

03043

2  
2ej



VERDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO.  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**DISEÑO Y ANALISIS DE EXPERIMENTOS  
EN BIOEQUIVALENCIA**

**FALLA DE ORIGEN**

Tesina para obtener el Diploma de la  
Especialización en Estadística Aplicada,  
que presenta:  
Q.F.B. ALMA ROSA CORTES ARROYO

Asesorada por:  
M. en C. RAFAEL MADRID RIOS



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>i</b>
<b>I. GENERALIDADES</b> .....	<b>1</b>
1. Biodisponibilidad .....	2
2. Metodología Experimental en Pruebas de Biodisponibilidad.	
2.1 Criterios para la Selección de Sujetos .....	3
2.2 Elección de la Modalidad de Administración .....	4
2.3 Elección de Respuesta a Analizar.....	4
2.3.1 Concentración Plasmática .....	5
2.3.2 Excreción Urinaria .....	6
3. Diseño y Análisis Estadístico de Experimentos en Estudios de Biodisponibilidad .....	7
3.1 Fuentes de Variación en Estudios Realizados con Diseños Cruzados.....	8
3.2 Diseño Aleatorizado en Bloques.....	10
3.3 Diseño en Cuadro Latino.....	11
3.4 Diseño en Bloques Incompletos.....	14
3.5 Diseños Extra-Período.....	16
3.6 Cuadro Latino con Medidas Repetidas.....	17
4. Decisión de Bioequivalencia .....	18
4.1 Intervalos de Confianza de Westlake.....	20
<b>II. SECCION EXPERIMENTAL</b> .....	<b>22</b>
<b>III. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS</b>	
1. Resultados.....	24
2. Análisis de resultados.....	26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>32</b>

## **APENDICES**

Apéndice A.....	33
Apéndice B.....	41
Apéndice C.....	43
Apéndice D.....	46

<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>48</b>
-------------------------	-----------

## INTRODUCCION

En México existen aproximadamente 325 laboratorios farmacéuticos que producen miles de medicamentos, dentro de los cuales existen varios que contienen el mismo principio activo en igual o diferente forma farmacéutica. Por ejemplo, la ampicilina (antibiótico de amplio espectro) existe en más de 65 productos comerciales en diferentes presentaciones, entre otras, 25 en cápsulas, 14 en suspensión y 14 en solución inyectable. Y ya que cada uno de estos productos es producido con diferentes excipientes y procesos de fabricación, puede ocurrir que los resultados terapéuticos después de su administración sean diferentes.

El objetivo principal de las pruebas de bioequivalencia es verificar que los medicamentos nuevos (genéricos) elaborados después del medicamento innovador (estándar o producto de patente), sean equivalentes; de tal manera que no implique ningún riesgo para el paciente el ser tratado con cualquiera de ellos.

En México la Dirección General de Control de Insumos para la Salud de la Secretaría de Salud exige desde 1988, para el Registro Sanitario de Medicamentos, realizar el estudio de bioequivalencia en voluntarios, comparando con el medicamento de Nuevo Registro en México. Si existe correlación *in vivo* e *in vitro* publicada o debidamente documentada, el efectuar la prueba de disolución *in vitro* oficial podrá ser considerada por las Autoridades Sanitarias como suficiente para efecto de la demostración de bioequivalencia.(1)

En los estudios de bioequivalencia, la unidad experimental es el ser humano, por lo que debe haber una planeación detallada, la cual incluye necesariamente un diseño estadístico de experimentos que identifique la presencia de los factores que pueden influir en la respuesta y minimice la variabilidad en el estudio.

Por lo anterior, en este trabajo se analizan algunos aspectos en cuanto al diseño y análisis estadístico de experimentos, prestando siempre atención a los efectos residuales o acarreados que pueden tener algunos tratamientos sobre los administrados subsecuentemente en un mismo sujeto, ya que si bien en algunas referencias del campo biofarmacéutico se mencionan, no indican como deben evaluarse.

Es de suma importancia la evaluación de los efectos residuales en este tipo de experimentación, ya que en ocasiones es difícil lograr un período real de lavado, sobre todo cuando se trabaja con sujetos que padecen de cierta enfermedad, los cuales no pueden permanecer sin el tratamiento farmacéutico sugerido por el médico.

Aquí, se tratará un caso real, de un estudio de bioequivalencia para comparar cuatro formulaciones de diazepam (con equivalencia química), en donde una de ellas es la innovadora fabricada por un laboratorio suizo y las otras tres son formulaciones genéricas de origen Nacional,

La parte experimental a la que se hace referencia, fue realizada en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía con pacientes psiquiátricos hospitalizados, bajo un diseño Cuadro Latino balanceado para efectos residuales.

Nota: para cualquier duda con respecto a la terminología biofarmacéutica, se presenta un glosario en el apéndice D (pag.46).

## I. GENERALIDADES

Los fármacos utilizados en clínica, están disponibles para su administración en varias formas farmacéuticas. Por ejemplo un fármaco puede ser formulado para la administración oral como una tableta o cápsula o bien como una solución o suspensión. También puede ser formulado como un inyectable (intramuscular o intravenoso), como una tableta sublingual, o como un preparado para administración tópica como crema o unguento (2).

En la actualidad, existe en el mercado, un número elevado de formas farmacéuticas que contienen el mismo principio activo, lo cuál lleva al médico a tener que elegir entre uno de tantos para la prescripción de sus pacientes. Es por esto que todos los medicamentos que contengan el mismo principio activo deben ser bioequivalentes.

Bioequivalencia es un término utilizado para comparar, *in vivo*, dos o más formulaciones de medicamentos que contienen el mismo principio activo.

