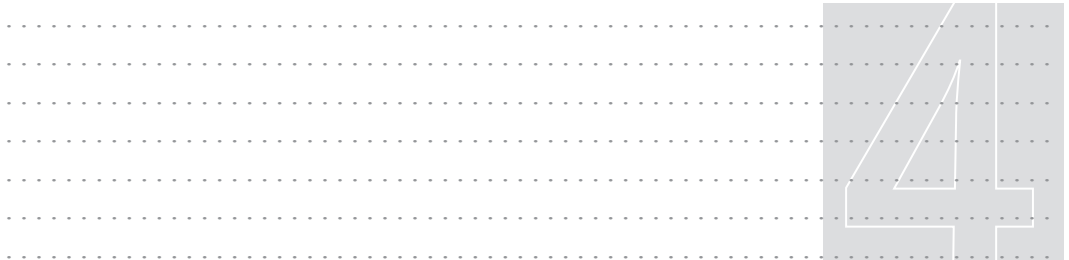


---

---

■ Capítulo 4

**Bioequivalencia vs.  
intercambiabilidad:  
el caso de Carbamazepina**





Carbamazepina (CBZ) es una droga del grupo de los iminoestilbenos químicamente relacionada con los antidepresivos tricíclicos. Fue sintetizada en laboratorios Geigy en 1953 como posible competidor del antipsicótico Clorpromazina. Su aplicación en pacientes epilépticos recién fue evaluada en 1963, después de lo cual fue rápidamente comercializada como anticonvulsivo en el Reino Unido en 1965 (Brodie, 2010). En los Estados Unidos, aunque se había utilizado desde la década del 60 para tratar la neuralgia del trigémino, su uso como anticonvulsivo se aprobó en 1974. En la actualidad se considera un medicamento de primera elección para el tratamiento de las crisis parciales y tónico-clónicas generalizadas (Goodman & Gilman, 2006).

CBZ se utiliza como antiepiléptico, analgésico y antimaniaco. Como antiepiléptico pertenece al grupo denominado de “segunda generación” y resulta eficaz frente a las convulsiones tónico-clónicas generalizadas y las crisis parciales, pero no frente a ausencias típicas, mioclonías y convulsiones febriles. Tanto la CBZ como su metabolito activo, 10,11-Epóxido de Carbamazepina (E-CBZ) inhiben la entrada de sodio bloqueando selectivamente las descargas de alta frecuencia. Afecta más a las neuronas normales que propagan la descarga que a las del foco epiléptico e inhibe, a su vez, las descargas paroxísticas más que la transmisión fisiológica, por lo que no interfiere con las funciones cognitivas ni tiene acción sedante. A dosis altas es posible que su acción presináptica reduzca la entrada de calcio e inhiba la liberación de neurotransmisores (Armijo & Herranz, 1998).

Sus características farmacocinéticas son complejas; dependen de su limitada solubilidad acuosa y de su capacidad para autoinducir el metabolismo hepático, incrementando su inactivación enzimática. Administrada por vía oral se absorbe con lentitud y de manera errática, su BD suele aproximarse al 70%. Se distribuye con rapidez por todos los tejidos y el tiempo para alcanzar la Cmax es muy variable, de 4 a 24 horas (Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004). Alrededor de un 75% se fija a proteínas plasmáticas (50% para E-CBZ) y las concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) parecen corresponder a la fracción libre en plasma. A causa de la inducción de las enzimas hepáticas, su vida media es mucho más larga en individuos que reciben sólo una dosis (promedio cercano a 40 horas) respecto a quienes reciben tratamiento crónico (alrededor de 20 horas. Ver Figura 4-1) [Florey, 1988].

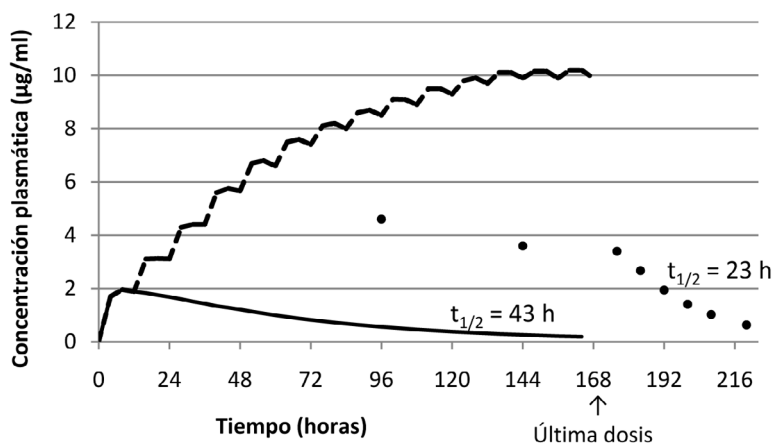


Figura 4-1. Concentraciones plasmáticas de CBZ. La línea entera corresponde a una dosis única de 200 mg ( $t_{1/2} = 43$  horas). La línea punteada corresponde a una simulación por computadora de una posología de 200 mg cada 12 horas con  $t_{1/2} = 43$  horas. Los círculos representan los puntos experimentales obtenidos para dicha posología ( $t_{1/2} = 23$  horas por inducción del propio metabolismo). Adaptado de Cohen Et Pradeau, 1998

Luego de la administración oral de CBZ, el 72% se elimina por orina. Dentro de ese porcentaje, el 80% son metabolitos correspondientes a las tres rutas principales esquematizadas en la Figura 4-2. La más importante es la conversión a 10,11-epóxido por el citocromo P450 CYP3A4. Este metabolito es tan activo como el compuesto original y su concentración puede llegar al 50% de la de CBZ. Es convertido casi completamente en el 10,11-trans-diol correspondiente y éste se elimina por orina en su forma libre o conjugados. Las otras dos rutas principales consisten en hidroxilaciones de los anillos aromáticos. Sólo un 2 ó 3% de la dosis oral se excreta como CBZ o E-CBZ sin metabolizar en la orina (Eichelbaum et al., 1985).

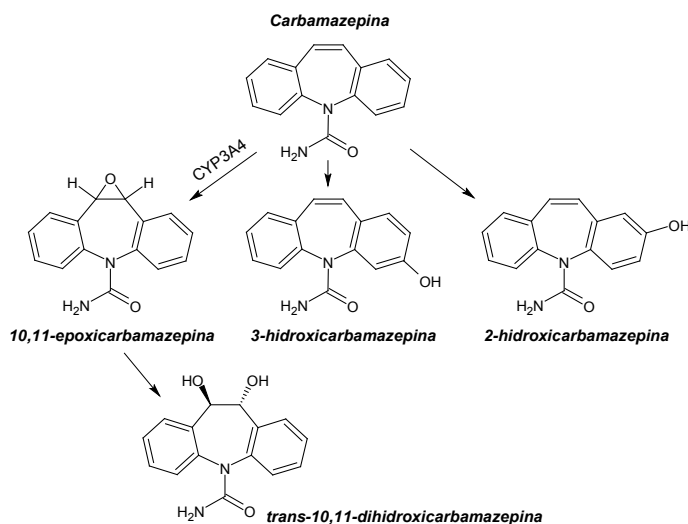


Figura 4-2. Principales vías metabólicas de la CBZ

Debido a su capacidad de inducción del metabolismo, la eliminación de CBZ es dosis-dependiente (Battino et al., 2003; Bernus et al., 1996). Sin embargo, al no poder determinar el clearance (Cl) sistémico de CBZ (por imposibilidad de administración intravenosa), la eliminación dosis-dependiente podría deberse tanto a un aumento del Cl como a una disminución de la BD (F) ( $\text{Cl aparente} = \text{Cl sistémico}/F$ ). Garg y colaboradores encontraron que la absorción de CBZ aumentaba cuando era administrada con jugo de pomelo (Garg et al., 1998), inhibidor de las enzimas responsables de la metabolización pre-sistémica de CBZ (CYP3A4) y de la proteína transportadora MRP2 (*multiple resistance protein*) responsable de sacar moléculas de CBZ desde los enterocitos hacia la luz intestinal. Ambas enzimas, CYP3A4 y MRP2 son autoinducidas durante el tratamiento crónico con CBZ (Giessmann et al., 2004). Por lo tanto, el CYP3A4 sería el responsable de la BD incompleta de la droga como así también de la formación presistémica de E-CBZ. De esta manera, no sólo el aumento del Cl sistémico es responsable de la farmacocinética no-lineal de CBZ, sino también su BD dosis-dependiente (Fagiolino et al., 2006).

Por lo tanto, el uso de CBZ presenta numerosas complicaciones: alta variabilidad intra e inter individual en cuanto a la relación dosis/concentraciones plasmáticas, autoinducción del metabolismo hepático, formación de un metabolito activo, estrecho margen terapéutico y múltiples interacciones con otros AEDs, sin contar la existencia de diversas formas polimórficas de CBZ, cada una con diferente velocidad de disolución (Rustichelli et al., 2000). Incluso empleando la misma dosis, las concentraciones plasmáticas de CBZ pueden variar con la edad, el género o la raza (Battino et al., 2003; Hundt et al., 1983; Suzuki et al., 1991). Durante la terapéutica con CBZ es necesario el monitoreo terapéutico (TDM) frecuente (Bourgeois, 2000). El intervalo terapéutico aceptado para CBZ en plasma se encuentra entre 4-12  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , si bien concentraciones cercanas a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se han asociado algunas veces con aparición de efectos tóxicos (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

No es sorprendente, entonces, que exista una historia de problemas relacionados con la terapéutica con CBZ, y particularmente con sus FG, de manera similar a lo que ocurre con los demás AEDs clásicos (como ya se discutió para PHT en el capítulo anterior). Se pueden encontrar numerosos reviews acerca del tema (Besag, 2000; Nuwer et al., 1990; Richens, 1997). La Tabla 4-1 resume algunos de los problemas que se han reportado durante el uso de FG de CBZ o como consecuencia del intercambio de la formulación líder (Tegretol, Lab. Novartis) por FG conteniendo CBZ.

Tabla 4-1. Reportes de problemas encontrados en la literatura que involucran productos conteniendo CBZ

Cita	Pacientes	Hallazgos
(Koch & Allen, 1978)	1 mujer	Aumento de las crisis al cambiar a genérico, con disminución de los niveles de CBZ. Normalización al volver a Tegretol
(Pedersen & Dam, 1985)	1 paciente de 16 años	Niño con epilepsia parcial secundaria a hemiatrofia cerebral controlada con Tegretol. Reaparecen las crisis al cambiar a FG

(Sachdeo & Belendiuk, 1987)	3 pacientes	Pérdida del control de las crisis al cambiar a FG. Normalización al volver a Tegretol
(Hartley et al., 1990)	2 pacientes	Aparición de crisis 3-7 días después de sustituir CBZ original por genérico
(Welty et al., 1992)	2 pacientes	Aparición de crisis y disminución de los niveles plasmáticos tras cambiar CBZ original por genérico
(Gilman et al., 1993)	2 niños de 6 años	Aumento de la Cmax de CBZ de 22 a 41% después de cambiar a genérico, apareciendo toxicidad que desapareció al volver a Tegretol. Un niño fue hospitalizado
(Bell et al., 1993)	1 paciente de 28 años	Aparición de convulsiones tres días después de que una FG de CBZ se mojó por la lluvia. Al ingreso al hospital la concentración plasmática del paciente era 3,8 µg/ml (monitoreos previos habían arrojado valores siempre dentro del intervalo 9-13 µg/ml)
(Mayer et al., 1999)	13 pacientes	Ensayo no-ciego para comparar una FG de liberación sostenida de CBZ con el mismo producto pero de marca líder: 9 de 13 sujetos experimentaron efectos adversos con la FG. Un paciente que sufrió los efectos adversos de CBZ con un aumento en la Cmax menor al 10%

Así como en el capítulo anterior, empleando a PHT como droga modelo, se evaluaron algunos de los distintos diseños estadísticos-experimentales aplicables a estudios de BE, sus beneficios, desventajas y, finalmente, su influencia en la intercambiabilidad de medicamentos, en este capítulo se estudia otra aproximación al problema de la intercambiabilidad: dada una prueba experimental para determinar BE entre dos medicamentos A y B, ¿es la misma capaz de asegurar que todos los pacientes estabilizados con uno de ellos pueden cambiarlo por el otro (A por B o B por A) manteniendo la eficacia y la seguridad de su tratamiento?

