR de PHT y PPB resultaron estables durante al menos once meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Periódicamente, a lo largo de ese período, fueron re-testeadas comparando las áreas de pico obtenidas con las áreas correspondientes de soluciones de referencia preparadas el día del ensayo.

Por otro lado, también se determinó la estabilidad de muestras de saliva inoculadas con PHT y PPB (a dos niveles de concentración, tres réplicas independientes cada vez) frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h) y durante 20 h a temperatura ambiente. Como se observa en la Tabla 3-4, las muestras resultaron estables en todas las condiciones ensayadas.

Tabla 3-4. Estabilidad de muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de PHT y PPB frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente y frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. CV: coeficiente de variación

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Recuperación (%)	CV (%)
	(n = 3)	
<i>Estabilidad frente a un ciclo de 20 h a temperatura ambiente</i>		
0,05	100,76	1,80
0,50	99,71	0,93
<i>Estabilidad frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h)</i>		
0,05	99,81	1,55
0,50	100,38	1,04

3.2 Estudio de BDR (BEI/BEM) de cápsulas de PHT 100 mg en voluntarios sanos

Descripción y objetivos

● Diseño del estudio

Se evaluó la biodisponibilidad relativa (BDR) de dos productos comerciales de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata (productos F y G), en voluntarios sanos, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado de cuatro períodos y dos secuencias, empleando saliva como fluido biológico. Las dos secuencias aplicadas fueron RTTR y TRRT: los voluntarios se dividieron al azar en dos grupos y a cada grupo se le asignó una secuencia por sorteo. Entre períodos se dejaron pasar 15 días de manera de asegurar un lavado de al menos 7 veces la vida media del fármaco, que se estima entre 7 y 42 h (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

Los productos evaluados fueron los mismos ensayados en el Capítulo 2:

- producto F: Fenitoína Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 090071, Vto.: 02/2011)
- producto G: Fenigramon, Lab. Gramon SAIC (Lote: 021T, Vto.: 07/2010)

Se fija arbitrariamente al producto G para ser denominado "Referencia", ya que la autoridad sanitaria de nuestro país establece como referencia para los estudios *in vivo* que involucren cápsulas rígidas de PHT 100 mg a una formulación extranjera, no

disponible comercialmente en nuestro país: Phenytoin Sodium Prompt cápsulas de 100 mg, Ivax Pharms, EE UU (ANMAT, 2002).

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki (World Medical Association, 2004) y a las Guías de Buenas Prácticas en Clínica de la Comisión Internacional de Armonización (*International Conference on Harmonization Guideline for Good Clinical Practice*, EMEA/CPMP, 2002). El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata y todos los voluntarios dieron su consentimiento informado por escrito, frente a un testigo (*ver Anexo III*).

En el primer día de cada período los voluntarios (con al menos ocho horas de ayuno) recibieron una única dosis 100 mg de PHT (de la marca correspondiente) a las 8 de la mañana, con aproximadamente 200 ml de agua. Durante ese primer día las comidas fueron estandarizadas y programadas para las 12, 16 y 20 horas.

● Sujetos

El estudio incluyó un total de 24 voluntarios sanos (10 hombres y 14 mujeres) y todos ellos completaron el esquema de trabajo propuesto. Como criterios de inclusión se exigió una edad de entre 18 y 40 años y un peso dentro del 15% del peso ideal, que no fueran fumadores ni estuvieran bajo ningún tratamiento farmacológico, y en el caso de las mujeres que no estuvieran embarazadas. El peso ideal (PI) en kg se calculó como $PI = 0,9 \times (H - 100)$ para las mujeres y $PI = (H - 100)$ para los hombres, siendo H la altura en centímetros (Silva et al., 2010).

Para los 24 voluntarios la edad media [rango] fue de 29 años [22-37], el peso medio de 66,3 kg [52-86] y la altura media de 1,73 m [1,60-1,90]. Se les solicitó no tomar ninguna medicación en los 15 días previos al estudio, así como también evitar el consumo de bebidas alcohólicas o que contuvieran xantinas en las 48 horas previas al inicio de cada período del estudio.

En cada período se interrogó a los voluntarios respecto a la aparición de algún síntoma no habitual luego de la administración del producto correspondiente, y durante los dos días posteriores a dicha administración para detectar cualquier efecto adverso que pudiera presentarse.

● Toma de muestras

Como las concentraciones salivales se equilibran instantáneamente con las arteriales en los capilares sanguíneos (Posti, 1982), los niveles salivales son más sensibles al ingreso de droga al organismo durante el proceso de absorción, resultando en una respuesta más variable y en perfiles C vs. T con más de un pico (esto se trata con más detalle en el Capítulo 6). Por lo tanto, cuando se trabaja con muestras salivales, el esquema de muestreo es un aspecto crítico del estudio: se debe elegir de tal manera que incluya el máximo real de ambas formulaciones, en todos los sujetos y los períodos.

Para elegir el mejor esquema de muestreo se seleccionaron seis voluntarios (no incluidos en el estudio principal), con el mismo criterio de inclusión descripto anteriormente, y se los dividió al azar en dos grupos. Luego de una toma de muestra de saliva pre-dosis (blanco o T_0) cada grupo recibió una dosis (100 mg) de las formulaciones F y G, con 200 ml de agua. Luego de la administración de la cápsula correspondiente, la boca fue enjuagada exhaustivamente con agua (que se descartó), y se tomaron muestras cada media hora durante las primeras 12 horas post-dosis, luego de lo cual se tomaron muestras a las 24, 36 y 48 horas. Estas muestras se recogieron en recipientes

plásticos adecuados, y se permitió a los voluntarios masticar un trozo de parafilm para facilitar la producción de saliva. Luego de centrifugar la saliva colectada a 3500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC descrita en la sección 3.1 del presente capítulo.

Finalizado el período de muestreo se construyeron los seis perfiles C vs. T de manera de obtener los valores de Tmax: 3; 4; 4; 4,5; 5 y 5,5 h (media \pm SD = 4,33 \pm 0,88), y también se calcularon las áreas bajo la curva desde cero hasta 48 h (ABC_{0-t} , media \pm SD = 3,05 \pm 0,42) y hasta infinito (ABC_{0-inf} , media \pm SD = 3,36 \pm 0,47) mediante el método de los trapecios. A continuación, se propusieron tres esquemas de muestreo posibles para el estudio principal, que diferían entre sí en el número y la ubicación de los muestreos cada media hora alrededor de Tmax. Para los tres esquemas se recalcularon los valores de ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} y se compararon estadísticamente entre ellos y respecto del esquema completo. Como resultado, se seleccionó el siguiente esquema de muestreo: 0; 1; 2; 3; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9; 10; 12; 24; 36 y 48 h. Dicho esquema fue el que mejor describía los perfiles salivales y el más cómodo para los voluntarios, por su menor número de muestreos cada media hora. Los valores de ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} (media \pm SD) fueron 3,02 \pm 0,45 y 3,33 \pm 0,50, respectivamente. Luego de un ANAVA, se comprobó que dichos valores no diferían significativamente respecto a las ABC correspondientes del esquema completo ($p > 0,05$).

Por lo tanto, para el estudio de BDR principal se aplicaron las mismas condiciones de toma de muestra, pre-tratamiento, almacenamiento y método de análisis que los recién descritos, siguiendo el esquema elegido.

● Análisis estadístico y farmacocinético

Las áreas bajo la curva de concentración-tiempo (ABC_{0-t} y ABC_{0-inf}) se calcularon mediante el método de los trapecios. La concentración salival máxima (Cmax) y el tiempo para alcanzar dicha concentración (Tmax) se obtuvieron directamente de los datos de concentración salival vs. tiempo. La constante de eliminación (Ke) se estimó como (-) la pendiente de la recta calculada por regresión lineal de los últimos puntos ln-transformados de cada curva, y la semivida de eliminación ($t_{1/2}$) se calculó como 0,693/Ke. Para obtener ABC_{0-inf} fue necesario sumar a ABC_{0-t} el tramo extrapolado desde 48 horas hasta infinito, calculado como la última concentración medida (C_{48}) dividida por Ke.

Una vez que se calcularon los parámetros farmacocinéticos Cmax, ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} y Cmax/ ABC_{0-t} para todos los voluntarios en todos los períodos, se realizó un ANAVA al 5% de significación con los datos ln-transformados. Como efectos fijos se consideraron: período, secuencia, individuos dentro de cada secuencia, formulación e interacción Individuo*Formulación. A partir del ANAVA se estimaron las varianzas intra e inter individuales, sin distinguir por formulación.

A continuación se realizó el análisis de la Bioequivalencia Individual (BEI), mediante el método de escalado mixto recomendado por la FDA (FDA/CDER, 2001) y mencionado en la introducción de este capítulo. Este método consiste en referir los cálculos a la varianza intra individual del producto R ($\sigma^2_{R,intra}$) o a una varianza constante ($\sigma^2_{0,intra}$ = 0,04), la que sea mayor. En nuestro caso, el análisis fue siempre escalado a la constante, ya que la varianza intra individual de R fue menor a 0,04 para todos los parámetros considerados. Por lo tanto, la ecuación correspondiente fue la Ecuación 3-4.