El que dos formulaciones que contengan el mismo principio activo sean terapéuticamente equivalentes implica que posean:

1. Equivalencia química.- Medicamentos de igual forma Farmacéutica que contengan la misma cantidad de principio activo.
2. Equivalencia biológica.- Equivalentes químicos que liberen la misma cantidad de principio activo a la circulación sanguínea. Lo cual se considerará en adelante como bioequivalencia.
3. Equivalencia terapéutica.- Equivalentes químicos que produzcan el mismo efecto terapéutico sobre un síntoma o enfermedad.

Una demostración directa de equivalencia terapéutica de dos diferentes formulaciones requeriría de una prueba clínica en donde se comparen los efectos terapéuticos, lo cual resulta difícil porque un efecto terapéutico no siempre es fácilmente medible, es por esto, que se emplea la bioequivalencia como una medida indirecta para probar la equivalencia terapéutica.

La bioequivalencia, es probada por medio de estudios de biodisponibilidad, entendiéndose por esto último la cuantificación de la cantidad y velocidad a la cual el principio activo es absorbido desde el producto farmacéutico en que fue administrado hasta la circulación sanguínea. Suponiendo, que la equivalencia biológica es también equivalencia terapéutica, esto es: dos formulaciones que no difieren mucho en la velocidad y cantidad con la cual hacen disponible el principio activo en la circulación, no diferirán mucho en su eficacia terapéutica, ya que una vez estando el fármaco en el sistema circulatorio, su distribución, metabolismo y excreción no serán influenciados por la formulación (2).

En los estudios de biodisponibilidad comparativa se busca la bioequivalencia entre la misma o diversas formas farmacéuticas, de manera que los procesos involucrados en el tránsito del fármaco en el organismo no difieran demasiado, y por tanto que la respuesta clínica sea la misma.

Un medicamento en el organismo sufre un proceso de varias etapas, por medio de las cuales es aprovechado (figura 1). Este aprovechamiento va a depender de varios factores como pueden ser entre otros: la forma farmacéutica y su proceso de fabricación; la vía de administración; y ya dentro del organismo, de diversos factores fisiológicos. Todo esto puede ayudar o perturbar el objetivo fundamental de la medicación que es el de eliminar o mitigar una enfermedad.

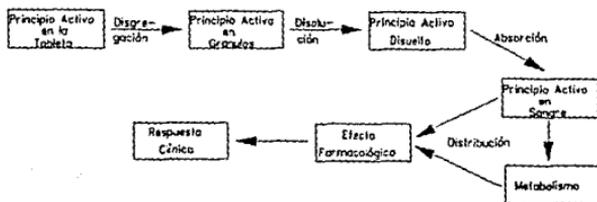


Fig 1. Eventos que influyen en la respuesta clínica de un medicamento.

Dada la gran complejidad de factores que están involucrados en los procesos de la farmacoterapia, es que existe toda una planeación de estudios que puedan llevar al uso confiable de substancias medicamentosas para lograr la salud y bienestar del paciente. Y gran parte de estos estudios se basan en la biodisponibilidad de medicamentos.

## 1. BIODISPONIBILIDAD.

Se ha definido la biodisponibilidad como la cuantificación de la cantidad y velocidad a la cual el principio activo llega al torrente circulatorio. En el caso de los medicamentos que se administran según una pauta continua, es decir de manera crónica, la cantidad total del principio activo absorbido es, por lo general, más decisiva que su velocidad de absorción. Sin embargo, para las substancias que puedan resultar efectivas después de una sola dosis, puede ser la velocidad de absorción, más que la magnitud de la misma, el parámetro más importante (3). Es por esto que dependiendo de que fármaco se trate será la elección del parámetro a estudiar.

En un estudio de biodisponibilidad comparativo, no se prejuzga la cantidad del fármaco absorbido ni la cinética de disponibilidad del principio activo contenido en los medicamentos. La comparación solo sirve para determinar la "biodisponibilidad relativa" del medicamento en estudio respecto al de referencia; es simplemente la búsqueda de la existencia de una identidad en los resultados, para ver, si existe bioequivalencia entre ellos que justifiquen su posibilidad de intercambio en prescripciones sin riesgo para el paciente (3).

## **2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL EN PRUEBAS DE BIODISPONIBILIDAD.**

La metodología experimental utilizada dependerá de los objetivos del estudio, pero existen tres cuestiones fundamentales que son: elección de sujetos, elección de la modalidad de administración y elección de la respuesta a analizar.

### **2.1 Criterios para la Selección de Sujetos.**

El elegir al hombre como sujeto de experimentación en un estudio de biodisponibilidad, es lógico cuando se trata de medicamentos destinados a la administración humana, y depende del objetivo de estudio si los sujetos seleccionados deberán ser voluntarios sanos o enfermos. La elección de voluntarios sanos ocasiona algunas veces problemas éticos, pero el utilizar voluntarios enfermos ocasiona problemas prácticos importantes debido al riesgo, a menudo inevitable, de asociaciones medicamentosas que pueden alterar la farmacocinética del fármaco en estudio, así como la alteración de su tránsito *in vivo* debido a la enfermedad. Resulta entonces que si una medicación asociada no puede ser interrumpida antes del inicio de un estudio, esta medicación deberá permanecer constante durante todo el periodo de estudio.

Los sujetos deberán ser elegidos bajo criterios muy estrictos, eliminando de la muestra, por ejemplo, aquellos que presenten una patología asociada susceptible de alterar los criterios de biodisponibilidad (insuficiencia renal, daño hepático, etc.).

Los criterios de admisión en la muestra deben ser definidos con precisión, tratando de que sea lo más homogénea posible, ya que se sabe que la variabilidad en la respuesta a un fármaco difiere en un mismo sujeto y más aún entre diferentes sujetos.