Para esto, se trabajó con CBZ como droga modelo y se analizó la intercambiabilidad de productos de CBZ 200 mg declarados BE según la metodología experimental actualmente exigida por los entes regulatorios (BEM), en pacientes estabilizados con un determinado medicamento (sección 4.2). Como dicho ensayo arrojó resultados inesperados (posible falta de BEM entre los productos) surgió la necesidad de corroborarla, lo que se presenta en la sección 4.3. Por último, en la discusión del capítulo, se analizan los resultados en su conjunto y su impacto sobre la intercambiabilidad, intentando demostrar lo que se planteó en la segunda de nuestras hipótesis:

*Ninguna prueba experimental puede asegurar idéntico desempeño terapéutico de dos medicamentos en la práctica clínica, por lo tanto no deben realizarse intercambios cuando el riesgo asociado es elevado, como en el caso del intercambio de fármacos antiepilépticos (AEDs) en pacientes estabilizados.*

## Ensayos realizados

### 4.1 Desarrollo y validación de métodos analíticos

#### A. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes

Se aplicó un método por HPLC para la determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes (*ver descripción del cromatógrafo en el Anexo I*).

##### ● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher 60 RP-Select B 250 x 4 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM, pH 7,0): Acetonitrilo: Tetrahidrofurano: Isopropanol (63:29:5:3 en volumen), desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Los solventes eran calidad HPLC. Se trabajó de manera isocrática y a temperatura ambiente, con un flujo de 0,8 ml/min y con detección UV a 220 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

##### ● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock de las diferentes sustancias de referencia (SR) fueron preparadas en metanol a las siguientes concentraciones: CBZ (125 µg/ml), E-CBZ (56 µg/ml) y Nitrazepam (NTZ, estándar interno, SI, 260 µg/ml). Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante al menos nueve meses a -20 °C). Las SR utilizadas luego se prepararon por dilución de estas soluciones stock con plasma blanco o saliva blanco, según correspondiera.

##### ● Preparación de las muestras

**Plasma:** sobre 0,5 ml de muestra plasmática se adicionaron 15 µl de la solución stock de SI (NTZ, 260 µg/ml) y 2 ml de Acetato de Etilo. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 3500 rpm 10 min. Se separó el sobrenadante y se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40 °C en baño de agua. El residuo obtenido se resuspendió en 250 µl de fase móvil (sin tetrahidrofurano), se centrifugó 10 min a 13000 rpm y por último se inyectaron 20 µl en el cromatógrafo.

**Saliva:** se procedió igual que en el caso de plasma partiendo de 0,5 ml de muestra salival. Luego de evaporar hasta sequedad en iguales condiciones se resuspendió el residuo con 100 µl de fase móvil (sin Tetrahidrofurano).

#### Validación del método analítico

##### ● Especificidad

Se analizaron muestras de plasma y saliva blanco provenientes de ocho fuentes independientes en busca de interferencias endógenas. Un ejemplo de cromatograma para cada una de las dos matrices se muestra en la Figura 4-3. Para establecer la especificidad del método con respecto a otros principios activos comúnmente prescritos en politerapia anticonvulsivante, se inoculó una muestra de plasma blanco con soluciones de referencia de Lamotrigina (LTG), Valproato de Sodio (VP), Fenitoína (PHT), Fenobarbital (PB) y Clonazepam (CNZ). Los resultados se muestran en la Figura 4-4.

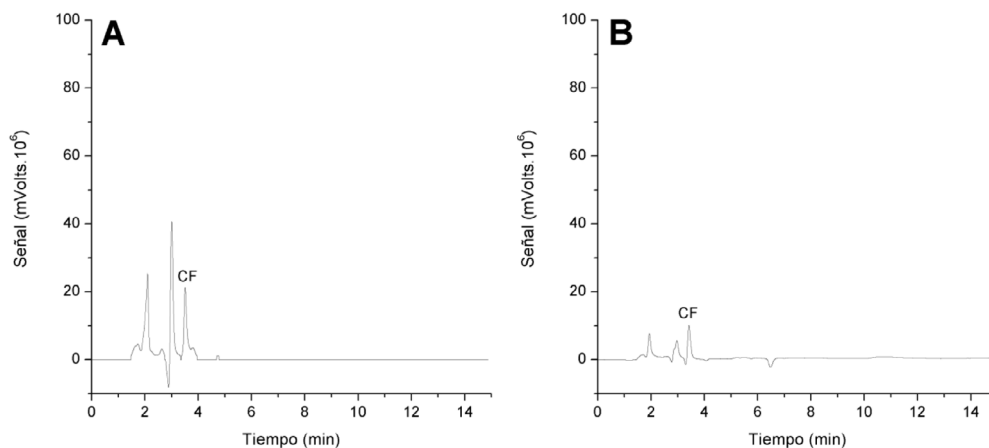


Figura 4-3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva (A) y plasma (B) blanco. CF: Cafeína

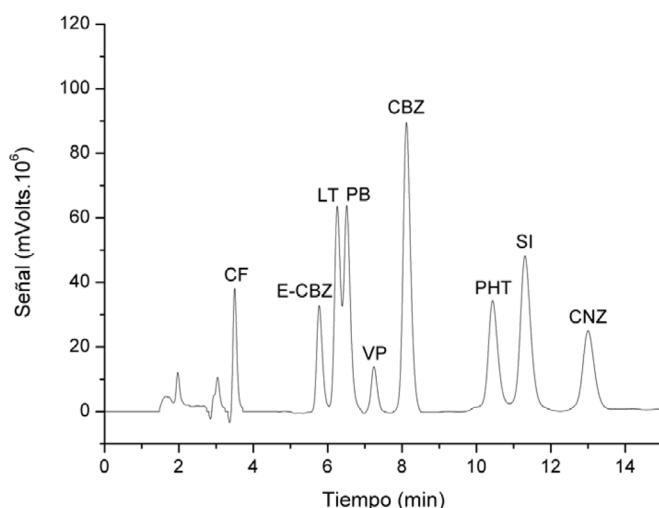


Figura 4-4. Cromatograma obtenido para plasma blanco inoculado con soluciones de referencia de Cafeína (CF), 10, 11-Epóxido de Carbamazepina (E-CBZ), Lamotrigina (LT), Fenobarbital (PB), Valproato de Sodio (VP), Carbamazepina (CBZ), Fenitoína (PHT), Nitrazepam (SI) y Clonazepam (CNZ)

El mismo procedimiento se realizó también para saliva, con idéntico resultado (no se muestra el cromatograma). También se estableció la especificidad del método respecto de la droga Cafeína (CF), por tratarse de una sustancia que suele estar presente en las muestras biológicas obtenidas tanto de pacientes como de voluntarios (Chros-cinska-Krawczyk et al., 2011).

La concentración de cada una de las drogas estudiadas en la muestra inyectada en el cromatógrafo se eligió de manera que estuviera dentro del intervalo terapéutico (IT) esperado para un paciente en tratamiento con dichas drogas. En el caso de CNZ se utilizó una concentración un poco mayor (situación analíticamente más desfavorable) para obtener un pico de área semejante a los demás y así verificar que no interfiriera con los analitos de interés. Las concentraciones utilizadas entonces (entre corchetes se indica el IT esperado) fueron: 3,5 µg/ml de E-CBZ [0,6-6,0]; 7,5 µg/ml de LT [4,0-



10,0]; 15,0 µg/ml de PB [2,0-30,0]; 80,0 µg/ml de VP [50,0-100,0]; 7,5 µg/ml de CBZ [2,0-12,0]; 15,0 µg/ml de PHT [10,0-20,0] y 0,5 µg/ml de CNZ [0,02-0,07]. En el caso de CF, se utilizó una concentración de 4,0 µg/ml, que es lo que suele encontrarse en los fluidos biológicos.

Como muestran las figuras anteriores, el método resultó ser específico tanto respecto de las dos matrices biológicas empleadas (plasma y saliva humanos) como de los otros principios activos ensayados.

#### ● Linealidad

Se evaluó la linealidad del método, tanto en plasma como en saliva, para CBZ y su metabolito activo. Para ello se analizaron cinco muestras independientes, a seis niveles diferentes de concentración (N = 30), dentro del rango 0,4-20,0 µg/ml para CBZ y 0,3-12,0 µg/ml para E-CBZ. La Tabla 4-2 muestra los resultados obtenidos. De acuerdo al test de Student, la correlación fue significativa en todos los casos ( $p < 0,0001$ ).

Las correlaciones se construyen como Ra vs. concentración, donde Ra es la relación de áreas de pico obtenidas para los analitos y el SI ( $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

Tabla 4-2. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. En todos los casos, se ensayaron cinco réplicas independientes a seis niveles diferentes de concentración (N = 30) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%.  $R^2$ : coeficiente de determinación

	Rango (µg/ml)	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	$R^2$	Suma de residuales	p-valor
<b>Carbamazepina</b>						
Plasma	0,20 - 24,00	0,011 [-0,022 - 0,044]	0,1695 [0,1666 - 0,1724]	0,9980	-1,721.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
Saliva	0,08 - 12,00	-0,0033 [-0,0283 - 0,0217]	0,3817 [0,3773 - 0,3861]	0,9991	2,637.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>						
Plasma	0,10 - 12,00	-0,0069 [-0,0151 - 0,0012]	0,1222 [0,1207 - 0,1236]	0,9991	-3,539.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001
Saliva	0,04 - 6,00	-0,0059 [-0,0115 - 0,0004]	0,2692 [0,2672 - 0,2711]	0,9996	-1,284.10 <sup>-15</sup>	< 0,0001

Se consideran como límites de cuantificación para CBZ y E-CBZ las menores concentraciones de la curva de calibración en cada matriz, ya que en todos los casos se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y los picos eran identificables, discretos y reproducibles 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 referencia de CBZ y E-CBZ (con agregado de SI, NTZ) a seis niveles de concentración, cinco replicados independientes a cada nivel. Para ello se inoculó plasma y saliva blanco con cantidades adecuadas de soluciones stock. Las concentraciones finales y los resultados se muestran en la Tabla 4-3, donde se observa

que el método posee exactitud y precisión aceptables para ambos analitos, en ambas matrices biológicas, en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó la relación de áreas (Ra,  $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

Las muestras fueron preparadas, procesadas y analizadas en días diferentes intentando simular la situación real de aplicación del método: obtener muestras de pacientes en diferentes días. Por lo tanto, la precisión obtenida es inter día o precisión intermedia (FA 7, 2003).