Como además se tiene que:

$$\sigma_D^2 = \sigma_I^2 - \frac{1}{2}(\sigma_{T,intra}^2 + \sigma_{R,intra}^2)$$

■ Ecuación 3-7

Reemplazando la Ecuación 3-7 en la Ecuación 3-4 y reordenando se llega a:

$$\eta_2 = (\mu_T - \mu_R)^2 + \sigma_I^2 + 0,5 \cdot \sigma_{T,intra}^2 - 1,5 \cdot \sigma_{R,intra}^2 - \sigma_{0,intra}^2 \cdot \theta_I^2 \leq 0$$

■ Ecuación 3-8

Donde η_2 es lo que realmente se calcula, y se denomina “estima puntual del criterio lineal de BEI”, μ_T y μ_R son las medias de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados mientras que $\sigma_{T,intra}^2$ y $\sigma_{R,intra}^2$ son las varianzas intra individuales de T y R, respectivamente; σ_I^2 es la varianza debida a la interacción I*F que se obtiene del ANAVA y θ_I^2 es el límite de BE, 2,495 (ver la introducción de este Capítulo).

Las varianzas intra individuales de T y R se calculan de la siguiente manera (se presentan las ecuaciones para T, las correspondientes a R resultan de reemplazar T por R):

$$\sigma_{T,intra}^2 = \frac{1}{2 \cdot (N-s)} \sum_{i=1}^s \sum_{j=1}^{n_i} (T_{ij} - \bar{T}_i)^2$$

■ Ecuación 3-9

Donde:

$$T_{ij} = Y_{ij,T_1} - Y_{ij,T_2}$$

Es decir, se calculan todas las diferencias T_{ij} en el parámetro farmacocinético deseado (Y) para un sujeto j dado, en una secuencia i dada, luego se suman los cuadrados y se dividen por $2(N-s)$ de las diferencias entre dichas T_{ij} y el promedio de las mismas. Y análogamente para la formulación de referencia R.

Ahora bien, se dijo al inicio de este Capítulo que este método consistía en determinar el límite superior de un test unilateral, y eso es equivalente a calcular el límite superior del IC 95% de η_2 . Si dicho valor es menor que cero, las formulaciones T y R se consideran BEI. A continuación, la Tabla 3-5 presenta las fórmulas correspondientes, y puede verse que para el cálculo lo que se hace es desglosar la Ecuación 3-8 en cada uno de sus términos (E), calcular el límite superior de sus IC 95% (H) y finalmente combinarlos en otro parámetro (U) que permita conocer el límite de confianza (U) total o de η_2 .

Tabla 3-5. Método matemático empleado para el cálculo del límite superior del Intervalo de Confianza 95% de la estima puntual del criterio lineal –escalado a una constante– de BEI (η_2) (FDA/CDER, 2001)

Términos de la ecuación	Estima (E_i)	Límite de confianza (H_i)	$U_i = (H_i - E_i)^2$
Diferencia de medias (D)	$E_D = (\mu_T - \mu_R)^2$	$H_D = \left[\mu_T - \mu_R + t_{(0,95;N-s)} \left(\frac{1}{s^2} \sum_{i=1}^s \frac{\sigma_i^2}{n_i} \right)^{1/2} \right]^2$	U_D
Interacción I*F (I)	$E_I = \sigma_I^2$	$H_I = \frac{(N-s) \cdot \sigma_I^2}{\chi_{(0,05;N-s)}^2}$	U_I
Varianza intra individual de T	$E_T = 0,5 \cdot \sigma_{T,intra}^2$	$H_T = \frac{0,5 \cdot (N-s) \cdot \sigma_{T,intra}^2}{\chi_{(0,05;N-s)}^2}$	U_T
Varianza intra individual de R	$E_R = -1,5 \cdot \sigma_{R,intra}^2$	$H_R = \frac{-1,5 \cdot (N-s) \cdot \sigma_{R,intra}^2}{\chi_{(0,95;N-s)}^2}$	U_R
Término constante	$E_C = \sigma_{0,intra}^2 \cdot \theta_I^2$		

Límite superior del 95% de confianza de $\eta_2 = \sum E_i + \sqrt{\sum U_i}$

En la tabla anterior, n_i es el número de voluntarios por secuencia, N el número total de voluntarios, s el número de secuencias y $t_{(0,95;n-s)}$ y $\chi_{(0,95;n-s)}^2$ son los estadísticos de Student y Chi-Cuadrada con $(N-s)$ grados de libertad, respectivamente.

Por otro lado, se realizaron tres análisis de BEM diferentes: uno con todos los datos, promediando las dos administraciones de cada producto, y otros dos tomando solo los datos de los períodos 1-2 y 3-4, respectivamente. Al igual que para la BEI, fue necesario realizar previamente un ANAVA con los datos ln-transformados de los parámetros (con período, secuencia y formulación como efectos fijos) al 5% de significación. Se concluyó BEM si el IC 90% de la media geométrica del cociente de los parámetros estudiados se encontraba comprendido entre 80-125%, acorde a lo que establece la autoridad sanitaria de nuestro país.

La determinación del tamaño de muestra se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la FDA (apéndice C de la guía FDA/CDER, 2001). Para ello fue necesario estimar las desviaciones estándar (SD) intra individual y de la interacción Individuo*Formulación a partir de un estudio previo encontrado en bibliografía de BE de PHT en plasma (Schumaker & Metzler, 1998), según el cual ambas SD podían ser razonablemente estimadas como menores a 0,15. Asumiendo lo anterior, se tiene que para un estudio de BEI 4x2 son suficientes 24 voluntarios para proveer a los resultados de una potencia estadística del 80%. Una vez finalizado el estudio, los resultados obtenidos confirmaron que dichas estimas habían sido correctas.

Resultados y discusión

Los parámetros farmacocinéticos promedio obtenidos luego de la administración oral de dos formulaciones de PHT 100 mg cápsulas de liberación inmediata empleando saliva como fluido de análisis se presentan en la Tabla 3-6. Los valores allí incluidos

son el promedio de dos períodos para cada formulación (N = 48). Por otro lado, no se observaron efectos adversos por la medicación administrada a lo largo del estudio. En todos los casos, los interrogatorios realizados a los voluntarios acerca de la aparición de síntomas no habituales luego de cada administración fueron satisfactorios.

Tabla 3-6. Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral de dos formulaciones de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata a 24 voluntarios sanos. Los valores presentados son el promedio de dos períodos para cada producto (en el caso de Tmax se presenta la mediana en vez de la media de manera que el valor informado sea un punto realmente muestreado). SD: desviación estándar

Parámetro	Producto F	Producto G*
Cmax (mg/l)		
<i>Media (SD)</i>	0,205 (0,024)	0,210 (0,026)
<i>Rango</i>	0,138 - 0,239	0,141 - 0,253
Tmax (h)		
<i>Mediana</i>	5,0	4,0
<i>Rango</i>	2,0 - 8,0	2,0 - 6,0
ABC_{0-t} (mg.h/l)		
<i>Media (SD)</i>	3,72 (0,66)	3,74 (0,70)
<i>Rango</i>	2,51 - 5,57	2,55 - 6,04
ABC_{0-inf} (mg.h/l)		
<i>Media (SD)</i>	4,08 (0,91)	4,10 (0,98)
<i>Rango</i>	2,71 - 7,48	2,76 - 8,41
Cmax/ABC_{0-t} (1/h)		
<i>Media (SD)</i>	0,056 (0,008)	0,057 (0,009)
<i>Rango</i>	0,039 - 0,076	0,039 - 0,076
Ke (1/h)		
<i>Media (SD)</i>	0,055 (0,009)	0,056 (0,010)
<i>Rango</i>	0,029 - 0,074	0,028 - 0,076
t_{1/2} (h)		
<i>Media (SD)</i>	12,88 (2,62)	12,81 (2,68)
<i>Rango</i>	9,31 - 24,14	9,34 - 24,97

Las figuras presentadas a continuación muestran los perfiles de concentración vs. tiempo obtenidos para cada una de las especialidades ensayadas. La Figura 3-4 muestra los perfiles agrupados por secuencia (es decir, para cada formulación se promediaron los datos de dos períodos de manera de agruparlos por secuencia -RTTR y TRRT-, N = 24), mientras que la Figura 3-5 muestra los datos promedio de todo el estudio para cada formulación (N = 48).

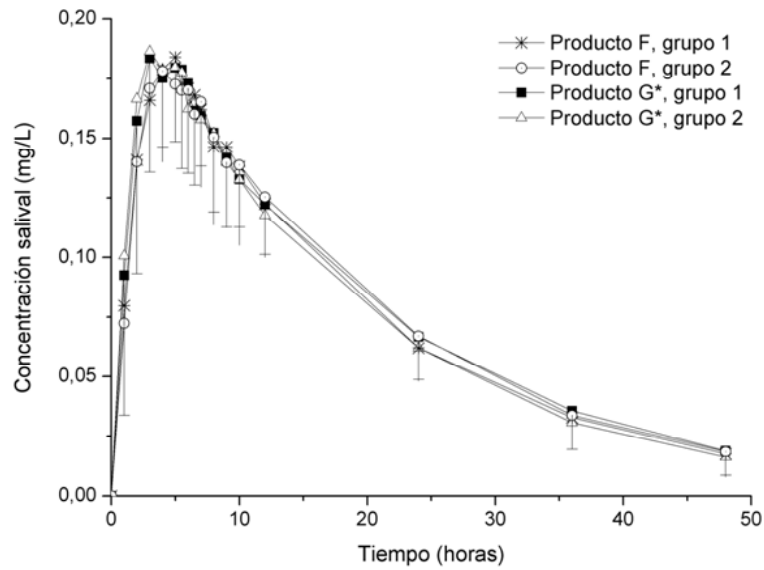


Figura 3-4. Perfiles de concentraciones salivales medias (N = 24) versus tiempo de cada grupo de voluntarios (promedio de dos períodos) luego de la administración oral de los productos F y G*, ambas cápsulas de liberación inmediata conteniendo 100 mg de PHT. Las líneas verticales representan la desviación estándar de las concentraciones medias (sólo se muestra el tramo descendente, con -prod. F- o sin -prod. G- segmento horizontal en el extremo)