Por otra parte, los sujetos seleccionados deben ser objeto de un control clínico completo de su estado general de salud, con especial hincapié en las funciones de eliminación (hígado y riñón), el aparato digestivo y el sistema cardiovascular. Así mismo deben realizarse exámenes químicos (sangre y orina), hematológicos e incluso exploraciones funcionales concretas en función del fármaco en estudio. Todo esto para asegurarse que el sujeto no corra algún riesgo particular al someterlo al estudio y que no presente una variabilidad demasiado amplia a nivel de los resultados experimentales (3).

El factor económico siempre es importante, por lo que se tratará de que el número de individuos sea el mínimo dentro de lo requerido para un análisis estadístico válido.

## **2.2. Elección de la Modalidad de Administración.**

En un estudio de biodisponibilidad, las formas de administración pueden influir considerablemente sobre los resultados y su interpretación, por lo que ésta debe planearse de acuerdo al fármaco en estudio.

Debido a que ciertos fármacos son de toma esporádica y poco repetitiva, mientras que otros necesitan ser administrados crónicamente (dosificación repetida o múltiple), el estudio de biodisponibilidad puede ser realizado en ambas formas. La elección de estos dos métodos no solo depende del régimen normal de utilización terapéutica del medicamento, sino también de las posibilidades experimentales y de las ventajas o inconvenientes respectivos de estas modalidades de administración.

Es fundamental que la posología sea común para los distintos medicamentos a comparar. En el caso de administraciones crónicas, debe haber un intervalo de tiempo idéntico entre las tomas, respetando una misma hora de la toma para todos los sujetos y para todos los medicamentos a fin de tener en cuenta la intervención eventual de los fenómenos cronológicos (3).

Si los medicamentos se dan en forma sucesiva en un mismo sujeto, las tomas en dosis únicas deben programarse en función de la eliminación total del principio activo (período de lavado) antes de cada nueva administración; se recomienda esperar un intervalo de 7 vidas medias (tiempo al cual la concentración plasmática a disminuido el 50% de la concentración máxima alcanzada) entre cada administración de un nuevo medicamento.

En caso de dosis repetidas el período de lavado real no existe, pero el tiempo entre la administración de un medicamento y otro distinto, también depende de la vida media del fármaco.

## **2.3. Elección de Respuesta a Analizar.**

La elección de la respuesta a analizar es delicada, pues no solo depende de las posibilidades experimentales, sino también de hipótesis farmacocinéticas más o menos numerosas que influyen sobre la interpretación.

La comparación menos controversial de la biodisponibilidad de dos o más formulaciones, resulta de la observación continua de concentración plasmática vs. tiempo. Siempre que sea posible, es preferible el ensayo de muestras plasmáticas. Si no existiera un método para la determinación del fármaco en plasma o si los niveles en plasma para la dosis

normal fueran demasiado bajos para poder ser determinados, deberán utilizarse muestras de orina para el estudio, pues es esta otra manera de poder evaluar la cantidad de fármaco absorbido. Se puede analizar la cantidad del fármaco, como tal, cuando este no es metabolizado, o bien los metabolitos formados en la biotransformación del fármaco (2).

### 2.3.1. Concentración Plasmática.

Para determinar la biodisponibilidad y establecer la bioequivalencia de productos medicamentosos pueden utilizarse diferentes parámetros, los más importantes y comunes son:

- Concentración plasmática máxima obtenida ( $C_{pMAX}$ ).
- Tiempo al cual se alcanza la concentración máxima ( $T_{MAX}$ ).
- Área bajo la curva de concentraciones sanguíneas o plasmática vs. tiempo (ABC).
- El perfil completo de concentración plasmática vs. tiempo.

Estos parámetros se encuentran representados en la gráfica 1.

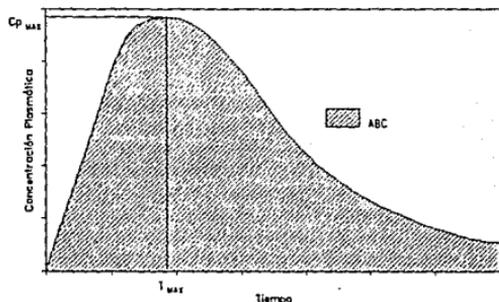
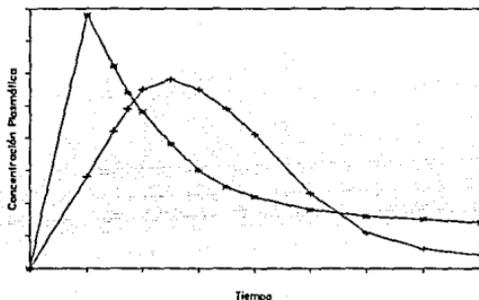


Gráfico 1. parámetros farmacocinéticos para medir la biodisponibilidad de medicamentos.

Si se quiere hacer la comparación con un solo parámetro, el análisis se efectúa de la manera tradicional para el diseño utilizado.

Es común, considerar más de un parámetro, por ejemplo:  $C_{pMAX}$  y  $T_{MAX}$ , o bien, la concentración del fármaco a dos o más tiempos después de la dosificación, en cuyo caso, se pueden utilizar modelos de medidas repetidas, o análisis multivariado (4,5, y 6).

Es importante considerar la respuesta a analizar, ya que puede suceder que se tenga el mismo promedio de concentración plasmática durante un intervalo dado de tiempo, pero que el perfil sea completamente distinto, Gráfica 2.



Gráfica 3. Diferentes perfiles de niveles plasmáticos con el mismo promedio de concentración en el tiempo.