**Tabla 4-3.** Exactitud y precisión (inter día) obtenidas para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. Se realizaron cinco réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 5). CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Inter día		Concentración (µg/ml)	Inter día	
	Exactitud (%)	CV (%)		Exactitud (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>					
0,20	104,25	8,8	0,08	97,53	6,0
0,40	98,40	5,4	0,20	98,74	1,8
2,00	100,39	5,9	1,00	99,13	3,0
7,00	97,20	2,4	3,50	99,99	0,4
12,00	99,85	2,2	6,00	99,99	1,3
24,00	96,80	3,7	12,00	100,38	2,8
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,10	98,03	7,7	0,04	98,64	5,5
0,30	100,88	6,0	0,15	98,68	3,6
1,00	97,72	1,7	0,50	99,01	3,2
3,50	99,26	1,0	1,50	100,00	2,5
6,00	100,58	0,7	3,00	100,39	1,3
12,00	103,33	2,5	6,00	100,92	0,9

● **Recuperación**

Los porcentajes recuperados luego de la etapa de extracción se evaluaron a tres niveles de concentración diferentes, con tres réplicas a cada nivel, mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas para los analitos en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco adicionada con solución de referencia) con las áreas obtenidas para los mismos analitos en soluciones de referencia sin extraer, es decir, soluciones de igual concentración que las anteriores pero preparadas por simple dilución en metanol de las soluciones stock.

La Tabla 4-4 muestra los resultados: los porcentajes recuperados obtenidos fueron cercanos al 80% en todos los casos y relativamente constantes, lo que motivó el uso de estándar interno, ya que como se ve en la Tabla 4-3, cuando en vez de áreas de pico se realizan los cálculos utilizando el parámetro Ra, los porcentajes recuperados se aproximan al 100%, a la vez que aumenta la precisión de los resultados.

Tabla 4-4. Recuperación para muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)	Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>					
0,40	87,62	7,5	0,20	81,38	8,0
7,00	87,25	3,0	3,50	82,74	4,6
24,00	83,59	4,0	12,00	81,33	4,1
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,30	86,89	4,0	0,15	81,93	3,8
3,50	89,31	3,7	1,50	77,41	3,8
12,00	84,54	9,6	6,00	77,23	3,5

#### ● Estabilidad

Las soluciones stock de las SR de CBZ, E-CBZ y NTZ resultaron estables durante al menos nueve meses a -20 °C. A lo largo de ese tiempo, periódicamente fueron retesteadas, 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 plasma y saliva inoculadas con CBZ, E-CBZ y NTZ SR (a dos niveles de concentración para cada matriz, tres réplicas independientes cada vez) frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento (48 h) y durante 20 horas a temperatura ambiente. Las muestras resultaron estables en todas las condiciones ensayadas, como se ve en la Tabla 4-5.

Tabla 4-5. Estabilidad de muestras salivales y plasmáticas inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente y a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. CV: coeficiente de variación

PLASMA			SALIVA		
Concentración (µg/ml)	Recuperación (%) (n = 3)	CV (%)	Concentración (µg/ml)	Recuperación (%) (n = 3)	CV (%)
<i>- Estabilidad frente a un ciclo de 20 horas a temperatura ambiente</i>					
<b>Carbamazepina</b>					
0,40	94,76	3,56	0,20	95,49	3,18
12,00	95,71	2,54	6,00	100,91	2,17
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,30	98,71	4,40	0,15	97,58	3,88
6,00	99,90	1,12	3,00	97,16	2,15

*- Estabilidad frente a tres ciclos de congelamiento-descongelamiento*

<b>Carbamazepina</b>					
0,40	97,36	2,75	0,20	95,39	3,20
12,00	98,53	1,66	6,00	99,78	3,35
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,30	97,76	3,13	0,15	97,61	2,66
6,00	100,99	2,52	3,00	100,31	1,70

## B. Método para la determinación de CBZ y E-CBZ en saliva de voluntarios sanos

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

### ● Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna LiChrospher 60 RP-Select B, 250 x 4 mm, 5 µm de tamaño de partícula (Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla de buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (10 mM, pH 7,0): Acetonitrilo: Metanol (60:34:6 en volumen), desgasificada y filtrada por membrana de nylon de 0,45 µm. Se trabajó de manera isocrática a temperatura ambiente, con flujo 1 ml/min y detección UV a 220 nm. Se utilizó el área de pico como parámetro de integración.

### ● Preparación de las soluciones de referencia

Las soluciones stock de las diferentes SR utilizadas fueron preparadas en metanol, a las siguientes concentraciones: CBZ (125 µg/ml), E-CBZ (56 µg/ml) y NTZ (estándar interno, SI, 25 µg/ml). Dichas soluciones se conservaron refrigeradas hasta su uso (se mantienen estables durante al menos nueve meses a -20 °C). Todas las SR utilizadas luego para la validación del método y la valoración de las muestras se prepararon por dilución de estas soluciones stock con saliva blanco.

### ● Preparación de las muestras

Sobre 1 ml de muestra salival se agregaron 10 µL de la solución stock de NTZ (25 µg/ml, SI) y 3 ml de cloroformo. Se agitó en vortex durante 1 min y 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 20 µl se inyectaron en el cromatógrafo.

## Validación del método analítico

### ● Especificidad

El método demostró ser específico respecto de la matriz biológica ya que no se observaron picos cercanos (interferencias endógenas) a los tiempos de retención de E-CBZ, CBZ y NTZ cuando se analizaron muestras de saliva blanco proveniente de ocho fuentes independientes. En la Figura 4-5 se muestra un ejemplo de un cromatograma blanco y de un cromatograma blanco inoculado con SR de E-CBZ, CBZ y NTZ.

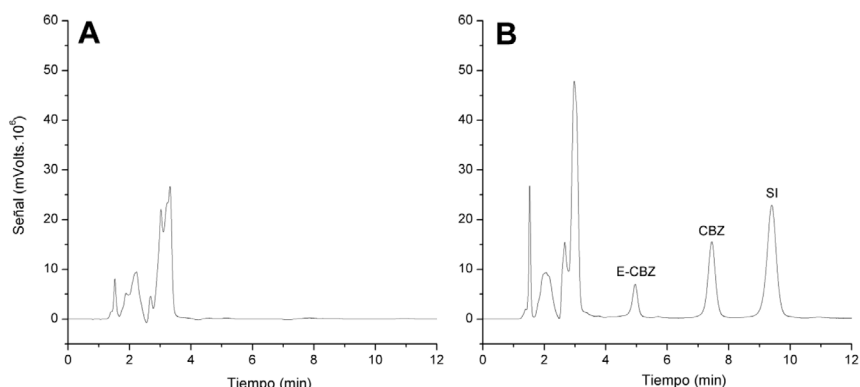


Figura 4-5. Ejemplos de cromatogramas obtenidos con saliva blanco (A) y saliva blanco más soluciones de referencia de E-CBZ, CBZ y NTZ (estándar interno, SI) (B)

### ● Linealidad

Para evaluar la linealidad del método se analizaron tres muestras de SR independientes, a cinco niveles diferentes de concentración ( $N = 15$ ), dentro del rango 0,02-3,00  $\mu\text{g/ml}$  para CBZ y 0,01-1,50  $\mu\text{g/ml}$  para E-CBZ (preparadas inoculando saliva blanco con soluciones stock).

Las correlaciones se construyen como  $R_a$  vs. concentración, donde  $R_a$  es la relación de áreas de pico obtenidas para los analitos y el SI ( $A_{\text{CBZ}}/A_{\text{SI}}$  y  $A_{\text{E-CBZ}}/A_{\text{SI}}$  según corresponda). Para ambos analitos, el método ajustó al modelo lineal de acuerdo al test de Student ( $p < 0,0001$ ), y en la Tabla 4-6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4-6. Resultados del ensayo de linealidad para muestras salivales inoculadas con SR de CBZ y E-CBZ. Se ensayaron tres réplicas independientes a cinco niveles diferentes de concentración ( $N = 15$ ) dentro del rango indicado. IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%.  $R^2$ : coeficiente de determinación

Rango ( $\mu\text{g/ml}$ )	Ordenada (a) [IC 95%]	Pendiente (b) [IC 95%]	$R^2$	Suma de residuales	p-valor
<b>Carbamazepina</b>					
0,02 - 3,00	-0,0076 [-0,0595 - 0,0444]	1,5974 [1,5651 - 1,6297]	0,9990	$2,109 \cdot 10^{-15}$	< 0,0001
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
0,01 - 1,50	-0,0076 [-0,0187 - 0,0035]	1,2528 [1,2389 - 1,2668]	0,9997	$2,77 \cdot 10^{-15}$	< 0,0001

Se consideran los límites de cuantificación de 0,02 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$  para CBZ y E-CBZ respectivamente (menor concentración de la curva de referencia), ya que se cumplieron las siguientes condiciones: la respuesta obtenida a ese nivel fue al menos 5 veces la respuesta del blanco, y además los picos eran identificables, discretos y reproducibles 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 referencia de CBZ y E-CBZ más NTZ 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 stock. Las concentraciones finales y los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 4-7, donde se observa que el método posee exactitud y precisión aceptables para ambos analitos, en todo el rango de concentraciones estudiado. Para el cálculo de la exactitud se utilizó la relación de áreas ( $Ra$ ,  $A_{CBZ}/A_{SI}$  y  $A_{E-CBZ}/A_{SI}$  según corresponda).

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 4-7.** Exactitud y precisión (intra día) obtenidas para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ, más SI. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Intra día	
	Exactitud (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>		
0,020	96,83	3,26
0,250	96,12	0,47
0,875	100,03	1,23
1,50	99,90	2,39
3,00	100,86	2,75
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>		
0,010	95,18	4,65
0,125	94,60	1,77
0,375	99,09	2,13
0,750	99,90	1,86
1,50	101,55	1,05

● **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 de las áreas de pico obtenidas para CBZ y E-CBZ en las muestras procesadas (preparadas a partir de matriz blanco adicionada con 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 en metanol de las soluciones stock.

La Tabla 4-8 muestra los resultados obtenidos: en todos los casos, los porcentajes recuperados fueron cercanos al 90% y relativamente constantes, lo que motivó el uso de estándar interno, ya que como se ve en la Tabla 4-7, cuando en vez de áreas de pico se realizan los cálculos utilizando el parámetro Ra (cociente de áreas), los porcentajes recuperados se aproximan al 100% y también aumenta la precisión de los resultados.

**Tabla 4-8.** Recuperación para muestras salivales inoculadas con soluciones de referencia de CBZ y E-CBZ, calculada respecto a soluciones de referencia en metanol. Se realizaron tres réplicas independientes a cada nivel de concentración (n = 3). CV: coeficiente de variación

Concentración (µg/ml)	Recuperación (%)	CV (%)
<b>Carbamazepina</b>		
0,020	90,91	7,21
0,875	90,07	5,29
3,00	90,62	8,73
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>		
0,010	85,31	9,13
0,375	88,67	8,18
1,50	89,81	10,21

#### ● Estabilidad

No se realizaron estudios de estabilidad adicionales ya que los resultados obtenidos son aplicables para la técnica anterior (determinación de CBZ y E-CBZ en plasma y saliva de pacientes). Si bien ambas técnicas difieren en la preparación de las muestras y las condiciones cromatográficas, se trata de los mismos analitos en la misma matriz (saliva).