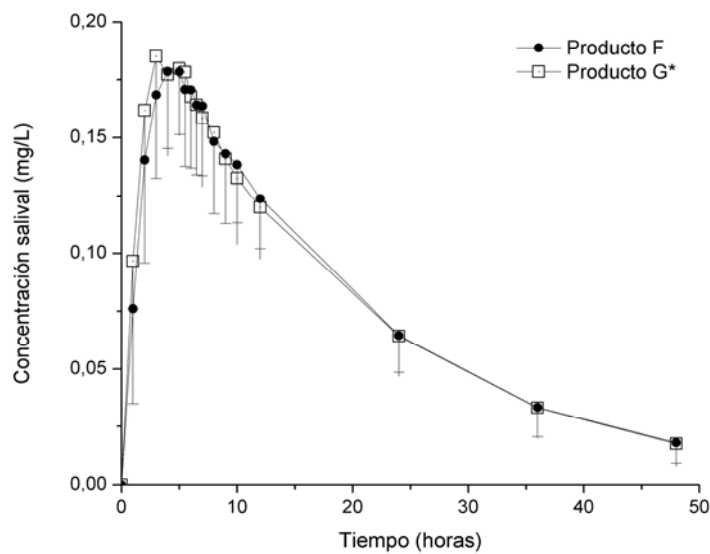


Figura 3-5. Perfiles de concentraciones salivales medias (N = 48) versus tiempo obtenidos para cada una de las dos formulaciones ensayadas (productos F y G*), ambas cápsulas de liberación inmediata conteniendo 100 mg de PHT. Las líneas verticales representan la desviación estándar de las concentraciones medias (sólo se muestra el tramo descendente, con -prod. F- o sin -prod. G*- segmento horizontal en el extremo)

La Tabla 3-7 muestra los valores de las varianzas obtenidas (y entre paréntesis el correspondiente *p-valor*) a partir del ANAVA realizado sobre los datos ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos C_{max} , ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} y C_{max}/ABC_{0-t} . Se observa que los factores considerados no presentaron efectos significativos con excepción del factor formulación, el cual tiene diferencias significativas cuando el parámetro considerado es C_{max} ($p < 0,05$).

Tabla 3-7. Varianzas (*p-valor*) obtenidas mediante el ANAVA de los parámetros farmacocinéticos ln-transformados Cmax, ABC_{0-t}, ABC_{0-inf} y Cmax/ABC_{0-t} resultantes del estudio de BEI realizado. GL: grados de libertad. La varianza correspondiente a la interacción I*F es la estima de σ_i^2 empleada en las ecuaciones de cálculo. Las varianzas intra individuales de las formulaciones T y R se calcularon apartir del ANAVA acorde a la Ecuación 3-9

Fuente de Variación (GL)	Parámetros farmacocinéticos			
	Cmax	ABC _{0-t}	ABC _{0-inf}	Cmax/ABC _{0-t}
Inter individual (23)	0,0606	0,1101	0,1504	0,0613
<i>Dentro de las secuencias (22)</i>	0,0633	0,1150	0,1572	0,0641
<i>Entre las secuencias (1)</i>	0,0029 (>0,05)	0,0003 (>0,05)	0,0006 (>0,05)	0,0013 (>0,05)
Intra individual (72)	0,0026	0,0056	0,0073	0,0065
<i>Entre formulaciones (1)</i>	0,0125 (<0,05)	0,00002 (>0,05)	0,0001 (>0,05)	0,0116 (>0,05)
<i>Entre períodos (3)</i>	0,0059 (>0,05)	0,0006 (>0,05)	0,0017 (>0,05)	0,0075 (>0,05)
<i>Individuo*formulación (22)</i>	0,0028 (>0,05)	0,0042 (>0,05)	0,0054 (>0,05)	0,0046 (>0,05)
<i>Residual (46)</i>	0,0022	0,0067	0,0087	0,0072
ANAVA-CV%	4,62	8,22	9,34	8,52
<i>Varianza Intra Individual de T ($\sigma_{T,intra}^2$)</i>	0,00255	0,00740	0,00892	0,00764
<i>Varianza Intra Individual de R ($\sigma_{R,intra}^2$)</i>	0,00171	0,00565	0,00763	0,00610

Los resultados de los tres estudios de BEM realizados (con todos los datos promediados entre períodos, con los datos de los períodos 1 y 2 solamente y con los datos de los períodos 3 y 4 solamente) se presentan en la Tabla 3-8, en la tercera, cuarta y quinta columna, respectivamente. La tabla incluye los valores de la media geométrica del cociente F/G* de cada parámetro considerado y el IC 90%. Se puede ver que en todos los casos dichos intervalos se encuentran comprendidos dentro del rango 80-125%, por lo que se concluye BE entre las formulaciones F y G por cualquiera de las tres BEM realizadas.

Tabla 3-8. Análisis de Bioequivalencia. Se presenta la media geométrica de los cocientes F/G* de los parámetros farmacocinéticos estudiados y sus respectivos IC 90%

Parámetro Farmacocinético	BE Individual: todos los datos (N = 48)	BE Media con el promedio de todos los datos (N = 24)	BE Media con los datos de los períodos 1 & 2 (N = 24)	BE Media con los datos de los períodos 3 & 4 (N = 24)
Cmax				
<i>Cociente T/R</i>	0,9774	0,9774	0,9817	0,9731
<i>IC 90%</i>	95,53 - 100,01	95,30 - 100,25	94,51 - 101,98	94,00 - 100,74
ABC_{0-t}				
<i>Cociente T/R</i>	0,9991	0,9991	0,9686	1,0305
<i>IC 90%</i>	95,93 - 104,06	96,76 - 103,16	92,26 - 101,70	98,52 - 107,79

ABC_{0-inf}				
Cociente T/R	1,0021	1,0021	0,9641	1,0416
IC 90%	95,68 - 104,65	96,63 - 103,92	91,23 - 101,88	98,81 - 109,79
Cmax/ABC_{0-t}				
Cociente T/R	0,9783	0,9783	1,0135	0,9443
IC 90%	93,79 - 102,04	94,61 - 101,16	95,57 - 107,48	91,07 - 97,91

El análisis de BEI fue escalado a una constante en todos los casos, ya que se verificó que $\sigma_{WR} \leq \sigma_{W0}$ para todos los parámetros farmacocinéticos considerados (Cmax, ABC_{0-t}, ABC_{0-inf} y Cmax/ABC_{0-t}). En la Tabla 3-9 se presentan los cálculos correspondientes al estudio de BEI: estimación de la diferencia media entre los productos F y G* –de los parámetros ln-transformados–, la varianza de la interacción Individuo*Formulación, la varianza intra individual de cada formulación, las especificaciones utilizadas para σ_{W0}^2 y θ_p , la estima de η_2 y el límite superior de su IC 95%.

Tabla 3-9. Análisis de BEI. Para cada parámetro farmacocinético (ln-transformado) se presentan los valores de la diferencia media entre los productos F y G*, la varianza de la interacción individuo*formulación, la varianza intra individual de cada formulación, la estima de η_2 y el límite superior de su IC 95%

	Cmax	ABC_{0-t}	ABC_{0-inf}	Cmax/ ABC_{0-t}
Estima de $(\mu_T - \mu_R)^2$ (diferencia de las medias ln-transformadas de T y R)	5,21.10 ⁻⁴	7,99.10 ⁻⁷	4,35.10 ⁻⁶	4,81.10 ⁻⁴
Estima de σ_I^2 (varianza por la interacción I*F)	0,00262	0,00417	0,00539	0,00456
Estima de $\sigma_{R,intra}^2$ (varianza intra individual de la Referencia, G*)	0,00171	0,00565	0,00763	0,00610
Estima de $\sigma_{T,intra}^2$ (varianza intra individual del Test, F)	0,00255	0,00740	0,00891	0,00734
Estima de η_2 (estima puntual del criterio lineal de BEI escalado a una constante)	-0,09795	-0,10041	-0,10140	-0,10024
Límite superior del IC 95% de η_2	-0,09545	-0,09510	-0,09456	-0,09462

A partir de la tabla anterior se concluye BEI entre las dos formulaciones estudiadas, ya que el límite superior del IC 95% de la estima η_2 fue menor a cero para todos los parámetros farmacocinéticos considerados.

Extensas discusiones, aunque principalmente teóricas, se han sostenido acerca de si los estudios de BEI eran o no necesarios, como así también en qué casos lo eran, qué criterio o especificación debía ser adoptado (escalado o no), el método de cálculo (basado en momentos estadísticos o en probabilidades), limitaciones, ventajas y desventajas (Benet, 1999; Endrenyi & Midha, 1998). Sin embargo, la mayoría de los autores coincidió en la propuesta de aplicar estudios de BEI en aquellos casos en los que se espera una interacción I*F significativa (como sucede con los productos de liberación prolongada) y/o en el caso de formulaciones que contienen principios activos “críticos” (drogas altamente variables y/o de estrecho margen terapéutico) tales como Warfarina, Carbamazepina y Fenitoína (Anderson & Hauck, 1990; Schall & Williams, 1996), e in-

cluso apareció una guía de la FDA que contempla este diseño con gran detalle (FDA/CDER, 2001). Una droga se considera altamente variable cuando el coeficiente de variación (CV) calculado a partir del ANAVA es $\geq 30\%$ (Endrenyi & Midha, 1998).