Finalmente, un tipo de característica que es frecuentemente analizada es algún parámetro farmacocinético estimado por funciones matemáticas tal como la constante de absorción o eliminación, o sus correspondientes vidas medias (7). Un serio problema asociado con análisis de este tipo es que estos parámetros son estimados y no observados, y dicha estimación puede ser con mayor o menor precisión, dependiendo del ajuste al modelo farmacocinético supuesto y de la calidad de los datos. Por esto se sugiere que cualquier análisis de parámetros farmacocinéticos estimados sea tomado solo como guía aproximada y que se ponga particular atención a cualquier heterogeneidad de la varianza del error de los valores de los parámetros estimados (8).

Por otra parte, en estudios de administración crónica, debe determinarse la concentración del fármaco en su estado estacionario, esto es, en el tiempo previamente establecido donde la concentración plasmática se mantiene constante después de varias administraciones, ver Gráfica 3.

### 2.3.2. Excreción Urinaria.

En los casos de que el fármaco sea eliminado preferente por la orina en forma no metabolizada, la determinación de la cantidad excretada por vía renal es útil para evaluar la biodisponibilidad.

Los métodos de excreción urinaria están sujetos a mayores variaciones y errores que aquellos en que se emplean técnicas de análisis en plasma. El principal problema es la incompleta recolección de orina por pérdida de alguna fracción, por no haber sido el

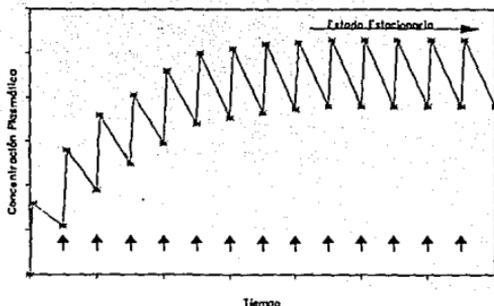


Gráfico 3. Estado estacionario alcanzado con la administración ( ) de dosis repetidas.

período de recolección suficientemente largo (cuando menos 7 vidas medias biológicas del fármaco) (3), o no haber controlado adecuadamente el pH urinario.

Ocasionalmente se puede emplear la determinación de los metabolitos en la orina cuando el fármaco se excreta principalmente en ésta forma.

El parámetro más común para el análisis estadístico, es la excreción acumulada de fármaco y/o metabolitos.

### 3. DISEÑO Y ANALISIS ESTADISTICO DE EXPERIMENTOS EN ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD.

El diseño y análisis deben ser determinados por los parámetros evaluados y las características del fármaco. El propósito de un diseño estadístico es identificar y aislar las fuentes de variación de los datos, de manera que las comparaciones de interés sean lo más precisas posibles.

Se ha observado que cuando un grupo de sujetos es escogido de tal manera que resulten lo más homogéneo posible, las concentraciones plasmáticas obtenidas después de una misma dosis son igualmente variables para la mayoría de los fármacos. Ahora, si el grupo de sujetos es menos homogéneo, la variabilidad en concentraciones puede ser todavía mayor, esta variación puede deberse principalmente al volumen de distribución y metabolismo de cada sujeto (9). Así pues, una de las más grandes fuentes de variación en

un estudio de niveles plasmáticos surge de las diferencias entre sujetos, y cualquier diseño que haga posible remover esta variación de la comparación de formulaciones, será un diseño más eficiente que el que no permita identificar y remover esta fuente de variación.

Es por esto que los diseños donde un sujeto recibe de manera alternada varias o todas las formulaciones a comparar, son particularmente útiles, estos diseños son los llamados Diseños de intercambio (Changeover). Si los sujetos reciben algunas, pero no todas las formulaciones se conoce como un diseño cruzado (Crossover). Y cuando los sujetos reciben todas las formulaciones es llamado diseño cruzado completo (8).

Los diseños changeover o cruzados se definen como aquellos donde 2 o más tratamientos se aplican secuencialmente a cada unidad experimental. Su importancia en estudios de bioequivalencia radica en que se minimizan el número de sujetos y el gasto en el experimento, manteniendo una sensibilidad razonable. A la vez, estos diseños son particularmente efectivos porque reducen el error experimental, eliminando de éste la variación entre sujetos, y de esta manera aumentan la precisión en la estimación de efectos y el poder de la prueba de hipótesis (8).

Es importante considerar, que como varias formulaciones son aplicadas subsecuentemente a cada sujeto, puede haber presencia de efectos residuales o acarreados de un período a otro. Esto es, suponiendo que a un sujeto se le administra la formulación A en un 1er. período y la formulación B en un 2o. período, el efecto de B puede estar influenciado por restos de la formulación A que no ha sido eliminada completamente, o bien, que un metabolito de A pueda estar presente en el 2o. período afectando el metabolismo de B (1). Cuando el efecto ocurre después de un período de experimentación es llamado "1er efecto residual", después de dos períodos "2o. efecto residual" y así sucesivamente.

Usualmente, en la mayoría de los campos de experimentación, el 1er efecto residual puede ser mayor, y el segundo y subsecuentes sucesivamente menores, por lo que pueden no ser considerados. Algunas veces, sin embargo, el segundo efecto y subsecuentes deben ser estimados y más aún, en ocasiones puede ser que cualquier efecto residual que exista en un período sea permanente en los períodos subsecuentes (10).

Por lo anterior sería adecuado planear el diseño de tal forma que exista un balance para efectos residuales.

### **3.1 Fuentes de Variación en Estudios Realizados con Diseños Cruzados.**

Las fuentes de variación que pueden existir en los estudios realizados con diseños cruzados se enlistan en la Tabla 1, esta lista ha sido dividida arbitrariamente en dos categorías de aquellos factores que pueden ser aceptados debido a las circunstancias

naturales del estudio (variación ineludible) y aquellos sobre los cuales el Investigador tiene un grado de control considerable (variación controlable) (11).