Por lo tanto, los resultados del estudio pueden verse en el apartado “Estabilidad” de la técnica anterior.

## **4.2** Monitorización de niveles plasmáticos y salivales de CBZ en pacientes

Este ensayo fue inicialmente planteado para ser realizado en cuatro etapas, cada una de las cuales incluiría alrededor de 10 pacientes. Como se mencionó en la presentación, no fue posible avanzar más allá de la primera; sin embargo, esta etapa mostró resultados interesantes y dio lugar a estudios posteriores. A continuación se describe el estudio, el modo en que se realizó y los resultados que se obtuvieron.

### Descripción y objetivos

#### ● Diseño del estudio

Se trabajó con pacientes del Servicio de Neurología del Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rodolfo Rossi de la ciudad de La Plata, medicados con Carbamazepina (CBZ), no necesariamente en monoterapia, siendo éste el único criterio de inclusión del estudio. El protocolo de trabajo fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata (*ver Anexo III*).

Antes de iniciar el estudio se realizó una reunión informativa con pacientes y médicos. Allí se explicaron las características del estudio y se entregó a cada paciente una copia con toda la información pertinente. Se aclararon las inquietudes que surgieron después de analizar la documentación y se firmaron los correspondientes formularios de consentimiento informado, en presencia de un testigo. Luego, cada paciente fue evaluado por un profesional médico, y dicha evaluación se sumó a su historia clínica, además de la información correspondiente a sus hábitos alimenticios, actividades y medicación concomitante, colaterales que se mantuvieron constantes a lo largo del estudio.

Los pacientes comenzaron recibiendo los tratamientos prescritos por sus médicos (mono o politerapia) durante un mes con una marca determinada, seguido de otro mes con otra marca comercial del mismo medicamento.<sup>1</sup> En ambas ocasiones, se tomaron muestras plasmáticas y salivales de cada paciente durante las últimas dos semanas (una muestra por semana), a fin de asegurar que se haya alcanzado el estado estacionario.

Al efectuar el cambio de marcas se preguntó a cada paciente si había manifestado algún síntoma relacionado a dicho cambio, y se registraron las respuestas. Por otro lado, los pacientes (su familiar más cercano o su tutor) registraron apropiadamente la ocurrencia de crisis convulsivas (día, hora, forma de expresión y duración) a lo largo de todo el tiempo que estuvieron afectados al estudio. Al momento de la obtención de muestras, y cuando los pacientes acudieron a la consulta médica para cambiar de medicación o para finalizar su participación en el estudio, se tomó nota de los registros domiciliarios y se realizó un control clínico para identificar la aparición de alguna reacción adversa.

El día de la monitorización los pacientes concurrieron al hospital por la mañana, antes de la toma de la dosis correspondiente, con un ayuno de 8 horas (para cada paciente la toma de muestra se realizó siempre a la misma hora). En todas las ocasiones se extrajeron 5 ml de sangre (en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital) que se colocaron en tubos heparinizados, los que inmediatamente se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos. El plasma separado se transfirió a tubos de vidrio, que se conservaron a -20 °C hasta su traslado. En forma simultánea se colectaron las muestras de saliva. Para ello, se permitió a los pacientes masticar un trozo de parafilm de manera de estimular la salivación, luego de lo cual se tomó la muestra en recipientes plásticos adecuados, que también se conservaron a -20 °C hasta su traslado.

Las muestras obtenidas en el Hospital fueron llevadas al lugar de procesamiento (Cátedra Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP) en recipientes térmicos con refrigerantes adecuados para su conservación. Allí fueron nuevamente colocadas en freezer a -20 °C, hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC, descrita en la sección 4.1 del presente capítulo.

## Resultados y discusión

Se comenzó el ensayo con un grupo de 10 pacientes epilépticos, medicados con comprimidos de CBZ 200 mg. Luego de la reunión informativa y la evaluación clínica (descriptas en el diseño del estudio) se les entregaron los comprimidos de la marca elegida para comenzar: Carbamazepina Denver Farma (Lote: 50105, Vto.: 01/2008). Esta marca, a la que denominaremos de aquí en más “Test”, es la que los pacientes tomaron durante un mes.

En las últimas dos semanas de ese mes, los pacientes debían acudir al hospital para la toma de las muestras plasmáticas y salivales en los días previamente acordados para los muestreos. En ambas ocasiones, solo acudió un pequeño grupo de los diez pacientes, mientras que a los demás fue necesario llamarlos, recordarles y reprogramar una fecha de muestreo dentro de la semana correspondiente. Aún así, solo siete de los diez pacientes cumplieron esta etapa.

Luego del último muestreo, a esos pacientes se les entregaron los comprimidos de la marca elegida para continuar (“Referencia”): Tegretol (Lote: 343362, Vto.: 10/2008).

---

<sup>1</sup> En la primera etapa se evaluaron solo dos marcas de productos de CBZ 200 mg y una misma secuencia: TR. La secuencia inversa, RT, así como la evaluación de otras marcas comerciales, estaba pautada para las siguientes etapas, que no se llegaron a realizar.



Al igual que en el primer período del estudio, los pacientes debían acudir para el muestreo llegadas las dos últimas semanas del primer mes de tratamiento con esta marca. Nuevamente, fue muy difícil obtener las muestras, y solo seis pacientes de los diez iniciales completaron todo el esquema. La Tabla 4-9 muestra las características antropométricas de dichos pacientes y la dosis de tratamiento.

**Tabla 4-9.** Características antropométricas de los seis pacientes que completaron el esquema de trabajo propuesto. También se detalla la dosis (mg/día) de CBZ prescrita para cada paciente y si la misma es en mono o politerapia (y entre paréntesis la medicación concomitante)

ID Paciente	Sexo	Edad (años)	Peso (k)	Altura (m)	Dosis (mg/día)	Mono (M) / Poli (P) Terapia
#1	F	40	49	1,65	600	P (+ Clonazepam)
#2	F	22	50	1,70	400	M
#3	M	17	65	1,78	400	M
#4	M	36	75	1,85	400	M
#5	F	25	53	1,61	600	M
#6	F	38	64	1,68	600	M

La Tabla 4-10 muestra las concentraciones, tanto en plasma como en saliva, de CBZ encontradas en cada muestreo de los seis pacientes que completaron el esquema. Los mismos resultados, pero para el metabolito activo E-CBZ, se presentan en la Tabla 4-11.

Durante el tiempo que estuvieron afectados al presente estudio, no se registraron crisis convulsivas para ningún paciente y ninguno declaró haber experimentado algún síntoma relacionado con el cambio de marca.

**Tabla 4-10.** Resultados obtenidos en seis pacientes medicados con CBZ 200 mg. Se presentan las concentraciones plasmáticas y salivales de CBZ obtenidas en cada una de las cuatro extracciones, su cociente (S/P) y el promedio por marca. También el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (% UPP), estimado de acuerdo a la expresión  $\% \text{ UPP} = (1 - (S/P)) * 100$ . En blanco están las filas correspondientes al producto Test (T) y en gris a la Referencia (R)

Carbamazepina							
ID Paciente	Marca - Extracción	PLASMA (P)		SALIVA (S)		Cociente S/P	% UPP estimado
		Conc. (µg/ml)	Prom x marca	Conc. (µg/ml)	Prom x marca		
#1 <sup>†</sup>	T - 1	6,3202		1,2837		0,2031	79,7
	T - 2	5,9057	6,1129	1,0804	1,1821	0,1830	81,7
	R - 3	8,8819	8,3276	1,4679	1,4812	0,1653	83,5
	R - 4	7,7733		1,4945		0,1923	80,8
#2 <sup>‡</sup>	T - 1	2,4466		0,7724		0,3157	68,4
	T - 2	3,0084	2,7275	0,7794	0,7759	0,2591	74,1
	R - 3	5,5272	4,9662	1,4530	1,3528	0,2629	73,7
	R - 4	4,4051		1,2527		0,2844	71,6

#3†	T - 1	4,2214	3,2856	0,8656	0,7303	0,2051	79,5	
	T - 2	2,3499		0,5950		0,2532	74,7	
	R - 3	4,6773	4,5198	1,0012		1,0038	0,2141	78,6
	R - 4	4,3623	1,0064	0,2307		76,9		
#4‡	T - 1	2,3490	2,7525	0,7096	0,8330	0,3021	69,8	
	T - 2	3,1560		0,9563		0,3030	69,7	
	R - 3	4,7896	4,9784	1,0587		1,1330	0,2210	77,9
	R - 4	5,1672	1,2073	0,2336		76,6		
#5†	T - 1	6,9417	7,1685	1,4351	1,3922	0,2067	79,3	
	T - 2	7,3952		1,3493		0,1825	81,8	
	R - 3	8,5769	8,7064	1,5572		1,6058	0,1816	81,8
	R - 4	8,8359	1,6543	0,1872		81,3		
#6†	T - 1	5,1281	5,4156	1,0973	1,1667	0,2140	78,6	
	T - 2	5,7030		1,2360		0,2167	78,3	
	R - 3	8,3849	8,3951	1,6082		1,1821	0,1918	80,8
	R - 4	8,4053	1,4670	0,1745		82,5		
<b>Promedio =</b>						<b>0,2243</b>	<b>77,57%</b>	

† Dosis diaria: 600 mg - ‡ Dosis diaria: 400 mg

**Tabla 4-11.** Resultados obtenidos en seis pacientes medicados con CBZ 200 mg. Se presentan las concentraciones plasmáticas y salivales del metabolito activo E-CBZ obtenidas en cada una de las cuatro extracciones, su cociente (S/P) y el promedio por marca. También el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas (% UPP), estimado de acuerdo a la expresión  $\% \text{ UPP} = (1 - (S/P)) * 100$ . En blanco están las filas correspondientes al producto Test (T) y en gris a la Referencia (R)

#### 10,11-Epóxido de Carbamazepina

ID Paciente	Marca - Extracción	PLASMA (P)		SALIVA (S)		Cociente S/P	% UPP estimado	
		Conc. (µg/ml)	Prom x marca	Conc. (µg/ml)	Prom x marca			
#1†	T - 1	1,7000	1,7373	0,8124	0,8005	0,4778	52,2	
	T - 2	1,7746		0,7887		0,4444	55,6	
	R - 3	2,4493	2,2081	1,2347		1,0252	0,5041	49,6
	R - 4	1,9668	0,8158	0,4148		58,5		
#2‡	T - 1	0,7309	0,7823	0,4034	0,3944	0,5520	44,8	
	T - 2	0,8337		0,3854		0,4623	53,8	
	R - 3	1,0872	1,0057	0,6801		0,6392	0,6256	37,4
	R - 4	0,9241	0,5982	0,6473		35,3		
#3‡	T - 1	0,4968	0,4305	0,3492	0,2489	0,7029	29,7	
	T - 2	0,3641		0,1486		0,4081	59,2	
	R - 3	0,4548	0,4135	0,2935		0,2781	0,6452	35,5
	R - 4	0,3722	0,2628	0,7062		29,4		
#4‡	T - 1	0,5833	0,6253	0,2760	0,2918	0,4732	52,7	
	T - 2	0,6672		0,3076		0,4610	53,9	
	R - 3	1,2507	1,3058	0,5670		0,5821	0,4533	54,7
	R - 4	1,3608	0,5972	0,4389		56,1		
#5†	T - 1	1,8433	1,8471	0,9066	0,8717	0,4918	50,8	
	T - 2	1,8508		0,8367		0,4521	54,8	
	R - 3	2,3561	2,3775	1,0397		1,0791	0,4413	55,9
	R - 4	2,3988	1,1184	0,4662		53,4		
#6†	T - 1	1,4280	1,4759	0,6431	0,7224	0,4504	55,0	
	T - 2	1,5237		0,8017		0,5262	47,4	
	R - 3	2,1087	2,0565	0,9642		0,9565	0,4572	54,3
	R - 4	2,0042	0,9487	0,4734		52,7		
<b>Promedio =</b>						<b>0,5073</b>	<b>49,28%</b>	

† Dosis diaria: 600 mg - ‡ Dosis diaria: 400 mg

La última fila de las dos tablas anteriores muestra el promedio general (todos los pacientes, todos los periodos) obtenido para el cociente S/P y para el % UPP. Este último valor, calculado como  $(1 - (S/P)) * 100$ , coincide con los valores bibliográficos citados al inicio de este capítulo, donde se estableció un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas aproximado al 75% para CBZ y al 50% para E-CBZ (*Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004*).