Por lo tanto, la PHT ha sido siempre considerada como candidata para estudios de BEI, y por ello fue la droga empleada en esta sección. Y más aún, como nuestro estudio fue realizado con saliva como fluido biológico, podía esperarse una mayor variabilidad de los datos. Sin embargo, trabajando según el diseño cruzado descrito y luego del cálculo de la variabilidad intra individual de cada formulación, como así también de la interacción I*F, se encontró que los CV obtenidos fueron menores al 30% (calculados a partir del error residual del ANAVA correspondiente, ver Tabla 3-7) para todos los parámetros farmacocinéticos considerados. Incluso las variabilidades intra individuales fueron similares para las formulaciones Test y Referencia, y la interacción I*F no fue significativa (ver Figura 3-6). Matemáticamente, esto se tradujo en una simplificación de la Ecuación 3-1 y/o la Ecuación 3-2, las que se convirtieron en las ecuaciones de BEM. Por lo tanto, en nuestro estudio la BE se demostró tanto mediante los cálculos correspondientes a la BEI como así también por las tres BEM realizadas.

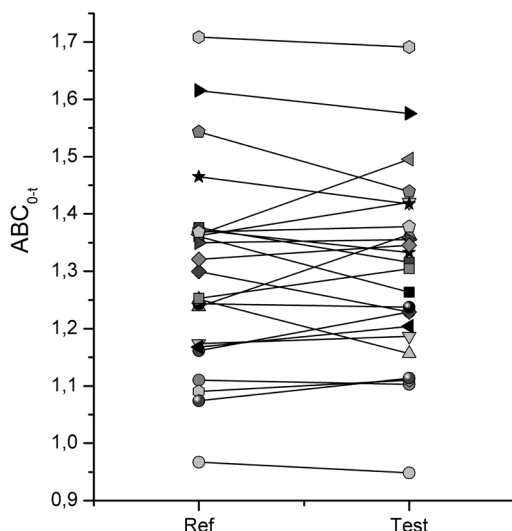


Figura 3-6. Gráfico de la respuesta media obtenida (el parámetro elegido fue ABC_{0-t}) para cada formulación. Cada segmento del gráfico representa un individuo y se promediaron los valores de las dos administraciones de R y T. El efecto conocido como interacción I*F se observa gráficamente como líneas que se cruzan, ya que eso significa que no todos los individuos reaccionan de igual manera (o en igual "sentido") con R y T. En nuestro ejemplo, sin embargo, la interacción no fue estadísticamente significativa

Estos resultados son coherentes con los de Schumaker y Metzler (Schumaker & Metzler, 1998), ya que en su trabajo la PHT tampoco se comportó como altamente variable ($CV < 20\%$ para C_{max}) y no se encontró un efecto significativo para la interacción I*F, por lo que la BE entre las dos formulaciones estudiadas fue demostrada por las dos metodologías aplicadas: BEM y BEI. Se pueden encontrar en bibliografía otros ejemplos de esta situación para otras drogas (Christians et al., 2000; Joukhadar et al., 2003; Yacobi et al., 2000), si bien los estudios experimentales de BEI no abundan, posiblemente porque ninguna autoridad sanitaria los ha exigido hasta el momento.

Como se mencionó al inicio de este ensayo, las dos formulaciones de PHT 100 mg, cápsulas de liberación inmediata estudiadas, eran las únicas dos disponibles en el mercado farmacéutico argentino al momento del inicio del estudio, y ninguna de ellas es el producto que ANMAT establece como referencia para los estudios de BE de formulaciones de PHT liberación inmediata. Sin embargo, ambas formulaciones son consideradas BE por los profesionales de la salud, ya que han demostrado ser BE al mismo producto de referencia. Esta situación, denominada “Principio de Transitividad” (presentada en el Capítulo 1 y sobre la que se discutirá con más detalle en el Capítulo 5), suele ser erróneamente asumida como válida a pesar de que se ha demostrado que este principio no siempre se aplica (Anderson & Hauck, 1996; Benet & Goyan, 1995; Midha et al., 1998). En este caso particular, sin embargo, los resultados apoyan al mencionado principio: los productos cuya BE fue probada contra una misma referencia, fueron BE entre sí, aunque no debemos olvidar que se trata de cápsulas, que suelen presentar menores problemas de BD (y por lo tanto mayores probabilidades de declarar BE) que los comprimidos.

Por otro lado, los resultados presentados son coherentes con estudios previamente publicados en los que se emplea plasma como fluido biológico (Melikian et al., 1977; Schumaker & Metzler, 1998), lo que sugiere que la saliva es un fluido comparable al plasma en cuanto a su aplicación en estudios de BDR de PHT. El Capítulo 6 está dedicado precisamente a esto, es decir, a la idoneidad de la saliva como fluido monitoreado durante estudios de BDR. Creemos que la saliva no sólo es apta para su uso en esta clase de estudios, sino que incluso puede resultar de elección, debido a que provee información análoga pero con grandes ventajas analíticas y éticas respecto al plasma.

3.3 Simulaciones de estudios de BEM vs. BEI

Descripción y objetivos

Se realizaron simulaciones por computadora de estudios de BEM y BEI tomando a PHT como droga modelo, de manera de poder estudiar el desempeño de ambos diseños en función de la modificación de dos variables: la biodisponibilidad relativa de las formulaciones ensayadas y la variabilidad intra individual de la droga contenida en dichas formulaciones. El objetivo fue determinar si la BEI presenta ventajas significativas respecto a la BEM a la hora de garantizar la intercambiabilidad entre dos medicamentos.

● Diseño del estudio

Las simulaciones se llevaron a cabo con el programa Microsoft Office Excel 2007. Solamente se simuló el parámetro farmacocinético área bajo la curva (ABC), debido a su facilidad de cálculo y a que el mismo era suficiente para ejemplificar las situaciones estudiadas. En todos los casos ensayados se consideraron 24 voluntarios sanos.

En primer lugar, el programa simula las constantes farmacocinéticas volumen de distribución (V_d) y constante de eliminación (K_e) de los voluntarios mediante números aleatorios (número real entre 0 y 1) generados al azar por el programa, a partir de los valores bibliográficos de las constantes y de sus variaciones habituales. También se simulan los valores de biodisponibilidad (F) de cada formulación en cada voluntario: en cada uno de los distintos escenarios estudiados, los valores de F para cada producto

(F_T y F_R) se aleatorizaron alrededor de diferentes números (por ejemplo, en el primer escenario ambos valores se variaron en torno a 1, es decir, ambos productos se absorbían totalmente, mientras que en otro caso se asignó el valor 1,05 a F_T , para estudiar el efecto de una variación del 5% en el cociente, y así sucesivamente). Cada voluntario quedaba descrito entonces como un conjunto de valores V_d , K_e , F_R y F_T .

Una vez que el programa asignaba valores aleatorios a las constantes descriptas, se calculó el ABC_R y ABC_T de acuerdo a $ABC = F \cdot D / V_d \cdot K_e$, donde D representa la dosis (igual a 100 mg en todos los casos) y F es el valor de F_R o F_T que el programa haya asignado a ese voluntario. Como se simuló un diseño replicado (cada voluntario recibe dos veces cada formulación), el segundo valor de ABC_R y ABC_T se generó a partir del primero, por asignación de distintas variabilidades intra individuales (factor que se quería estudiar). La Figura 3-7 presenta a continuación un ejemplo de la tabla obtenida en cada una de las simulaciones. Como la función "aleatorio" devuelve un número real nuevo cada vez que se actualiza la hoja de cálculo (ejecutando cualquier comando), simplemente con presionar una tecla se obtiene una nueva tabla, lo que equivale a un nuevo estudio de BE.

Por último, se obtuvieron los logaritmos naturales de las cuatro columnas finales (ABC de cada formulación en cada administración) y con los datos así transformados se calcularon los ANAVA y las BE media e individual correspondientes a cada tabla generada (en el caso de la BEM, se utiliza el promedio de los dos datos de área para cada voluntario, como si fuera una administración única).

Voluntarios	Simulados alrededor de un valor arbitrario (variable a estudiar)				D	Valores calculados según $=F_x \cdot D / V_d \cdot K_e$				
	Valores simulados a partir de datos poblacionales	V_d	K_e	F_R		F_T	ABC_{R1}	ABC_{R2}	ABC_{T1}	ABC_{T2}
1		48,963	0,070	0,731	1,008	100	21,22	18,641	29,24	12,821
2		74,418	0,040	1,081	1,079	100	35,95	39,525	35,91	18,642
3		96,084	0,050	0,847	1,021	100	17,59	14,461	21,20	18,695
4		56,885	0,032	1,024	0,855	100	56,22	52,772	46,97	52,568
5		58,571	0,062	0,954	0,830	100	26,12	24,272	22,73	20,145
...	
22		96,216	0,071	1,038	0,909	100	15,19	21,495	13,31	8,890
23		63,781	0,058	0,980	0,741	100	26,70	25,862	20,18	23,956
24		94,736	0,052	0,726	0,879	100	14,80	11,365	17,91	9,946

Valores simulados a partir de datos poblacionales

Calculados a partir de ABC_{x1} por asignación de una varianza intra individual arbitraria (variable a estudiar)

Figura 3-7. Tabla obtenida durante las simulaciones. Cada fila representa un voluntario, determinado por un conjunto de valores V_d , K_e , F_R y F_T . La función "aleatorio" es un número entre 0 y 1 generado al azar por el programa. En el caso de la fórmula de cálculo de ABC_{R1} y ABC_{T1} , la constante F_x denomina al valor alrededor del cual se hizo la simulación (1/1, 0,9/1, etc.).