Tabla 1. Fuentes de variación en estudios de Biodisponibilidad.

<p>I. Variación Incontrolable</p> <ul style="list-style-type: none"><li>A. Variación de Sujetos<ul style="list-style-type: none"><li>1. Entre</li><li>2. Dentro</li></ul></li><li>B. Diferencias de Formulaciones</li><li>C. Interacción Sujeto-Formulación</li><li>D. Fluctuación Aleatoria</li></ul>
<p>II. Variación Controlable</p> <ul style="list-style-type: none"><li>A. Efectos Residuales<ul style="list-style-type: none"><li>1. Residuos de fármaco/metabolitos</li><li>2. Inducción metabólica</li><li>3. Inhibición metabólica</li><li>4. Irritación del tejido</li></ul></li><li>B. Factor Tiempo<ul style="list-style-type: none"><li>1. Tiempos de muestreo</li><li>2. Factores de almacenamiento</li></ul></li><li>C. Factores Fisiológicos<ul style="list-style-type: none"><li>1. Vaciamiento gástrico</li><li>2. Alimentación, fluidos, otros fármacos</li><li>3. Variación diurna</li></ul></li></ul>

#### Variación Incontrolable:

Hay dos tipos de diferencias para los sujetos, una radica en que cada sujeto responde de diferente manera a un mismo estímulo (variación entre sujetos), y la otra por que un mismo sujeto responde de modo diferente ante el mismo estímulo, cuando este es aplicado en diferentes ocasiones (variación intrasujeto).

Las diferencias de las respuestas a las diversas formulaciones son inherentes al estudio, ya que estas formulaciones difieren en cuanto a las sustancias utilizadas (excipientes) para la producción de los medicamentos, así como en el proceso de fabricación industrial de cada una de ellas, esta variación es la que interesa estudiar en los estudios de bioequivalencia. Para completar la lista se tiene también la variación debida a la interacción de formulación y sujetos, así como la fluctuación aleatoria.

### Variación controlable:

La variación controlable se refiere a aquella donde el investigador tiene un mayor grado de control o influencia. Generalmente el efecto de estos factores varía directamente con los cuidados tomados en la ejecución del estudio. Los efectos residuales enlistados pueden ser controlados por un estudio previo determinando su presencia y subsecuente incorporación en la respuesta para minimizar su influencia. El factor tiempo, es importante y en ocasiones su eliminación es casi imposible. Para ejemplificar esto, considere la práctica normal de analizar todas las muestras de un sujeto al mismo tiempo para reducir la variación en el proceso analítico, esta práctica requiere que las muestras del primer período sean almacenadas hasta completar el estudio. Si el fármaco o metabolito a ser analizado es inestable bajo las condiciones de almacenamiento, puede ser imposible eliminar el error inherente en ensayos separados, sin la introducción de un error mayor debido a la inestabilidad del fármaco. Los factores fisiológicos enlistados son controlables, pero son frecuentemente difíciles de duplicar en cada período del estudio (11).

Algunos de los diseños más comúnmente empleados en este tipo de estudios son descritos brevemente en los siguientes apartados.

### 3.2 Diseño Aleatorizado en Bloques

El tipo más simple de diseño cruzado completo es el diseño aleatorizado en bloques (ó diseño en bloques al azar), en donde cada bloque representa un sujeto. En este diseño cada sujeto recibirá cada una de las formulaciones a comparar, asignándole a cada uno, de manera aleatoria el orden de administración. La tabla 2 da un ejemplo para 6 sujetos, donde cada uno recibe cuatro formulaciones A, B, C y D.

Tabla 2. ensayo de niveles sanguíneos en un diseño aleatorizado en bloques

Sujeto	Período 1	Período 2	Período 3	Período 4
1	B	C	A	D
2	D	C	A	B
3	B	C	D	A
4	A	C	B	D
5	C	D	A	B
6	D	C	B	A

El propósito de la aleatorización es asegurarse de que si hay un efecto del factor Período (por ejemplo, si la absorción del fármaco tiende a aumentar de período a período), la comparación de las formulaciones no este influenciada por éste. Sin embargo, como el número de sujetos disponibles para estas pruebas generalmente no es muy grande, el

contar con un número pequeño de sujetos y aleatorizar el orden de la administración de las formulaciones, llevará a obtener un diseño desbalanceado en cuanto a los períodos (semanas o columnas), por lo que sería más satisfactorio planear deliberadamente el ensayo de manera que las formulaciones estuvieran balanceadas en los períodos, con otro tipo de diseño.

Otro aspecto es que este diseño solo es satisfactorio cuando se considera que no existen efectos residuales, o sea que el espaciamento de período a período es suficientemente grande para lograr un lavado efectivo (B).

El modelo para este diseño es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + e_{ijk}$$

donde  $\mu$  = constante,  $\tau_i$  = efecto de la formulación,  $\beta_j$  = efecto de sujeto,  $\delta_k$  = efecto de período y  $e_{ijk}$  = error aleatorio.

Wellestein maneja un ejemplo de un diseño cruzado con dos formulaciones y medidas repetidas, dando una alternativa de análisis para que pueda ser manejado como un diseño completamente al azar (12)

### 3.3 Diseño en Cuadro Latino

El diseño mas frecuentemente utilizado en pruebas de biodisponibilidad es el cuadro latino. Con el mismo ejemplo de cuatro formulaciones denotadas por A, B, C y D, y con un período de lavado entre administraciones, el programa para cuatro sujetos donde la distribución de las formulaciones se hace aleatoriamente se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Ensayo de niveles sanguíneos en un diseño en cuadro latino.