Los resultados comparativos entre los dos productos evaluados, T y R, se presentan en las Figuras 4-6 y 4-7. La primera compara los niveles plasmáticos promedio de CBZ y E-CBZ, de cada paciente en cada período, mientras que la segunda representa lo mismo pero utilizando los niveles salivales.

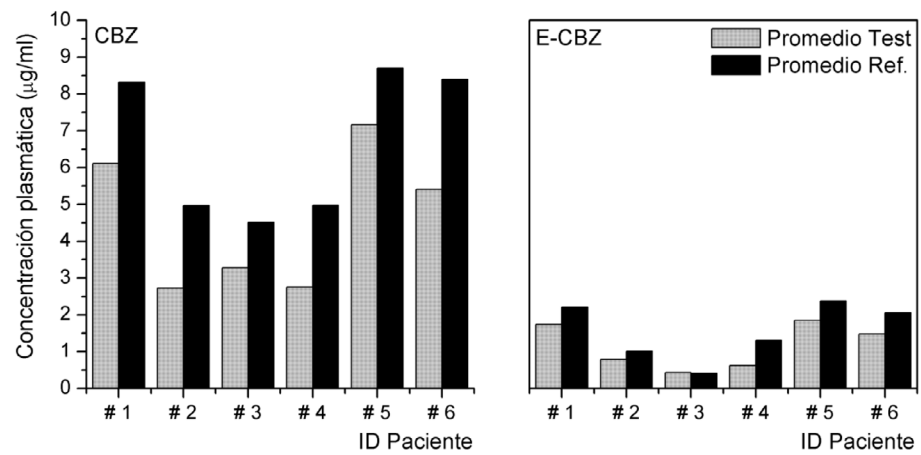


Figura 4-6. Niveles plasmáticos promedio encontrados en los seis pacientes en cada período. El gráfico de la izquierda corresponde a niveles de CBZ y el de la derecha a los de E-CBZ. En ambos casos, las barras grises representan al producto T y las negras al de referencia (R, Tegretol)

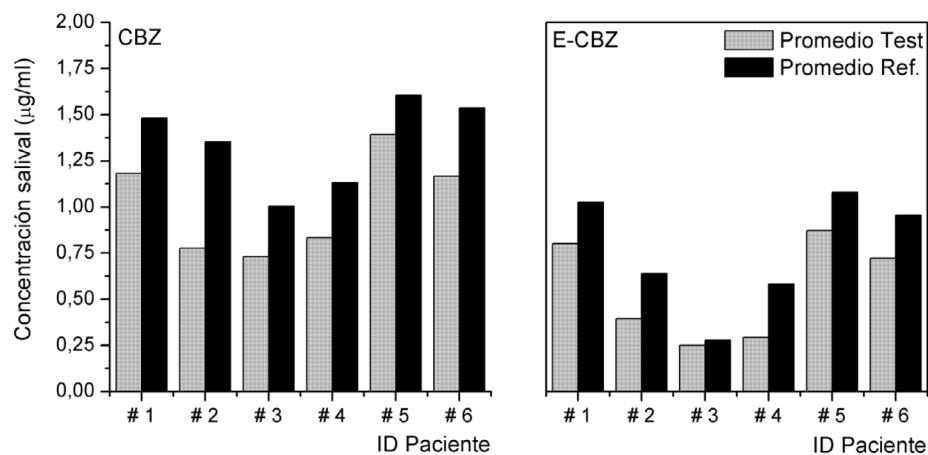


Figura 4-7. Niveles salivales promedio encontrados en los seis pacientes en cada período. El gráfico de la izquierda corresponde a niveles de CBZ y el de la derecha a los de E-CBZ. En ambos casos, las barras grises representan al producto T y las negras al de referencia (R, Tegretol)

Para analizar estadísticamente los datos que se muestran en las Tablas 4-10 y 4-11 previamente fue necesario normalizarlos por las dosis, ya que los distintos pacientes se encontraban recibiendo diferentes dosis. Dicha normalización se calculó como C/D, es decir, las concentraciones medidas (C, plasmática o salival, de CBZ o de E-CBZ, según correspondiera) divididas por la dosis (D, expresada en g/día). Para los pacientes #1, #5 y #6, D = 0,6 mientras que para los pacientes #2, #3 y #4, D = 0,4.

Con los datos así normalizados, se llevó a cabo un ANAVA, en el que cada producto (Test y Referencia) se consideró un tratamiento, con dos réplicas para cada individuo (cada una de las dos extracciones), y considerando a los individuos como único criterio de bloque. En total se realizaron cuatro ANAVA que se presentan en la Tabla 4-12: para CBZ y para E-CBZ, tanto en plasma como en saliva. Por último, y para reforzar los resultados obtenidos, en la Tabla 4-13 se comparan las medias para cada tratamiento (Test vs. Referencia) mediante los test estadísticos de Fisher (o prueba LSD, *least significant difference*) y de Tukey (o prueba HSD, *honestly significant difference*).

**Tabla 4-12.** Análisis de Varianza de las concentraciones medidas en los seis pacientes, en plasma y saliva, tanto de CBZ como de E-CBZ. Se consideran dos tratamientos, Test y Referencia, y a los individuos como bloques. Un p-valor < 0,01 indica diferencias significativas entre los niveles del factor en cuestión

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
<b>PLASMA</b>					
<b>Carbamazepina</b>					
Tratamientos	108,095	1	108,095	61,234	4,92.10 <sup>-7</sup>
Individuos	46,137	5	9,227	5,227	0,0044
Error	30,010	17	1,765		
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
Tratamientos	2,792	1	2,792	10,883	0,0042
Individuos	11,816	5	2,363	9,211	0,0002
Error	4,362	17	0,257		
<b>SALIVA</b>					
<b>Carbamazepina</b>					
Tratamientos	3,183	1	3,183	37,807	1,07.10 <sup>-5</sup>
Individuos	7,470	5	1,494	17,745	3,25.10 <sup>-6</sup>
Error	1,431	17	0,084		
<b>10,11-Epóxido de Carbamazepina</b>					
Tratamiento	1,201	1	1,201	20,910	0,0003
Individuos	7,386	5	1,477	25,728	2,28.10 <sup>-7</sup>
Error	0,976	17	0,057		

Tabla 4-13. Comparaciones pareadas de las concentraciones promedio, de CBZ y E-CBZ, tanto en plasma como en saliva, con cada uno de los dos tratamientos T y R. Se aplican dos métodos de comparación: test de Fisher (o prueba LSD) y de Tukey (o prueba HSD). Un p-valor < 0,01 significa que las medias comparadas difieren significativamente. IC 95%: intervalo del 95% de confianza

	Carbamazepina		10,11-Epóxido de Carbamazepina	
	PLASMA	SALIVA	PLASMA	SALIVA
Diferencia promedio  T - R	4,245	0,728	0,682	0,447
$\Delta$ LSD	1,145	0,250	0,437	0,206
p-valor	<b>4,92.10<sup>-7</sup></b>	<b>1,07.10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0042</b>	<b>0,0003</b>
IC 95%	3,100 - 5,389	0,478 - 0,978	0,245 - 1,119	0,241 - 0,653
$\Delta$ HSD	1,143	0,249	0,436	0,205
p-valor	<b>1,34.10<sup>-5</sup></b>	<b>2,32.10<sup>-5</sup></b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0003</b>
IC 95%	3,102 - 5,388	0,479 - 0,977	0,246 - 1,118	0,242 - 0,652

Como puede verse en las tablas anteriores, los tratamientos produjeron resultados significativamente diferentes en todos los casos o, dicho de otro modo, las concentraciones de CBZ y E-CBZ encontradas luego de cada uno de los tratamientos, Test y Referencia, pueden considerarse estadísticamente diferentes, sea que se determinen en plasma o en saliva.

Si bien puede parecer que estos resultados avalan la hipótesis inicial de que los estudios de BE promedio en voluntarios sanos no son suficientes para garantizar la intercambiabilidad en pacientes estabilizados, también podrían ser indicativos de otro hecho: que los productos ensayados no eran BE promedio. Y precisamente esto último era lo más probable, dada la (gran) magnitud de la diferencia encontrada en las concentraciones logradas con uno y otro tratamiento y el hecho de que la tendencia ( $R > T$ ) se manifestó invariante en todos los casos.

Si hubiera sido cierta la hipótesis planteada, el resultado esperado era inequivalencia en *algunos* pacientes, para quienes el estudio BE promedio no hubiera logrado garantizar la intercambiabilidad de los productos R y T. Los resultados obtenidos no solo mostraron una gran diferencia estadística entre los tratamientos, sino que *todos* los pacientes mostraron la *misma* tendencia para los dos analitos en ambos fluidos.

Por lo anterior, se decidió suspender este ensayo y plantear el que se describe a continuación, ya que de ser cierto que los productos T y R no eran BE promedios en voluntarios sanos, los resultados obtenidos al trabajar con pacientes sólo reflejarían ese hecho, sin permitir ninguna conclusión acerca de la idoneidad o no de los estudios de BE promedio para garantizar la eficacia y la seguridad de los intercambios de medicamentos en pacientes en tratamiento con un fármaco determinado.

### 4.3 Estudio de BDR de comprimidos de CBZ 200 mg en voluntarios sanos

#### Descripción y objetivos

##### ● Diseño del estudio

Se evaluó la biodisponibilidad relativa de cuatro productos comerciales de comprimidos de CBZ 200 mg, liberación inmediata (productos A\*, B, C y D), en voluntarios sanos, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado de cuatro períodos, empleando saliva como fluido biológico. Entre períodos se dejó pasar 15 días de manera de asegurar un lavado de al menos 7 veces la vida media del fármaco, estimada entre 18 y 50 horas (*Clarke's analysis of drugs and poisons*, 2004).

Los productos evaluados fueron:

- producto A (Referencia): Tegretol, Lab. Novartis Argentina SA (Lote: 343362, Vto.: 10/2008)
- producto B: Carbamazepina Denver Farma, Lab. Denver Farma SA (Lote: 50105, Vto.: 01/2008)
- producto C: Carbamazepina Bouzen, Lab. Bouzen SACIFIAF (Lote: 0243, Vto.: 02/2010)
- producto D: CMP 200, Lab. Klonal SRL (Lote: 1637, Vto.: 12/2008)

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* (EMEA/CPMP, 2002). El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de La Plata (*ver Anexo III*) y todos los voluntarios dieron su consentimiento, informado por escrito y frente a un testigo.