● Valores empleados

■ **Volumen de distribución (Vd):** en función de la información encontrada en bibliografía, se asigna al Vd de PHT el valor de $0,90 \pm 0,20$ l/kg (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004), lo que corresponde a asignarle un CV de 22,2% ($CV = (s/\mu) \cdot 100$). El IC 95% de un valor individual:

$$IC95\% = \bar{X} \pm z \cdot s \Rightarrow \left[1 \pm \frac{z \cdot CV}{100} \right] \cdot \bar{X}$$

$$\left[1 \pm \frac{1,96 \cdot 22,2}{100} \right] \cdot 0,90 \cong [0,6 - 1,4] \cdot 0,90$$

Por lo tanto, existe el 95% de probabilidades de que un valor de Vd caiga en dicho intervalo. Para generar un número real y aleatorio entre dos números a y b la fórmula que debe introducirse al programa es:

$$=ALEATORIO() \cdot (b-a) + a$$

En nuestro caso:

$$=(ALEATORIO() \cdot 0,8 + 0,6) \cdot 0,90 \cdot 70$$

Se multiplica por 70 kg ya que los valores bibliográficos empleados estaban referidos a 1 kg de peso, y se toman 70 kg como el peso de un individuo promedio.

■ **Constante de eliminación (Ke):** los valores bibliográficos que se pueden encontrar para la semivida de PHT varían considerablemente, ya que por su cinética saturable a altas dosis disminuye la eliminación y por lo tanto se disparan los valores de $t_{1/2}$. Es por ello que utilizamos el rango 10-16 horas, el que resulta adecuado para un estudio donde se trabaja muy por debajo de la concentración plasmática de saturación de PHT. Esos valores de $t_{1/2}$ corresponden a un valor poblacional de Ke de $0,055 \pm 0,011$ 1/h (coherente con el informado en el ensayo anterior, ver Tabla 3-6).

Siguiendo el mismo razonamiento aplicado para Vd, el IC 95% correspondiente es:

$$\left[1 \pm \frac{1,96 \cdot 20,0}{100} \right] \cdot 0,055 \cong [0,6 - 1,4] \cdot 0,055$$

Y la fórmula introducida en el programa:

$$=(ALEATORIO() \cdot 0,8 + 0,6) \cdot 0,055$$

■ **Área bajo la curva (ABC):** las ABC, tanto del producto T como del producto R, se calcularon de la siguiente manera (la dosis se fijó en 100 mg en todos los casos):

$$ABC_R = \frac{F_R \cdot Dosis}{Vd \cdot Ke} \quad y \quad ABC_T = \frac{F_T \cdot Dosis}{Vd \cdot Ke}$$

Estas fórmulas son válidas para drogas de farmacocinética lineal (es decir, aumento monótono de ABC en función de la dosis). A pesar de la cinética saturable de PHT, en concentraciones menores a 10 mg/l se puede aproximar linealidad. La Tabla 3-6 muestra que los valores de Cmax obtenidos en saliva luego de la administración de una dosis única de 100 mg de PHT no superaron nunca los 0,21 mg/l. Suponiendo una relación Plasma/Saliva de PHT igual a 10 (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004), ese valor equivale a una concentración plasmática máxima de 2,1 mg/l, por lo que es correcta la aproximación lineal utilizada.

■ Biodisponibilidad (F): ésta es una de las variables que se desea estudiar, y por lo tanto le fueron asignados distintos valores a la F de cada formulación en los distintos escenarios planteados. Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Producto Test:} \quad =(\text{ALEATORIO}) * 0,3 + 0,7 * F_T$$

$$\text{Producto Ref.:} \quad =(\text{ALEATORIO}) * 0,3 + 0,7 * F_R$$

De esa manera, los valores generados nunca superan la unidad y tienen un CV = 10%.

Escenario 1: Dos productos con igual biodisponibilidad ($F_T = F_R = 1$)

Escenario 2: Diferencia T-R del 5% ($F_T = 0,95$ y $F_R = 1$)

Escenario 3: Diferencia T-R del 10% ($F_T = 0,90$ y $F_R = 1$)

Escenario 4: Diferencia T-R del 15% ($F_T = 0,85$ y $F_R = 1$)

■ Varianza Intra Individual (σ_{intra}^2): ésta es la otra variable que se desea estudiar, y por lo tanto le fueron asignados distintos valores a la σ_{intra}^2 de cada formulación en los distintos escenarios planteados. Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Producto Test:} \quad ABC_{T2} = (\text{ALEATORIO}) * X_1 + X_2 * ABC_{T1}$$

$$\text{Producto Ref.:} \quad ABC_{R2} = (\text{ALEATORIO}) * X_1 + X_2 * ABC_{R1}$$

De esa manera, para simplificar los cálculos, se asigna igual σ_{intra}^2 a ambas formulaciones (propiedad del principio activo). En cada uno de los cuatro escenarios descriptos anteriormente, se simularon a su vez las siguientes sub-situaciones:

$$\sigma_{intra}^2 = 10\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 0,4 \text{ y } X_2 = 0,8$$

$$\sigma_{intra}^2 = 15\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 0,6 \text{ y } X_2 = 0,7$$

$$\sigma_{intra}^2 = 20\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 0,8 \text{ y } X_2 = 0,6$$

$$\sigma_{intra}^2 = 25\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 1,0 \text{ y } X_2 = 0,5$$

$$\sigma_{intra}^2 = 30\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 1,2 \text{ y } X_2 = 0,4$$

$$\sigma_{intra}^2 = 35\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 1,4 \text{ y } X_2 = 0,3$$

$$\sigma_{intra}^2 = 40\%: \text{ En ese caso, } X_1 = 1,6 \text{ y } X_2 = 0,2$$

Por último, y antes de pasar a los resultados, cabe destacar que el objetivo de estas simulaciones no estuvo centrado en la exactitud de los resultados (obtención de valores de ABC idénticos a los reales), sino en el estudio del método de cálculo, es decir, en cómo se modifica la conclusión de BEM y BEI en función del cociente de las medias geométricas del parámetro farmacocinético evaluado para ambos productos (T/R) y de la varianza intra individual de la droga en estudio. Sin embargo, los valores de ABC generados durante nuestras simulaciones fueron extremadamente similares a valores reales informados en la literatura (Melikian et al., 1977).

Resultados y discusión

La Tabla 3-10 muestra de manera resumida los resultados obtenidos en los estudios de BE simulados según la metodología descrita (para cada relación T/R ensayada se realizaron 100 simulaciones por cada una de las varianzas intra individuales estudiadas).

Tabla 3-10. Resultados de las simulaciones (n=100 en cada caso). Se presentan, para cada uno de los escenarios de T/R ensayados, los valores medios (y el rango entre corchetes) del cociente T/R, el CV del ANOVA correspondiente a la BEM y los CV intra individuales de ambas formulaciones calculados durante la BEI. También se informa el número de ensayos donde se concluyó BE (BEM y BEI, esta última escalada a una constante o a la referencia [cte/ref])

	Varianza intra individual asignada (CV%)						
	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
T/R (1/1)	1,010 [0,91-1,08]	1,005 [0,93-1,11]	1,010 [0,92-1,08]	0,995 [0,85-1,09]	1,009 [0,90-1,16]	1,011 [0,82-1,12]	0,998 [0,86-1,16]
CV BEM	11,53 [6,5-15,9]	13,25 [8,6-17,6]	15,05 [11,4-20,6]	17,46 [13,2-24,9]	20,38 [14,7-25,5]	22,13 [15,8-32,4]	26,78 [21,6-38,3]
CV intra-R	8,21 [6,0-10,3]	12,53 [9,6-15,4]	17,30 [14,0-20,9]	21,82 [17,0-26,1]	28,10 [19,8-34,5]	33,60 [23,2-43,1]	41,79 [25,1-50,6]
CV intra-T	8,29 [5,3-10,4]	12,49 [8,6-15,7]	17,06 [12,9-20,9]	21,93 [14,2-27,8]	26,82 [20,0-33,7]	33,18 [22,4-45,2]	41,12 [28,8-54,0]
BEM	100	100	100	99	95	88	85
BEI	100/2	99/10	92/45	71/64	40/80	33/81	8/83
T/R (0,95/1)	0,954 [0,86-1,02]	0,957 [0,89-1,03]	0,955 [0,84-1,05]	0,958 [0,86-1,09]	0,950 [0,86-1,08]	0,965 [0,80-1,11]	0,956 [0,81-1,18]
CV BEM	11,44 [8,4-15,8]	13,22 [10,2-16,1]	15,26 [9,7-18,4]	17,30 [11,8-24,9]	20,78 [15,3-26,2]	22,62 [14,4-31,7]	26,87 [21,1-38,4]
CV intra-R	8,08 [5,0-9,8]	12,32 [9,9-14,5]	17,14 [12,4-21,6]	21,65 [16,2-27,3]	27,09 [16,6-34,3]	32,82 [21,6-42,5]	41,51 [25,5-53,9]
CV intra-T	8,28 [6,1-10,3]	12,36 [10,0-15,1]	17,14 [13,5-21,3]	21,51 [16,0-26,8]	27,26 [21,0-39,2]	32,51 [22,2-41,2]	41,42 [23,9-53,4]
BEM	100	100	98	95	92	81	73
BEI	100/1	100/12	85/41	65/64	32/75	24/79	7/85
T/R (0,90/1)	0,899 [0,84-0,96]	0,898 [0,83-0,98]	0,890 [0,80-1,00]	0,907 [0,76-1,00]	0,906 [0,79-1,06]	0,889 [0,80-1,02]	0,910 [0,74-1,05]
CV BEM	11,35 [7,9-15,0]	13,43 [8,9-18,8]	15,56 [11,6-19,4]	18,20 [13,6-24,8]	20,07 [15,3-27,2]	23,54 [17,1-31,4]	26,06 [16,1-32,6]
CV intra-R	8,54 [6,3-11,4]	12,19 [9,4-16,1]	16,42 [12,8-20,7]	22,33 [15,7-28,6]	27,02 [16,2-33,3]	32,96 [21,7-43,1]	40,91 [30,2-52,8]
CV intra-T	7,96 [6,4-9,4]	12,13 [9,6-15,7]	17,15 [12,3-20,5]	21,87 [16,1-27,1]	27,94 [21,8-35,8]	33,99 [23,3-43,2]	40,01 [27,4-48,9]
BEM	98	88	82	75	67	39	45
BEI	100/2	98/2	71/23	53/51	35/70	12/67	11/79
T/R (0,85/1)	0,851 [0,78-0,91]	0,846 [0,77-0,90]	0,850 [0,78-0,92]	0,861 [0,75-1,01]	0,850 [0,76-0,99]	0,858 [0,77-0,98]	0,859 [0,71-1,02]
CV BEM	11,93 [8,7-15,2]	13,19 [10,1-17,9]	15,31 [12,1-19,3]	17,63 [12,1-25,7]	20,08 [14,7-26,1]	23,63 [18,0-30,9]	26,26 [19,1-40,9]
CV intra-R	8,24 [7,1-9,6]	12,20 [9,0-15,8]	17,05 [11,8-22,1]	21,68 [17,2-28,2]	27,38 [20,2-33,0]	33,56 [22,3-44,3]	42,46 [30,6-53,9]
CV intra-T	8,33 [6,7-9,6]	12,24 [9,0-15,1]	16,68 [12,2-21,3]	21,89 [14,9-29,1]	26,81 [18,9-35,3]	34,01 [23,1-43,9]	40,64 [27,1-54,5]
BEM	62	56	38	44	20	26	16
BEIcte/ref	90/0	70/0	60/20	58/36	24/66	12/76	10/84