Sujeto	Período 1	Período 2	Período 3	Período 4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C

En este diseño se puede observar que hay un balance exacto de formulaciones tanto por sujeto como por período. El efecto de este doble agrupamiento es el de eliminar de los errores, todas las diferencias debidas a los sujetos y a los períodos, dando más oportunidad para reducir los errores que el diseño en bloques al azar.

La principal restricción en la utilidad del cuadro latino es que el número de repeticiones es igual al número de formulaciones, y si estas últimas son demasiadas, el número de repeticiones lo hace impracticable. Así mismo, al igual que en bloques al azar, el error experimental por unidad es probable que aumente con el tamaño del cuadro. En las pruebas de bioequivalencia es común que el número de formulaciones a comparar sea pequeña (de 2 a 4), produciendo así, cuadros desde  $2 \times 2$  a  $4 \times 4$ , donde se tienen ninguno o solamente unos cuantos grados de libertad del error (glE). Por esta razón no es útil este diseño para comparar 2 formulaciones, ya que para lograr una buena precisión se requerirían un número grande de cuadros  $2 \times 2$ , mientras que para comparar 3 o 4 formulaciones que tienen 2 y 6 gl del error respectivamente, aún así, es conveniente incluir más de un cuadro para aumentar los grados de libertad. Tres cuadros  $3 \times 3$  proporcionarían 10 gl para el error, mientras que dos cuadros  $4 \times 4$  dan 15 gl; en cambio se requeriría un número considerable de cuadros  $2 \times 2$ , ya que los glE son el número de cuadros menos 1 (12).

El modelo para este diseño es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + e_{ijk}$$

donde  $\mu$  = constante,  $\tau_i$  = efecto de la formulación,  $\beta_j$  = efecto de sujeto,  $\delta_k$  = efecto de período y  $e_{ijk}$  = error aleatorio.

Nótese que el modelo es el mismo que el de bloques al azar, lo que cambia es la presentación de tratamientos en sujetos y períodos.

Como se mencionó anteriormente, es importante considerar los efectos residuales de las formulaciones, los cuales pueden estar presentes en el 1er período inmediato a la aplicación de una formulación, o bien, en periodos posteriores. En adelante, a menos que se especifique lo contrario, se tratará de efectos residuales al 1er. período. Por lo anterior, sería adecuado que el diseño, fuera cruzado, balanceado para efectos residuales, esto es, que cada formulación este precedida por cada otra el mismo número de veces, de tal forma que la comparación de efectos directos y residuales sea con una precisión similar (14).

La diferencia del cuadro latino común y el cruzado, radica en que en el primero las formulaciones son asignadas aleatoriamente en el cuadro y posteriormente los sujetos son asignados aleatoriamente a la secuencia establecida, mientras que en los diseños cruzados, primero se fija la secuencia de formulaciones y luego los sujetos se aleatorizan a las secuencias dadas (15). Note que el diseño de la tabla 2 no es balanceado para efectos residuales, ya que de las 12 posibles parejas de formulaciones, no están presentes todas, esto es:

BA	AB 111	AC	AD
CA	CB	BC 111	BD
DA 111	DB	DC	CD 111

Se tiene que A esta precedida tres veces por D, pero ninguna por B ni C. lo mismo sucede con las demás formulaciones que tampoco resultan balanceadas para efectos residuales.

En general, el balance puede ser obtenido con un mínimo de dos cuadros cuando el número de tratamientos es impar y con un cuadro cuando el número de tratamientos es par(14).

Un diseño balanceado para efectos residuales se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Ensayo de niveles sanguíneos de un diseño en cuadro latino balanceado para efectos residuales.

Sujeto	Período 1	Período 2	Período 3	Período 4
1	A	B	C	D
2	B	D	A	C
3	C	A	D	B
4	D	C	B	A

En este diseño sí se tienen todos los pares posibles el mismo número de veces (una).

BA 1    AB 1    AC 1    AD 1  
 CA 1    CB 1    BC 1    BD 1  
 DA 1    DB 1    DC 1    CD 1

Hay que hacer notar que en este caso el balance no es total, ya que ninguna de las formulaciones esta precedida por sí misma, esto hace que estén confundidos los efectos directos de las formulaciones con los efectos residuales de las mismas.

La precisión con que se estima el efecto residual es menor que con la que se estiman los efectos directos. Esto es en parte porque el número de réplicas para los efectos residuales son menores que para efectos directos y en mayor grado porque los efectos residuales no son ortogonales a las secuencias de administración y a los efectos directos (14).

El modelo para este diseño, es básicamente el mismo que para el cuadro latino básico, solo aumentando un término para el efecto residual.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + \rho_l + e_{ijkl}$$

donde  $\mu$  = constante,  $\tau_i$  = efecto de la formulación,  $\beta_j$  = efecto de sujeto,  $\delta_k$  = efecto de período,  $\rho_l$  = efecto residual y  $e_{ijkl}$  = error aleatorio.

Se encuentran varios reportes donde se discuten algunos métodos para construir diseños balanceados para estimar efectos residuales, tanto en el período inmediato (1er. efecto residual)(14, 15, 16 y 17), como en el segundo período (2o. efecto residual) (18).

### 3.4 Diseño en Bloques Incompletos

Ambos diseños, el de bloques al azar y el cuadro latino proponen que a cada sujeto le sean administradas cada una de las formulaciones a probar; esto es, que sea un diseño cruzado completo. Cuando el número de formulaciones a ser comparado es grande (para propósitos prácticos "grande" puede ser mayor de tres o cuatro) hay varias razones por lo cual un diseño cruzado completo puede ser impráctico. Estas razones son: 1) La necesidad de tener  $n-1$  períodos de lavado o reposo, lo cual implicaría demasiado tiempo para concluir el experimento. 2) Por razones médicas y por comodidad para el sujeto, no es deseable tomar tantas muestras plasmáticas de cada sujeto. 3) Es frecuente que los sujetos, si no están hospitalizados, no quieran continuar participando en el experimento y no se puedan completar todas las administraciones (8).