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

##### ● Sujetos y toma de muestras

Los voluntarios participantes del estudio debían cumplir las siguientes condiciones: edad entre 18 y 40 años, peso dentro del 15% del peso ideal, no fumadores y en el caso de las mujeres no debían estar 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).

Por otro lado, los voluntarios no debían estar bajo ningún tratamiento farmacológico y no debían poseer antecedentes de alergia a medicamentos. Se les indicó que no tomaran ningún tipo de medicación desde 15 días antes y hasta la finalización del estudio, y también debieron abstenerse de ingerir bebidas alcohólicas o bebidas conteniendo xantinas durante las 48 horas previas y durante cada período del estudio.

Luego de la administración del producto correspondiente y durante los dos días posteriores a dicha administración se interrogó a los voluntarios para detectar cualquier efecto o reacción adversa que pudiera presentarse.

Al iniciar cada período, antes de la administración ( $T_0$  o pre-dosis) se tomó una muestra salival de cada voluntario. Luego cada voluntario recibió una dosis única del producto correspondiente de CBZ 200 mg a las 8 de la mañana. A continuación, las muestras fueron recolectadas a los siguientes tiempos: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 10; 12; 24; 36; 48 y 84 horas post-dosis.

Luego de la administración del comprimido correspondiente, la boca fue enjuagada exhaustivamente con agua. Para la toma de muestra, que se colectó en recipientes plásticos adecuados, se permitió a los voluntarios masticar un trozo de parafilm a fin de estimular la salivación. La saliva colectada se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se almacenó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su análisis. El mismo se llevó a cabo mediante la técnica por HPLC descrita en la sección 4.1 del presente capítulo.

#### ● Análisis farmacocinético

El área bajo la curva de concentración vs. tiempo de cada voluntario en cada período se calculó según el método de los trapecios, desde cero hasta 84 horas ( $ABC_{0-t}$ ). A partir de allí, el área desde cero a infinito ( $ABC_{0-inf}$ ) se calculó sumando a  $ABC_{0-t}$  el término resultante de la extrapolación desde 84 h hasta infinito (calculado dividiendo la concentración del último tiempo por la constante de eliminación,  $K_e$ ).

La concentración salival máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo correspondiente a dicha concentración ( $T_{max}$ ) se obtuvieron por inspección directa de los perfiles.  $K_e$  se calculó (-) como la pendiente de la recta obtenida haciendo la regresión lineal por cuadrados mínimos de los últimos puntos de cada curva, ln-transformados, vs. tiempo.

### Resultados y discusión

El estudio comenzó con un grupo de diez voluntarios sanos, de ambos sexos, pero sólo ocho (3 mujeres y 5 hombres) lo completaron; dos abandonaron por razones personales no relacionadas al estudio. Para esos ocho voluntarios, la edad, peso y altura promedio [rango] fueron: 31,8 [27-33] años, 73,3 [52-86] kg y 1,75 [1,60-1,90] m, respectivamente.

Durante el interrogatorio realizado luego de la administración de cada producto (y durante los dos días posteriores), solo en una oportunidad un voluntario declaró sentir el ritmo cardíaco acelerado (taquicardia), pero no fue necesario tomar ninguna medida ya que dicho efecto remitió al poco tiempo (30 minutos aproximadamente). Este episodio no se consideró en el análisis posterior por no tratarse de un efecto adverso típico de CBZ.

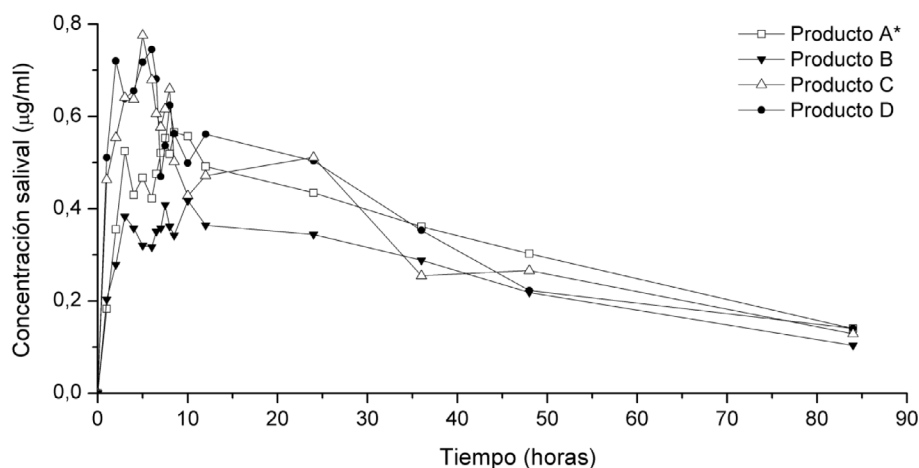
La Tabla 4-14 muestra los parámetros farmacocinéticos en saliva (promedio de los ocho voluntarios) obtenidos para cada una de las cuatro formulaciones ensayadas: concentración máxima lograda ( $C_{max}$ ), tiempo correspondiente a dicha  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ), área bajo la curva desde cero hasta 84 horas ( $ABC_{0-t}$ ), área bajo la curva desde cero hasta infinito ( $ABC_{0-inf}$ ), constante de eliminación ( $K_e$ ) y semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ).

**Tabla 4-14.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral de cuatro formulaciones de CBZ 200 mg comprimidos de liberación inmediata a ocho voluntarios sanos (producto A\* -Referencia, Tegretol- B, C y D). Los valores presentados para cada producto son el promedio de todos los voluntarios (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 A*	Producto B	Producto C	Producto D
<b>Cmax (mg/L)</b>				
Media (SD)	0,684 (0,181)	0,499 (0,224)	0,970 (0,217)	0,899 (0,183)
Rango	0,452 - 0,975	0,242 - 0,904	0,716 - 1,312	0,662 - 1,187
<b>Tmax (h)</b>				
Mediana	7,5	10,0	4,5	6,25
Rango	3,0 - 10,0	3,0 - 24,0	2,0 - 6,5	2,0 - 8,0
<b>ABC<sub>0-t</sub> (mg.h/L)</b>				
Media (SD)	27,61 (6,66)	20,80 (7,78)	28,49 (5,25)	27,26 (5,91)
Rango	18,27 - 37,12	10,65 - 35,52	24,09 - 40,51	20,83 - 35,70
<b>ABC<sub>0-inf</sub> (mg.h/L)</b>				
Media (SD)	35,76 (10,27)	26,23 (9,89)	39,34 (15,14)	34,38 (8,94)
Rango	21,86 - 49,74	13,13 - 42,43	28,73 - 75,09	23,19 - 36,59
<b>Cmax/ABC<sub>0-t</sub> (1/h)</b>				
Media (SD)	0,025 (0,006)	0,024 (0,007)	0,034 (0,008)	0,033 (0,005)
Rango	0,018 - 0,034	0,016 - 0,035	0,026 - 0,049	0,025 - 0,042
<b>Ke (1/h)</b>				
Media (SD)	0,020 (0,005)	0,022 (0,005)	0,021 (0,008)	0,024 (0,007)
Rango	0,012 - 0,028	0,012 - 0,026	0,006 - 0,033	0,012 - 0,033
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>				
Media (SD)	37,40 (11,59)	34,09 (10,57)	42,39 (15,80)	32,11 (11,95)
Rango	24,94 - 56,69	25,32 - 58,87	20,79 - 84,97	21,03 - 55,55

En la Figura 4-8 se muestran los perfiles promedio de cada una de las especialidades ensayadas.

**Figura 4-8.** Perfiles promedio de concentración salival vs. tiempo obtenidos luego de la administración de cuatro especialidades medicinales diferentes (A\*, B, C y D) de CBZ 200 mg, comprimidos de liberación inmediata (el asterisco denota el producto de referencia, Tegretol)





Se calcularon los IC del 90% para los cocientes Test/Referencia de los parámetros farmacocinéticos (ln-transformados)  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$  y  $C_{max}/ABC_{0-t}$ . Para cada parámetro estudiado, se hizo primero un ANAVA con los datos ln-transformados de cada uno de los tres pares de productos (B/A, C/A y D/A), discriminando así los efectos debidos a los Tratamientos, Individuos y Períodos ensayados, y calculando a partir de allí la varianza residual empleada en el cálculo de los IC del 90%. También se evaluó el efecto Secuencia, pero no se tuvo en cuenta en los ANAVA definitivos debido a que la suma de cuadrados era despreciable respecto a los demás efectos, mientras que la pérdida de un grado de libertad en el error (el número total de grados de libertad es ocho) resultaba en un aumento excesivo de la varianza residual. Dichos resultados se muestran en la Tabla 4-15.

**Tabla 4-15.** Análisis de Bioequivalencia. Se presentan los cocientes Test/Referencia obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos Intervalos de Confianza (IC) del 90%

Parámetro	Prod. B / Prod. A (N = 8)	Prod. C / Prod. A (N = 8)	Prod. D / Prod. A (N = 8)
<b>C<sub>max</sub> (mg/L)</b>			
Cociente T/R	0,730	1,418	1,314
IC 90%	48,8 - 98,1	125,7 - 162,9	106,7 - 166,1
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>			
Cociente T/R	0,753	1,032	0,987
IC 90%	52,4 - 100,8	91,2 - 120,1	84,6 - 116,6
<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>			
Cociente T/R	0,734	1,100	0,961
IC 90%	51,6 - 98,6	86,1 - 138,2	80,6 - 117,0
<b>C<sub>max</sub>/ABC<sub>0-t</sub></b>			
Cociente T/R	0,967	1,363	1,322
IC 90%	80,0 - 113,5	109,4 - 170,9	105,3 - 170,6

De la Tabla 4-15 se concluye, en primer lugar, que ninguna de las tres especialidades ensayadas es BE al producto de Referencia. Si bien para algunos de los parámetros farmacocinéticos evaluados los IC 90% caen dentro de la zona de aceptación (80-125%), ningún producto tiene todos sus parámetros dentro de dicha zona, o al menos uno de velocidad y uno de cantidad de manera simultánea. La Figura 4-9 muestra en forma esquemática los resultados anteriores.