La Figura 3-8 grafica los resultados de la tabla anterior. Cada relación R/T ensayada se presenta como un gráfico diferente, mientras que los CV intra individuales constituyen el eje x. En cada caso, se presenta el número de ensayos “positivos” (es decir, en los que se concluye BE entre R y T) según las tres metodologías de BE: BEI escalada a una constante (gris más claro, en el frente), BEI escalada al producto de referencia (gris intermedio) y BEM (gris oscuro, detrás).

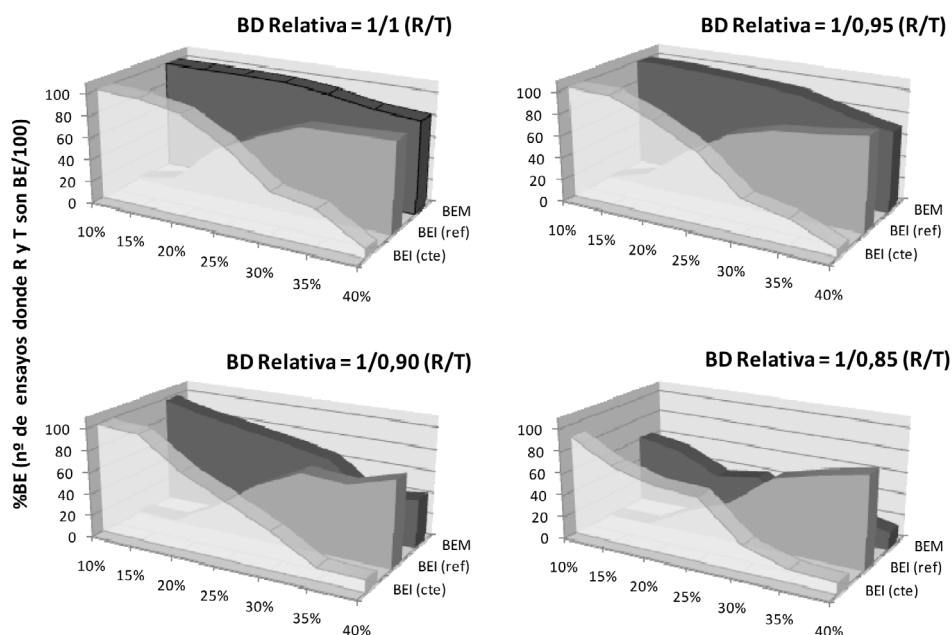


Figura 3-8. Comportamiento de los diferentes estudios de BE (BEM en gris oscuro, BEI escalada a una constante –gris más claro– y a la referencia –gris intermedio–) en función del coeficiente de variación intra individual de la droga ensayada (eje x) y de las distintas relaciones de BD R/T (cada una en un gráfico diferente). El eje y representa el número de ensayos donde se concluye BE entre los productos ensayados (sobre un total de 100 en todos los casos)

Si nos detenemos en el gráfico correspondiente a una BDR del 100% ($R/T = 1/1$ en la Figura 3-8), observamos que:

- cuando el CV de la droga es bajo ($CV \leq 20\%$), se concluye BEI (con el criterio escalado a una constante) prácticamente en el mismo número de casos que BEM;
- cuando el CV de la droga es alto ($CV \geq 30\%$) sucede lo mismo, pero empleando el criterio de BEI escalado a la referencia en vez de a una constante ($BEI_{(ref)}$ en el gráfico);
- en la zona de CV entre 20% y 30% es donde se producen las mayores discrepancias: mientras que en dicha zona se concluye BEM en casi el 100% de los casos, hay una región donde ninguno de los dos criterios de BEI da positivo (en aproximadamente el 30% de los casos).

Por otro lado, en la Figura 3-8 también se observa que a medida que la BDR entre los productos R y T se aleja de la unidad las tendencias descritas anteriormente se mantienen, si bien disminuye el número total de casos donde se logra concluir BE entre R y T (disminución en el eje vertical). Esta disminución, a su vez, es más pronunciada para la BEM, por lo que cuando los productos comienzan a diferir más en su BD es más probable concluir BEI que BEM, y esto es más pronunciado a su vez a mayores CV (si recordamos la Ecuación 3-1, el criterio de la BEM recae exclusivamente en la diferencia de medias). El resultado es que, a mayores diferencias entre la BD de R y T, la BEM se convierte en una prueba más exigente que la BEI, y *mucho* más exigente en el caso de CV elevados.

Queda por establecer qué sucede en la región de CV intermedios. Para ello vamos a analizar el caso de $CV = 25\%$, ya que como se ve en las Figuras 3-8 y 3-9, alrededor de dicho valor es donde se observan las mayores discrepancias entre los resultados de BEM y BEI. La guía de la FDA establece que cuando el CV es cercano al valor de cambio de criterio (20%) pueden ensayarse ambos tipos de escalado (FDA/CDER, 2001). Por lo tanto, vamos a analizar los casos en los que ninguno de los dos criterios permite concluir BEI, mientras que sí se concluye BEM.

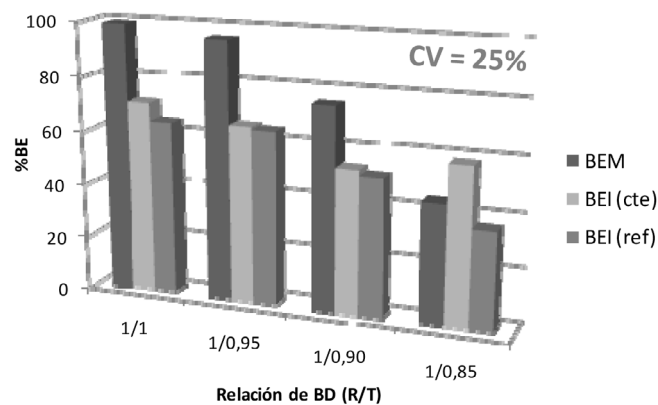


Figura 3-9. Resultados positivos de BEM, BEI-cte y BEI-ref en función del cociente R/T, cuando la varianza intra individual de la droga se fija en 25%. En la Figura 3-8 se veía que alrededor de $CV=25\%$ se producían las mayores discrepancias entre los resultados de BEM vs. BEI. Aquí se observa que dichas discrepancias son aún mayores –y prácticamente iguales– para los casos en los que R/T se fija en 1/1 y 1/0,95

Dichos casos se presentan en la Figura 3-10. Allí se analizan las posibles causas por las que no se concluye BEI en aquellos casos en los que sí se concluyó BEM, en los escenarios representados por $R/T = 1/1$ y $1/0,95$ (ya que esos dos son aquellos que presentaron las mayores discrepancias entre BEM y BEI, como se veía en la Figura 3-9). Puede observarse que en aproximadamente el 80% de los casos donde no se concluye BEI pero sí BEM se debe a la situación en la cual el CV del producto T es mayor al de R. Esto no sería correcto porque si el CV de R es mayor al de T en igual proporción sí se puede concluir BEI. Y si pensamos en lo verdaderamente importante, los cambios que el paciente puede sufrir cuando intercambia T por R o R por T, resulta indistinto cuál de los dos productos tiene la mayor variación.