Estas consideraciones sugieren que un camino adecuado para ensayos de muestras plasmáticas es planear el diseño de bloques incompletos, de preferencia balanceado (DBIB), donde cada sujeto recibe un mismo número de formulaciones y cada par de formulaciones es dada el mismo número de veces a un sujeto. Esta restricción asegura que la diferencia entre los efectos de dos formulaciones cualquiera sea estimada con la misma precisión.

En cuanto a efectos residuales, cada formulación debe estar precedida por cualquier otra el mismo número de veces.

Continuando con el ejemplo de 4 formulaciones A, B, C, y D, si cada sujeto recibe dos de las formulaciones, el número de sujetos requeridos sería 6, porque es el número de formas en que pueden distribuirse 4 formulaciones en 2 posiciones (sin importar el orden). De esta manera se obtendría un diseño como el mostrado en la tabla 5, donde

Tabla 5. Ensayo de niveles sanguíneos de un diseño en bloques incompletos.

Sujeto	Período 1	Período 2
1	A	B
2	B	C
3	C	D
4	D	A
5	B	D
6	A	C

cada par de formulaciones sería administrada a un sujeto el mismo número de veces, solamente una. Sin embargo, las formulaciones no están balanceadas en cuanto a efectos

residuales, ya que no están los 12 posibles pares de formulaciones. Esto siempre ocurrirá con un número par de formulaciones, y para obtener el balance debe repetirse el diseño de arriba con otros seis sujetos asignando las formulaciones de manera inversa (tabla 6), esto es:

Tabla 6. Ensayo de niveles sanguíneos en un diseño en bloques incompletos, para lograr un balance para efectos residuales.

Sujeto	Período 1	Período 2
7	B	A
8	C	B
9	D	C
10	A	D
11	D	B
12	C	A

Por lo tanto, con  $2n$  formulaciones y solo dos formulaciones por sujeto, se podrá obtener un balance para efectos residuales con dos repeticiones del diseño. El número de sujetos requerido es  $2n(2n-1)$ .

Con un número impar de formulaciones ( $2n + 1$ ) se puede construir un diseño balanceado con una sola réplica, en la cual cada par de formulaciones es dada una sola vez a cada sujeto, siendo el número de sujetos requerido  $(2n + 1)n$ , pero hay que considerar si la precisión para estimar el efecto de las formulaciones es adecuada y si no, incluir otra réplica.

Cuando se trabaja con más de dos formulaciones por sujeto, el diseño en BIB es considerablemente más difícil de llevar a cabo que un cuadro latino, ya que el número de sujetos sería demasiado grande para las condiciones comunes de experimentación, por lo que podrían utilizarse diseños en bloques parcialmente balanceados (DBPB). Estos últimos son más complejos de construir y analizar (13).

Finalmente, para lograr una misma precisión en la estimación de los efectos de las formulaciones en un DBIB se requerirá un número mayor de sujetos que en un diseño en bloques al azar ó cuadro latino, así que deberá considerarse la decisión del experimentador en cuanto a si es preferible aumentar el tamaño de muestra, con el fin de evitar los inconvenientes antes mencionados, que hacen imprácticos los diseños de bloques y cuadro latino.

Westlake (19) da un ejemplo detallado de bloques incompletos balanceados utilizando datos de biodisponibilidad, donde se administran 2 de 4 formulaciones a cada uno de 12

sujetos y lo analiza con un modelo de parcelas divididas, sin considerar los efectos residuales.

El modelo para este diseño es el mismo del diseño en bloques completos.

### 3.5 Diseños Extra-Período

En los casos anteriores se ha hablado del balance para efectos residuales, donde este balance no es completo, ahora se comentará el caso donde se tiene un balance completo, de manera que ya no exista pérdida de información causada por la confusión de efectos directos y residuales, lo cual es particularmente útil cuando los efectos residuales son el objetivo principal del estudio..

En los diseños extra-período se agrega un período más a un diseño cuadro latino balanceado para el primer efecto residual, en este período extra los tratamientos son los mismos que se encuentran en el último período del cuadro latino, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Ensayo de niveles sanguíneos en un diseño extra-período.

Sujeto	Período 1	Período 2	Período 3	Período 4	Período 5
1	A	B	C	D	D
2	B	D	A	C	C
3	C	A	D	B	B
4	D	C	B	A	A

De esta manera cada formulación esta precedida por cada otra, incluso por sí misma, el mismo numero de veces.

AA 1	BB 1	CC 1	DD 1
BA 1	AB 1	AC 1	AD 1
CA 1	CB 1	BC 1	BD 1
DA 1	DB 1	DC 1	CD 1

Existen varios puntos de interés en la diferencia entre los diseños cuadro latino regular y extra-período. En el diseño extra período cada tratamiento como se mencionó arriba, es precedido por cada otro el mismo número de veces como en el cuadro latino, pero, además cada tratamiento es precedido por sí mismo. Esto hace a los efectos residuales (al 1er período) ortogonales con los efectos directos. En contraste con los cuadros latinos, los efectos residuales en el diseños extra-período son ortogonales con las secuencias. Los efectos directos son no ortogonales con los sujetos en los diseños extra-período, pero el grado de no ortogonalidad no es muy grande. Finalmente, la cantidad de réplicas de los

efectos residuales relativos a los efectos directos son un poco mayores que en los cuadros latinos. (14)

Diferentes aspectos en cuanto a la construcción y análisis de este tipo de diseños son discutidas por Berenblut (16), Lucas(14) y Patterson (20). El modelo del diseño es el mismo que en el caso del cuadro latino.