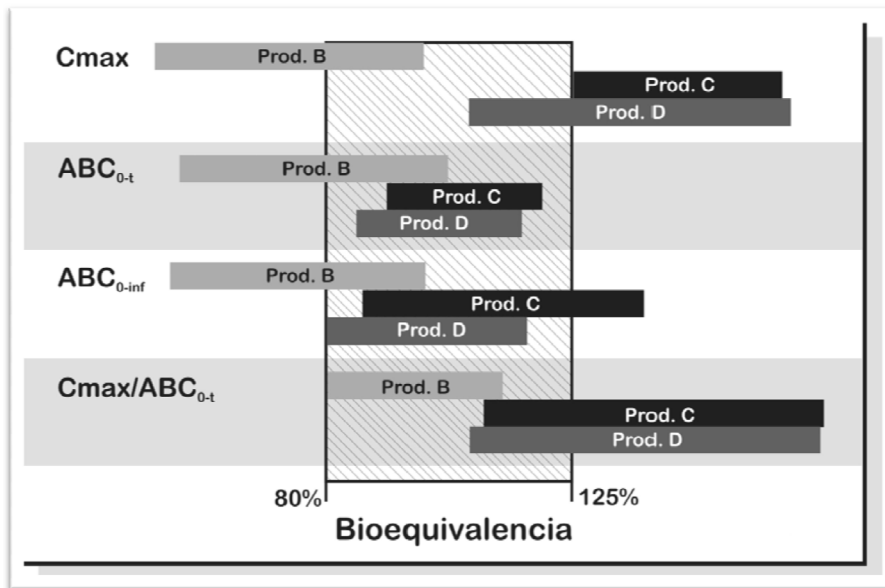


Figura 4-9. Resultados del estudio de BE entre tres productos (B, C y D) de CBZ 200 mg contra el producto de referencia, Tegretol (A). El rectángulo limitado por los valores 80-125% (rayas oblicuas en la figura) indica la zona de BE. Las barras horizontales, denominadas con los nombres de los productos ensayados, representan los IC 90% obtenidos para dichos productos, para cada uno de los parámetros farmacocinéticos evaluados (se indican a la izquierda del gráfico)

Con el producto B se obtuvieron valores de  $C_{max}$  y ABC (ambas ABC) significativamente menores que los de la referencia. Sin embargo, cuando  $C_{max}$  es dividido por  $ABC_{0-t}$ , convirtiéndose en un parámetro indicativo de velocidad, el producto B resultó BE a la referencia. Considerado a un nivel fisiológico, esto indicaría que la cinética de absorción es similar –la  $C_{max}$  se logra a un tiempo similar–, sin embargo la cantidad disponible al individuo es menor, y por eso los menores valores de  $C_{max}$  y de ABC.

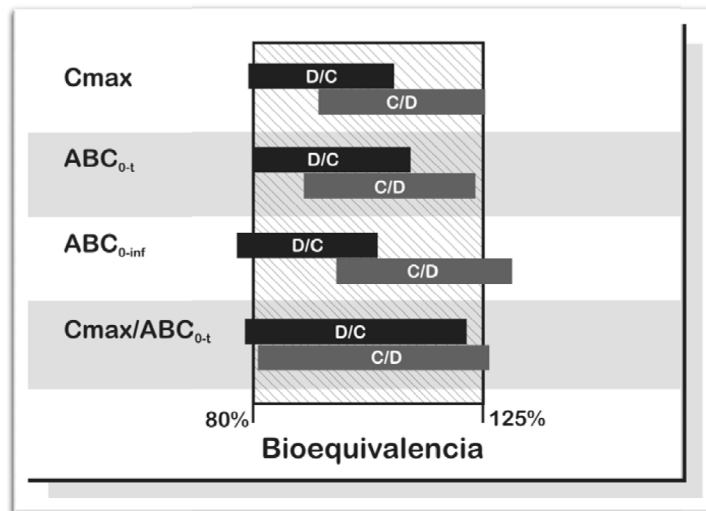
Con los productos C y D se observa exactamente lo contrario: en los parámetros indicadores de velocidad,  $C_{max}/ABC_{0-t}$  y  $C_{max}$  (este último se considera un parámetro mixto, indicador tanto de tiempo/velocidad como de cantidad), ambos productos produjeron resultados significativamente mayores al producto de referencia. Sin embargo, en cuanto a los parámetros de cantidad (ABC), el resultado fue diferente: el producto D resultó BE a la referencia para ambas ABC, mientras que C lo fue solo para  $ABC_{0-t}$ .

Cuando se repitieron los cálculos de BE, pero solamente entre los productos C y D, tomando alternativamente a cada uno como referencia, se obtuvieron los resultados que muestra la Tabla 4-16.

**Tabla 4-16.** Análisis de BE entre los productos C y D. En cada caso, se presentan los cocientes Test/Referencia obtenidos con los valores ln-transformados de los parámetros farmacocinéticos y sus respectivos IC 90%

Parámetro	Test = Prod. C Ref. = Prod. D (N = 8)	Test = Prod. D Ref. = Prod. C (N = 8)
<b>C<sub>max</sub> (mg/L)</b>		
Cociente T/R	1,079	0,927
IC 90%	92,2 - 125,3	79,8 - 108,5
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>		
Cociente T/R	1,045	0,957
IC 90%	89,8 - 123,7	80,8 - 111,4
<b>ABC<sub>0-inf</sub></b>		
Cociente T/R	1,144	0,874
IC 90%	96,1 - 131,3	76,1 - 104,0
<b>C<sub>max</sub>/ABC<sub>0-t</sub></b>		
Cociente T/R	1,031	0,970
IC 90%	81,4 - 127,8	78,2 - 122,9

Si bien los productos C y D no resultan BE entre sí, independientemente de cuál de ellos es considerado referencia, es evidente una gran semejanza en sus desempeños, como muestra esquemáticamente la Figura 4-10.



**Figura 4-10.** Resultados del estudio de BE entre los productos C y D. El rectángulo limitado por los valores 80-125% (rayas oblicuas en la figura) indica la zona de BE. Las barras horizontales negras corresponden a los IC 90% calculados para el parámetro correspondiente (indicado a la izquierda del gráfico) cuando se toma al producto C como la Referencia. Las barras horizontales grises son el caso contrario, D como Referencia

## Discusión y conclusiones parciales

Este capítulo, dedicado al principio activo Carbamazepina, comenzó con el ensayo planteado en pacientes: monitoreos en estado estacionario cuando se administraban dos especialidades medicinales diferentes. Los resultados, expresados como concentraciones plasmáticas y salivales, tanto de CBZ como de su metabolito activo E-CBZ, fueron significativamente diferentes entre los productos estudiados. Pero dicha diferencia, más que avalar la hipótesis de que productos BE promedio no son intercambiables en todos los pacientes estabilizados, parecía estar indicando otro hecho: que los productos ensayados no eran BE promedio. Por ello se planteó el ensayo en voluntarios que, entre otras cosas, demostró que los productos administrados a los pacientes no cumplían con la prueba de BE promedio.

La bioinequivalencia encontrada entre los productos analizados podría tener múltiples explicaciones, entre ellas:

- falta de homogeneidad entre lotes, lo que puede causar que los lotes empleados aquí de cualquiera de los cuatro productos de CBZ 200 mg difieran respecto a los lotes utilizados para los ensayos de BE pre-comercialización;
- modificación de alguna etapa/materia prima en el proceso de producción;
- procesos de biocaducidad.

Muchos de los problemas con formulaciones de CBZ que se encuentran en la literatura se deben al efecto inesperado de la humedad sobre los comprimidos. El reporte de Bell y colaboradores, presentado en la Tabla 4-1, es un ejemplo de la pérdida de potencia de una FG de CBZ por efecto de la humedad (Bell et al., 1993). Otro ejemplo clásico es el informado por Meyer y colaboradores: en 1988 aparecieron reportes acerca de problemas (aparición de convulsiones y hasta un caso de muerte) relacionados a una FG de CBZ, y cuando los productos se retiraron para su análisis (algunos fueron encontrados en el gabinete del baño de los pacientes) se comprobó que no sólo no cumplían con el ensayo de disolución, sino que dos de ellos presentaban una BD muy inferior al producto de referencia, mientras que otro superaba en BD a la referencia (Meyer et al., 1992). Si bien las FG habían demostrado su BE respecto al líder, con posterioridad se habían producido dos modificaciones: cambio del origen de la materia prima CBZ y reducción del tamaño de partícula de la misma.

A raíz de lo anterior, la FDA realizó el estudio del efecto de la humedad sobre los comprimidos de CBZ. Wang y colaboradores demostraron que éstos pueden perder hasta un 33% de su efectividad si son almacenados en condiciones húmedas, típicas de la mayoría de los cuartos de baño (Wang et al., 1993). Este estudio también demostró que la formulación de los comprimidos influye en su sensibilidad a la humedad. Para CBZ, se ha reportado la existencia de cuatro polimorfos (I-IV) y una forma dihidratada (Gosselin et al., 2003). Termodinámicamente, las formas anhidras se disuelven más rápido, pero en contacto con la humedad del ambiente se transforman en la forma dihidratada, más estable y menos soluble (Young & Suryanarayanan, 1991).

¿Podría ser lo anterior la causa de algunos de los resultados presentados en este capítulo? El estudio de Wang se llevó a cabo con comprimidos almacenados en frascos plásticos multidosis, que eran periódicamente abiertos en ambientes de alta humedad relativa (HR). Los comprimidos ensayados aquí permanecieron en los blíster originales

hasta el momento de su administración. Los blíster empleados en la industria farmacéutica pueden ser elaborados empleando diferentes tipos de plásticos [policloruro de vinilo (PVC), cloruro de polivinilideno (PVDC), polipropileno (PP), entre otros] siendo PVC el elegido en casi todos los casos (Pilchik, 2000). Si bien este tipo de envase brinda a los comprimidos una mayor protección contra la humedad, en comparación con un frasco o botella multidosis, posee un cierto grado de permeabilidad al vapor de agua (medida por medio del WVTR: *water-vapor transmission rate*) [Wilches et al., 2003]. Estudios han demostrado que los comprimidos envasados en blíster de PVC y PVDC con el tiempo absorben agua de manera directamente proporcional a la HR del ambiente donde son conservados (Corveleyn & Remon, 1999).

Es difícil saber si la menor BD demostrada por el producto B puede deberse al efecto de la humedad, ya que se necesitarían estudios adicionales. Pero es una hipótesis válida, sobre todo si se tiene en cuenta que, al igual que en el caso reportado por Meyer en 1992, el producto B demostró su BE respecto al producto líder Tegretol frente a la Autoridad Sanitaria Argentina (ANMAT, 2011). Además, según lo reportado por Wang en 1993, distintas formulaciones pueden presentar distinta sensibilidad a la humedad, lo que explicaría por qué solo el producto B hubiera sido afectado (ya que todos se conservaron en iguales condiciones).