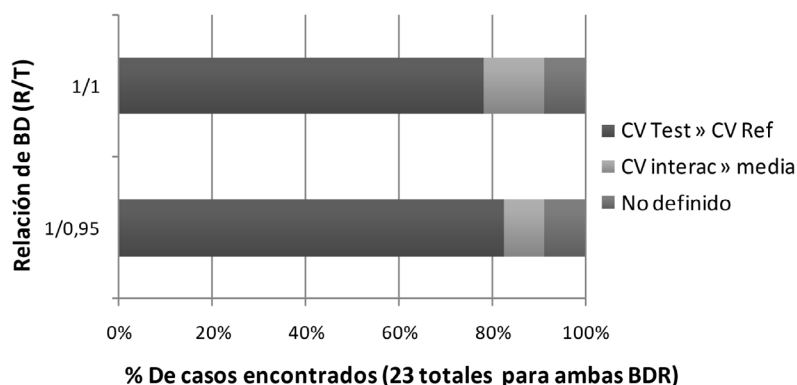


Figura 3-10. Análisis de las posibles causas de discrepancia entre los estudios de BEM vs. BEI. Se analizan los resultados donde se concluye BEM pero no BEI (en ninguno de los dos casos de escalado posible), para las relaciones R/T de 1/1 y 1/0,95 (donde las diferencias eran mayores y casi iguales). El eje de abscisas representa el porcentaje de dichos casos que pueden atribuirse a los motivos representados con diferentes tonos de gris

La otra causa que produce la falta de BEI en nuestras simulaciones es una varianza debida a la interacción I*F por encima de la media, en aproximadamente el 9-14% de los casos. Debido a la metodología de las simulaciones, la interacción I*F queda determinada al azar, lo que en la realidad no sucede, ya que en los casos en los que verdaderamente existe dicha interacción ésta tiene un sentido determinado. Se han reportado, por ejemplo, interacciones del tipo raza*formulación o edad*formulación. Sin embargo, existe consenso en la literatura en cuanto a que la interacción I*F no suele ser importante para las formas de liberación inmediata, y que por el contrario tiene tendencia a ocurrir en el caso de productos de liberación modificada (Chen & Lesko, 2001).

La interacción I*F puede interpretarse como el hecho de que el efecto observado por la formulación es afectado por el individuo, es decir, para algunos individuos $R > T$ mientras que para otros, $T > R$. El análisis de la influencia de esa situación en la intercambiabilidad no es sencillo, pero lo que sí se observa fácilmente es que dicho factor sólo toma preponderancia en el resultado cuando los demás son elevados, lo que dicho de otro modo significa que cuando la BDR es cercana a la unidad y las varianzas bajas, se pueden presentar valores elevados de I*F y aun así cumplir con el ensayo de BEI.

Si, como se dijo anteriormente, consideramos incorrecto penalizar que el producto Test tenga mayor varianza que R (en una proporción que si se invirtiera permitiría concluir BEI), las discrepancias entre BEM y BEI se reducen al 6%. De ellas, aproximadamente la mitad corresponde a una I*F elevada, aunque con valores que serían permitidos si el cociente R/T o las varianzas fueran menores. Por lo tanto, en nuestro modelo simulado sólo existe un 3% de discrepancias reales e injustificadas entre BEM y BEI (sin explicación clara, tal vez debidas a una sumatoria de pequeños efectos).

No se puede dejar de reconocer que los resultados discutidos hasta aquí provienen de simulaciones, por lo que es posible que los porcentajes mencionados se modifiquen en la realidad. Sin embargo, creemos que lo discutido acerca de las tendencias de los resultados de estudios de BEM y BEI continuaría siendo válido. Una prueba de esto es que los estudios de BEI han sido propuestos como alternativa a los estudios de BEM en el caso de (Schall & Endrenyi, 2010):

- fármacos con cinéticas altamente variables (FAVs), es decir, cuya varianza intra individual supera el 30%;
- fármacos de estrecho margen terapéutico (FEMTs).

Como se señaló al inicio de este capítulo, al principio fueron pensados para asegurar la intercambiabilidad de medicamentos durante un tratamiento (independientemente de la droga en cuestión), pero paulatinamente se abandonó la idea de su aplicación en general para comenzar a proponerlos como alternativa en los dos casos recién mencionados, donde se pensaba que los estudios de BEM fallaban (por resultar muy exigentes o muy permisivos, respectivamente).

Por lo tanto, limitaremos el resto de nuestro análisis a estas dos situaciones. En la primera, y acorde a lo discutido hasta aquí, la recomendación de BEI sobre BEM es en realidad favorable al fabricante: en la zona de altas variabilidades intra individuales es más probable concluir BEI-ref que BEM. En este caso, el interés ya no está centrado en la seguridad del paciente sino en la facilitación experimental de la prueba: no es ético ni viable trabajar con un número excesivo de voluntarios. En la segunda situación, es decir, para productos conteniendo FEMTs, la recomendación de BEI surgió como un intento de ofrecer mayor seguridad a los pacientes que potencialmente intercambiarían los productos T y R.

Sin embargo, la BEI no fue la única alternativa para abordar las dos situaciones anteriores, también existieron otras propuestas, siendo la principal de ellas continuar con la BEM pero modificando los límites de aceptación, tanto de manera prefijada (más estrechos para FEMTs y más laxos para FAVs) como “escalada” a cierta varianza. Surge así la idea de “escalar” el criterio de la BEM: aplicar un algoritmo que modifique estos límites en función de la varianza intra individual de la droga.

El concepto de “escalado” surgió de la observación de las ecuaciones de BE (tanto BEM como BEI): cuanto menor era la variabilidad en las mismas, más alejado de la unidad podía estar el cociente de medias y aún cumplir con los requisitos de BE. A raíz de ello, Schall y Williams (Schall & Williams, 1996) clasificaron a los principios activos según su variabilidad intra individual y su rango terapéutico. De esa manera, se formaban cuatro categorías, como se ve en la Figura 3-11:

		Variabilidad intra individual			
		Baja	Alta		
Toxicidad	Baja	Sin escalar	Escalado	Amplio	Margen Terapéutico
	Alta	Escalado	Sin escalar		

■ **Figura 3-11.** Esquema de la clasificación de drogas propuesta por Schall y Williams en 1996, en función de la variabilidad intra individual y el margen terapéutico de las mismas (Schall & Williams, 1996)

Se sugería que para FEMTs el procedimiento para establecer la BE entre formulaciones debía ser más exigente que el comúnmente aplicado. Por lo tanto, proponían escalar los cálculos si la variabilidad era baja o no escalarlos si era alta. De esa manera, el criterio se vuelve más estricto para drogas de baja variabilidad y permanece constante para FAVs. Por el contrario, en el caso de principios activos de baja toxicidad y amplio

margen terapéutico el razonamiento era a la inversa: sólo se aplicaría el escalado en el caso de FAVs, de manera de flexibilizar el criterio y aumentar así las probabilidades de declarar BE.

En un trabajo realizado por Midha y col. (Midha et al., 1998) se proponía escalar los límites de la BEM de acuerdo a la expresión:

$$\text{Límites de BEM} = e^{\pm k \cdot \sigma}$$

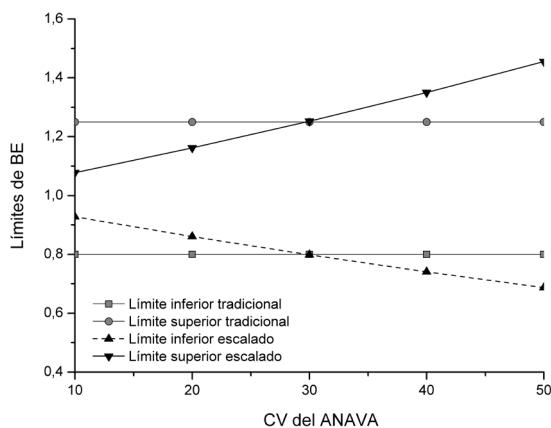
■ Ecuación 3-14

El valor de k se fijaba en 0,75 y $\sigma = [\ln(s_e^2 + 1)]^{0,5}$, de manera de obtener un límite superior igual a 1,25 (e inferior igual a 0,8) cuando $\sigma=0,3$. En la expresión anterior, s_e^2 es el cuadrado medio residual obtenido en el ANAVA realizado a los datos ln-transformados, por lo que ($\sigma \cdot 100$) representa el coeficiente de variación.

Los autores proponían aplicar este criterio en los siguientes casos:

- para drogas seguras, a partir de ANAVA-CV = 30%, así el criterio es más laxo;
- para drogas inseguras, por debajo de ANAVA-CV = 30%, así el criterio es más exigente;
- en los dos casos restantes, sugieren no escalar y utilizar los límites tradicionales y constantes de 80-125%.

La Figura 3-12 muestra comparativamente los límites obtenidos según la propuesta de los autores y los límites clásicos de los estudios de BE, ambos en función del CV del ANAVA.



■ **Figura 3-12.** Gráfico de los límites de los estudios de BE vs. el CV del ANAVA correspondiente. Las líneas horizontales representan los límites tradicionales y constantes 80-125%, mientras que las rectas con pendiente simbolizan los límites superior e inferior (línea llena y punteada, respectivamente) según el criterio de escalado propuesto

En otro trabajo, los mismos autores demuestran que el criterio de BEI resulta similar a la BEM en 2/3 de los casos presentados en su estudio. Cuando la variabilidad intra individual de la formulación R fue mayor a la de T el criterio de BEI escalado se volvió muy flexible. Más aún, la efectividad de la BEI para detectar una interacción

I*F fue eliminada por la aplicación de $\epsilon=0,05$ (valor estipulado por la FDA, ver Ecuación 3-6). Sobre la base de dichos resultados, los autores concluyen que el método de análisis recomendado por la FDA para la BEI no parece tener ninguna ventaja respecto a combinar los métodos actuales de BEM con un escalado, y que si bien el diseño replicado provee de mayor información, ésta no se utiliza efectivamente en el método actualmente recomendado para llegar a la decisión de BE (Midha et al., 1999).

Nuestros resultados están de acuerdo con lo anterior: la información extra que se obtiene al replicar la administración de los productos ensayados no brinda mayores ventajas a la hora de evaluar su BE. Para la mayoría de las drogas los clásicos estudios de BEM resultan satisfactorios para evaluar la similitud de dos medicamentos, mientras que en los casos (minoritarios) donde la BEM podría fallar (FEMTs, FAVs) existen alternativas para mejorar el criterio de aceptación y adecuarlo a cada situación.

Por lo tanto, creemos que los estudios de BEM son idóneos para evaluar comparativamente la calidad biofarmacéutica de los medicamentos (sin que esto signifique que son suficientes para garantizar la *intercambiabilidad* de los mismos, ver Capítulo 4), no justificándose la aplicación de una metodología más compleja, costosa y bioéticamente más cuestionable por implicar mayor número de voluntarios, de administraciones de medicamentos y de muestreos a dichos voluntarios.

Discusión y conclusiones parciales

En 1992, con la publicación de la guía de BD/BE de la FDA (FDA/CDER, 1992) se podía pensar que finalmente se había llegado al consenso entre los investigadores y los organismos reguladores acerca del concepto central de la BE. Irónicamente, alrededor de ese año también surgió el nuevo concepto de BEI, lo que originó una nueva era de investigación y discusión, y probablemente más controversia que antes.

Anderson y Hauck, dos bio-estadistas de los EEUU, señalaron que el diseño clásico de BEM sólo garantizaba que la BD de los productos era similar *en promedio*. De esa manera surgió la pregunta: ¿será asegurada la equivalente BD de dos medicamentos en los pacientes individuales mediante la equivalencia en promedio de su BD? Lo que, dicho de otra manera, significa cuestionar que la BEM implique la intercambiabilidad de los medicamentos en los pacientes (Anderson & Hauck, 1990).

A partir de ese momento se publicaron numerosas aproximaciones estadísticas a la BEI (se pueden encontrar buenos reviews de dichos métodos: Chow & Liu, 2009; Schall, 1995). Algunos ejemplos son los trabajos de Wang y Hwang, quienes desarrollaron un test estadístico prácticamente insesgado (*nearly unbiased*) (Wang & Hwang, 2001), mientras que Kimanani y Potvin (Kimanani & Potvin, 1997) propusieron un intervalo de confianza paramétrico, diferente al de Schall y Williams (Schall y Williams, 1996) aunque derivado de éste y basado en el método de los momentos. Finalmente, en 2001 el concepto de BEI fue adoptado en una guía oficial de la FDA (FDA/CDER, 2001).

Sin embargo, posteriormente comenzaron los cuestionamientos a dicha normativa, principalmente acerca de si el nuevo criterio de BEI realmente poseía un valor agregado respecto a la BEM (Hauschke et al., 2007). Surge entonces la observación, crucial para iluminar la cuestión de la validez general de la BEM, de que “no ha existido evidencia probada ni publicada de fallos clínicos con formulaciones que probaron ser BEM respecto al producto de referencia” (Barrett et al., 2000; Gould, 2000). Más aún, la BEI fue llamada una solución “teórica” a un problema “teórico” (Patterson, 2001).

El presente capítulo tenía por objetivo evaluar comparativamente los dos diseños mencionados para los estudios de BE: BEM vs. BEI. Para ello se realizaron dos tipos de ensayos: uno experimental, en voluntarios sanos (sección 3.2) y otros simulados por computadora (sección 3.3). Tanto la aproximación experimental como la simulada permiten arribar a una conclusión similar: los estudios clásicos de BEM son adecuados para la evaluación comparativa de la BD de dos medicamentos en la mayoría de los casos (drogas), presentando ciertos inconvenientes cuando los fármacos en estudio pertenecen al grupo de los fármacos altamente variables (FAVs) y/o fármacos de estrecho margen terapéutico (FEMTs).

Ya en 1998, Endrenyi y Midha concluían que a pesar de las críticas a la BEM no era claro si dicho procedimiento era inadecuado al permitir la comercialización de productos que fueran ineficaces o inseguros (Endrenyi & Midha, 1998), y en un trabajo más reciente, Schall y Endrenyi llegan a una conclusión similar, destacando que el caso de los FAVs y los FEMTs constituyen casos especiales y opuestos que requieren consideraciones especiales (Schall & Endrenyi, 2010).

Es un hecho reconocido que puede ser muy difícil probar la BEM de FAVs mediante la aplicación del rango convencional de 80-125%. Para dichas drogas, pueden llegar a necesitarse muestras de hasta 100 voluntarios o más para poder probar BE. Un ejemplo de esta dificultad es el hecho de que, bajo condiciones de trabajo típicas, un medicamento que contiene un FAV puede no resultar BE consigo mismo (Tothfalusi et al., 2009). Ya en 1996, Tsang y colaboradores planteaban una serie de posibles soluciones al problema de los FAVs, entre ellas el ensanchamiento del IC de BE para C_{max}, desde el clásico 80-125% hasta 70-143%, y/o la redefinición de los límites de BE basados en un criterio escalado a la variabilidad intra individual de la droga (Tsang et al., 1996), ambas soluciones potenciales en el caso de FAVs de amplio margen terapéutico.

En cuanto al ensanchamiento del IC para C_{max}, la nueva guía de BD/BE elaborada por la EMEA –que aún permanece en su versión preliminar–, admite que en aquellos casos en los que C_{max} posea menor importancia para la eficacia y seguridad clínica de un fármaco el criterio de aceptación puede ampliarse hasta 75-133%, siempre que dicha ampliación se encuentre debidamente justificada (y previamente definida) y que se haya replicado la administración del producto R de manera de demostrar que la variabilidad intra individual de C_{max} para dicho producto es mayor al 30% (EMEA/CPMP, 2008). Por otro lado, se encuentran las propuestas de criterios de aceptación “escalados” cuyo origen –irónicamente– se encuentra en los estudios de BEI, discutidos en la sección 3.3. Al parecer, esta aproximación es actualmente la preferida por los científicos de la FDA y los investigadores en el tema (Haidar et al., 2008; Tothfalusi et al., 2009).

El caso opuesto lo representan los FEMTs, ya que si es razonable plantear un ensanchamiento del intervalo de BE para drogas FAVs, es igualmente razonable proponer un intervalo más estrecho para los FEMTs (los que a su vez suelen tener baja variabilidad). Dicho estrechamiento podría aumentar la confianza al garantizar la seguridad de los productos genéricos sin imponer estándares desmedidos, tanto experimentales como económicos, a los laboratorios que deben realizar los estudios de BEM para dichas drogas. Al igual que en el caso anterior, la nueva guía europea de BD/BE prevé que “en el caso en que el intervalo de aceptación deba ser ajustado, los límites para concluir BE deberán ser estrechados hasta 90-111% (EMEA/CPMP, 2008)”.

También han surgido propuestas de “escalado” de los límites de la BEM en el caso de FEMTs. En un trabajo reciente acerca de la intercambiabilidad de AEDs, Bialer y

Midha proponen escalar respecto a la varianza intra individual del producto R (Bialer & Midha, 2010). En dicho trabajo los autores fijan el punto de corte entre los criterios con y sin escalado en una varianza de 0,25 y proponen aplicar el escalado *por debajo* de ese valor, es decir, para volver más estricto al criterio de aceptación.

En este punto debemos hacer una distinción. Cualquiera sea el objetivo del escalado (ampliar o reducir el intervalo de BE), se plantean dos opciones:

- escalar en función del error residual del ANAVA previo al cálculo de la BEM, como en el método de escalado de Midha y col. descrito en la sección 3.3 (Midha et al., 1998);
- escalar en función de la variabilidad intra individual del producto R, como en el método de Bialer y Midha (Bialer & Midha, 2010).

Al establecer un límite para el error al azar de una BEM a partir del cual se puede escalar el criterio de aceptación de alguna manera se corre el riesgo de alentar estudios con altas dispersiones. El término del error en una BEM incluye, además de la varianza intra individual y una posible interacción, todos los demás errores y causas de dispersión del estudio. Por lo tanto, creemos que sólo es una opción válida en los casos en los que se demuestra fehacientemente que existe una alta variabilidad intra individual inherente a la droga, y mientras que las demás variables del estudio se hayan mantenido dentro de límites de dispersión aceptables.

Por el contrario, escalar respecto a la varianza intra individual de la referencia tiene la desventaja de requerir administraciones replicadas de dicho producto a los voluntarios, que era precisamente lo que se quería evitar mediante el empleo de BEM en vez de BEI. Si bien todavía no se ha llegado a una metodología definitiva de escalado, esta última aproximación parece ser el método más adecuado y prometedor para abordar el problema de los FAVs y los FEMTs (Schall & Endrenyi, 2010).

En conclusión, creemos que es válida la primera hipótesis planteada al inicio de este trabajo, y que si bien los estudios replicados brindan mayor información que otros diseños (lo que puede justificar su aplicación en ciertas circunstancias en las que se desee evaluar una interacción o una varianza intra individual específica), la BEI constituye una metodología más compleja, costosa, que requiere más tiempo y voluntarios (y mayor número de administraciones y muestreos a dichos voluntarios). Estas desventajas experimentales, económicas y bioéticas, sumadas a la falta de beneficios significativos de la BEI respecto a la BEM, y a la capacidad de ésta última para adaptarse a las situaciones especiales descritas para los FAVs y los FEMTs, mediante la modificación de los límites de aceptación (de manera fija o escalada), hacen que en la mayoría de los casos carezca de justificación la realización de estudios de BEI.