Pero independientemente de la causa, el efecto fue bioinequivalencia, tanto en los voluntarios sanos como en los pacientes. Si un paciente epiléptico hubiera estado estabilizado con la formulación de referencia (A\*, o con los productos C o D) y la misma hubiese sido intercambiada por el producto B, tendría altas probabilidades de desarrollar una convulsión por falta de efecto terapéutico. Por el contrario, si hubiera estado consumiendo el producto B y éste se hubiera cambiado por A\*, C o D, posiblemente experimentaría efectos adversos relacionados al aumento de las concentraciones plasmáticas de CBZ. Existen múltiples resultados similares a éstos en la bibliografía: estudios de BE promedio entre el producto líder y una o más FG donde el resultado es de inequivalencia. La Tabla 4-17 muestra algunos ejemplos, limitándose solo a CBZ:

**Tabla 4-17.** Estudios de biodisponibilidad relativa encontrados en la literatura que involucran productos conteniendo CBZ

Cita	Descripción	Resultados principales
(Glende et al., 1983)	Dosis única (8 voluntarios) Dosis múltiple (5 pacientes)	Se observó mayor velocidad de absorción del producto genérico aunque la magnitud de la absorción fue similar en general
(Neuvonen, 1985)	Estudio cruzado en 9 voluntarios sanos	Se analizaron 5 productos de CBZ: hubo diferencias significativas de hasta 7 veces en la BD total y efectos adversos (mareos, ataxia) generados por los productos de rápida absorción
(Hartley et al., 1990)	Estudio cruzado doble ciego en 23 niños	Los niños fueron tratados con Tegretol y una FG de CBZ por 6 semanas. No cambió el control de las convulsiones, pero la FG produjo significativamente más efectos neurológicos adversos, aunque sin diferencias en los niveles plasmáticos

<i>(Reunanen et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 21 pacientes	BD comparativa en dosis múltiple de productos de liberación prolongada. Se encontraron diferencias significativas en la BD (la FG 11% mayor a Tegretol Retard). Más convulsiones con el producto de marca, aunque la diferencia no fue significativa
<i>(Wolf et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 10 pacientes en monoterapia con CBZ	Se compararon tres FG. Pequeñas diferencias en los valores medios de los parámetros farmacocinéticos, pero grandes diferencias entre individuos. Con una de las FG se redujeron las convulsiones en un paciente pero aumentó la toxicidad
<i>(Meyer et al., 1992)</i>	Estudio cruzado en 24 voluntarios sanos	Se encontró un amplio rango de BD entre FG retiradas del mercado por denuncias de fallas clínicas. Respecto a Tegretol, la Cmax media fue del 61-74% en dos FG y de 142 en otra. Las ABC medias fueron entre el 60-113% respecto a Tegretol
<i>(Silpakit et al., 1997)</i>	Estudio cruzado en 18 pacientes	Se compararon los parámetros farmacocinéticos de tres FG respecto a Tegretol. Una FG no resultó BE (IC 90% para ABC fuera del 80-125% de Tegretol)
<i>(Jung et al., 1997)</i>	Estudio cruzado en 12 voluntarios sanos	Se analizaron tres productos del mercado mejicano respecto al líder Tegretol. Respecto a Tegretol, la Cmax de los demás productos fue entre un 13-40% mayor ( $p < 0,05$ ) y las ABC entre un 7-24% mayores también a Tegretol ( $p < 0,05$ )
<i>(Meyer et al., 1998)</i>	Estudio cruzado en 18 voluntarios sanos	Se compararon tres FG contra Tegretol. Los IC 90% para la Cmax de los FG estuvieron entre el 111-126% y para ABC entre el 97-108%. Las FG se absorbieron más rápido que Tegretol
<i>(Olling et al., 1999)</i>	Estudio en 18 voluntarios sanos	Se analizaron los parámetros farmacocinéticos de tres FG más Tegretol y se compararon con la incidencia de efectos adversos. El efecto principal (mareo, vértigo) fue proporcional a la variación en la velocidad de absorción

La tabla resume ejemplos de situaciones de no equivalencia entre productos de CBZ, es decir, situaciones de riesgo para los pacientes por consumir productos no BE. Pero también resulta interesante analizar otro aspecto riesgoso para los pacientes medicados con FEMT: las diferencias en la BD manifestadas en algunos individuos, aun cuando el resultado global entre los productos analizados sea de BE. Por ejemplo, en un estudio de BE en el que se demostró BEM trabajando con un grupo de 40 pacientes, se observó que un cuarto de ellos (25%) presentaba variaciones de ABC mayores al 20%, llegando a diferencias tan grandes como el 53% (Crawford et al., 2006).

Para analizar esas situaciones de no-equivalencia individuales se realizaron simulaciones de estudios de BEM para productos de CBZ 200 mg, aplicando la misma metodología descrita en la sección 3.3 del capítulo anterior. Se simularon los valores de  $ABC_{0-inf}$  (calculados según  $ABC = F \cdot D / Vd \cdot Ke$ ), y para ello se aleatorizaron los valores del volumen de distribución (Vd), la constante de eliminación (Ke) y la fracción absorbida (F). En todos los casos la dosis (D) fue 200 mg. Para cada estudio de BEM simulado el programa arrojó doce valores aleatorios (correspondientes a 12 voluntarios) de Vd, Ke,  $F_R$  y  $F_T$ , con los que se calcularon 24 valores ABC (12 con  $F_R$  y 12 con  $F_T$ ).

Se simularon cuatro situaciones diferentes:

- caso 1: Igual BD de R y T ( $F_R = F_T = 0,85$ ;  $\Delta F_{R-T} = 0$ )
- caso 2:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,85$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,05$ )
- caso 3:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,80$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,10$ )
- caso 4:  $F_T = 0,9$ ,  $F_R = 0,75$  ( $\Delta F_{R-T} = 0,15$ )

En cada caso se permitió una variación del 10% de los valores de F. El Vd se aleatorizó alrededor del valor población 1,4 L/kg (se consideró un peso promedio de 70 kg) con un CV = 20%, y la Ke alrededor de 0,022 h<sup>-1</sup> también con un CV del 20% (Clarke's analysis of drugs and poisons, 2004; Armijo et Herranz, 1998). Para cada BEM simulada se realizó el ANAVA con los valores de ABC y se calculó el IC 90% de la media geométrica. En cada simulación se registraron los valores de: ABC<sub>T</sub> y ABC<sub>R</sub> medios, error cuadrático medio ( $S^2_{error}$ ), límite superior e inferior del IC 90% y número de voluntarios con diferencias en sus valores de ABC > al 20, 30 y 40%. Como una forma de corroborar los valores empleados, se verificó que tanto las ABC como los CV de las mismas, calculadas a partir de dichos valores, fueran del orden de valores experimentales reales (Jung et al., 1997; Meyer et al., 1992; Olling et al., 1999). En la Tabla 4-18 se presentan los resultados finales, luego de realizar 250 simulaciones para cada situación planteada:

**Tabla 4-18.** Estudios simulados por computadora de biodisponibilidad relativa de comprimidos conteniendo 200 mg de CBZ. Se informa el número de voluntarios con diferencias de ABC > al 20, 30 y 40% encontrados en las simulaciones BE y en las no-BE (entre paréntesis se indica el % que representan sobre el total de situaciones de BE/no-BE)

	<b>Caso 1</b> $\Delta F_{R-T} = 0$	<b>Caso 2</b> $\Delta F_{R-T} = 0,05$	<b>Caso 3</b> $\Delta F_{R-T} = 0,1$	<b>Caso 4</b> $\Delta F_{R-T} = 0,15$
<b>Simulaciones</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>	<b>250</b>
<i>Bioequivalentes</i>	248(99,2%)	229 (91,6%)	174 (69,6%)	91 (36,4%)
<i>No bioequivalentes</i>	2(0,8%)	21 (8,4%)	76 (30,4%)	159(63,6%)
<i>IC 90% (límites prom)</i>	91,55 - 110,38	95,17 - 115,27	100,81 - 121,60	106,03 - 128,00
<i>S<sup>2</sup><sub>error</sub> promedio</i>	0,0165	0,0174	0,0167	0,020
<b>Referencia</b>				
<i>ABC promedio</i>	83,07	83,40	77,25	73,58
<i>CV promedio</i>	36,8	36,7	36,2	35,8
<i>Rango</i>	17,9 - 53,7	21,4 - 60,9	14,9 - 54,6	14,0 - 69,9
<b>Test</b>				
<i>ABC promedio</i>	83,27	87,28	85,49	85,55
<i>CV promedio</i>	36,6	37,1	36,5	35,7
<i>Rango</i>	14,6 - 58,9	13,6 - 59,5	18,2 - 61,3	17,5 - 63,3

**Voluntarios**

$\Delta ABC > 20\%$	BE	870 ( <b>29,2%</b> )	844 ( <b>30,7%</b> )	633 ( <b>30,3%</b> )	320 ( <b>29,3%</b> )
	No BE	12 (50%)	124 (49,2%)	413 (45,3%)	920 (48,2%)
$\Delta ABC > 30\%$	BE	290 (9,7%)	365 (13,3%)	260 (12,4%)	121 (11,1%)
	No BE	1 (4,2%)	45 (17,9%)	185 (20,3%)	524 (27,5%)
$\Delta ABC > 40\%$	BE	35 (1,2%)	30 (1,1%)	65 (3,1%)	47 (4,3%)
	No BE	-	10 (4,0%)	75 (8,2%)	234 (12,3%)

Puede verse en la tabla anterior que los porcentajes de voluntarios con diferencias de  $ABC > 20\%$  encontrados en aquellas situaciones donde se concluye BE global (indicados con negrita en la tabla) se asemejan al 25% reportado por Crawford y colaboradores (Crawford et al., 2006).

La intercambiabilidad de medicamentos siempre se discute en términos de la prueba estadística/experimental utilizada para garantizarla o asegurarla. Extensísimas discusiones se han entablado respecto a la prueba empleada para inferir equivalencia terapéutica (discutidas con más detalle en los Capítulos 1 y 3) y, por lo tanto, certeza en el intercambio de productos. Sin embargo, independientemente del método empleado para definir intercambiabilidad, siempre van a existir situaciones de no-equivalencia, donde el intercambio esté asociado a un fracaso en la efectividad o la seguridad del tratamiento seguido por el paciente.

Cuando se trata de productos conteniendo fármacos de amplio margen terapéutico, los cambios de concentraciones plasmáticas asociados al intercambio de productos que por algún motivo no fueran BE posiblemente no serían notados por el paciente en la mayoría de los casos. Sin embargo, cuando hablamos de FEMT y más precisamente de AEDs, lo que se pone en riesgo supera con creces cualquier ahorro económico que hubiera implicado el intercambio. No sólo por el gasto ocasionado como consecuencia de la falta de efectividad/seguridad del producto introducido, como se discutió en el Capítulo 1, sino por las consecuencias no cuantificables sobre la calidad de vida del paciente.

Las consecuencias negativas de las crisis epilépticas se extienden más allá del daño que pueden causar sobre el sistema nervioso central. Los ataques tienen riesgo de causar accidentes y la ausencia de control se ha relacionado con un incremento en la mortalidad. Los pacientes con epilepsia no controlada tienen dificultades en su integración social y laboral, sufren una importante pérdida de autonomía, pierden el permiso de conducir y el temor ante la posibilidad de sufrir un ataque con frecuencia genera ansiedad, depresión y pérdida de la autoestima (García et al., 2008).

Por otro lado, las diferencias en la presentación de los medicamentos de distinto origen hace que los pacientes interpreten que se ha hecho algún cambio en su tratamiento habitual. Esto en ocasiones puede generar ansiedad, confusión y desconfianza y es difícil de cuantificar el impacto que tiene esta situación en el control de la enfermedad (García et al., 2008; Meredith, 2003). Ciertos estudios ponen de manifiesto que tanto neurólogos como pacientes desconfían de los genéricos y no tienen la percepción de que sean terapéuticamente iguales (Berg et al., 2008; Ganther & Kreling, 2000).



Todo lo anterior nos lleva a la principal conclusión de este capítulo: que no deberían intercambiarse productos conteniendo FEMT (y en particular AEDs) en pacientes estabilizados, ya que:

- a pesar de los controles establecidos por las autoridades sanitarias para asegurar la calidad biofarmacéutica de los medicamentos, es probable que siempre se puedan encontrar en el mercado productos no BE (que tal vez nunca lo fueron o que habiendo sido BE dejaron de serlo);
- siempre van a existir personas (pacientes) que experimenten diferencias en la eficacia y/o la seguridad de su tratamiento, asociadas al intercambio de un producto por otro, a pesar de que éstos hayan probado su BE según el criterio estadístico/experimental exigido;
- ninguna prueba experimental podría asegurar que dos productos se van a comportar biofarmacéutica y terapéuticamente igual frente a todas las posibles situaciones a los que sean sometidos (de conservación, de uso, estado fisio-patológico y emocional del paciente), como tampoco asegurar la misma reacción de los pacientes a la medicación.