### 3.6 Cuadro Latino con Medidas Repetidas.

Cuando los niveles sanguíneos son analizados como una secuencia o perfil a través del tiempo, en lugar de solo una característica particular (como ABC, C<sub>MAX</sub>, etc) el análisis estadístico no se realiza de la manera tradicional para el Diseño empleado. La importancia del análisis de muestras plasmáticas a través del tiempo radica en poder analizar el perfil completo de las concentraciones y no únicamente su promedio para todos los tiempos de muestreo (pag 6).

El método más frecuentemente empleado, en la literatura biofarmacéutica, es el análisis de varianza, correspondiente al diseño utilizado, para cada uno de los t tiempos de muestreo. Esto es correcto siempre y cuando se calcule el nivel de significancia para el rechazo de la hipótesis nula [ $1-(1-\alpha)^t=0.05$ ], ya que las respuestas en los diferentes tiempos de muestreo no son independientes.

Aún con este nivel de significancia, podría ser que no existiera una diferencia en todos los tiempos y que el perfil total sí lo fuera, por lo tanto para poder evaluarlo satisfactoriamente puede utilizarse un análisis para parcelas divididas, probando en el ANDEVA la interacción entre tiempos de muestreo x formulaciones, donde la información para todos los tiempos es combinada con la de formulaciones .

La diferencia del modelo de medidas repetidas con el de parcelas divididas es que los niveles de uno o más factores ( en este caso los niveles de tiempo)no pueden ser asignados aleatoriamente a uno o más de los tamaños de unidades experimentales (8).

La validez de este análisis de medidas repetidas como un arreglo de parcelas divididas estará dado, por la homogeneidad de covarianza entre cualesquiera dos tiempos de muestreo (periodos), entre otras características. Si dicha homogeneidad no está presente puede recurrirse al ajuste de grados de libertad por el factor e de Greenhouse-Geisser, o bien por el ajuste de Box (21).

Suponiendo que se tienen s formulaciones a comparar en r períodos y q sujetos, donde a cada sujeto se le toma una muestra para cada t tiempo y considerando que el estudio se diseñó como un cuadro latino, donde cada formulación se administró en diferentes períodos, cada nivel sanguíneo sera denotado  $y_{ijk}$  donde i,j,k y l son los índices para formulación, sujeto, período y tiempo de muestreo, respectivamente. El modelo estará dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + \epsilon_{ijk} + \nu_i + \nu\tau_{ij} + \nu\beta_{ji} + \nu\delta_{ki} + f_{ijk}$$

donde  $\tau_i$ ,  $\beta_j$ ,  $\delta_k$  y  $\nu_i$  son los efectos principales asociados a formulaciones, sujetos, períodos y tiempos de muestreo;  $\nu\tau_{ij}$ ,  $\nu\beta_{ji}$  y  $\nu\delta_{ki}$  son las interacciones de tiempos de muestreo con formulaciones, sujetos y períodos. El modelo supone que todos los efectos son fijos y que la suma de cualquier efecto principal o interacción sobre cualquier índice es igual a cero, y que  $\epsilon_{ijk}$  y  $f_{ijk}$  son independientes y normalmente distribuidos con media cero y varianzas  $\sigma^2_e$  (para  $\epsilon_{ijk}$ ) y  $\sigma^2_f$  (para  $f_{ijk}$ ). Lo cual representa un modelo del tipo de un Diseño en Parcelas Divididas.

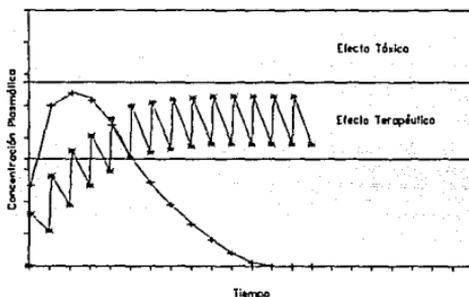
Este modelo tiene la característica de que la correlación entre los niveles sanguíneos de una combinación dada de sujeto-formulación a diferentes tiempos de muestreo, es independiente de el intervalo entre los tiempos de muestreo, o bien la homogeneidad de varianzas entre cualesquiera dos tiempos de muestreo. Específicamente, la matriz de varianzas-covarianza es uniforme, esto es que los elementos de la diagonal tienen el mismo valor ( $\sigma^2_e + \sigma^2_f$ ) e igualmente los elementos fuera de la diagonal tienen el mismo valor ( $\sigma^2_e$ ).

La tabla del Análisis de varianza estará dada en dos partes, una correspondiente a las parcelas principales y otra a las subparcelas, la primera es esencialmente un análisis de los promedios sobre el tiempo y es usada para probar los efectos principales debidos a sujetos, período y formulaciones, la segunda parte es usada para probar el efecto principal debido a tiempos de muestreo y los términos de interacción. Para probar las diferencias entre formulaciones el cuadrado medio de formulaciones es probado contra el C.M.E. de las parcelas principales (Dist. F. con (s-1) y (q-1) (r-1)-(s-1) grados de libertad); y para la interacción de tiempo x formulaciones su C.M. es probado contra el C.M.E. de subparcelas (Dist. F. con (t-1)(s-1) y (t-1){[(q-1)(r-1)-(s-1)]} grados de libertad), esta interacción indicará si las formulaciones son esencialmente diferentes con respecto a sus patrones de niveles sanguíneos sobre los diferentes tiempos de muestreo.

#### 4. DECISION DE BIOEQUIVALENCIA

La discusión anterior del análisis de muestras plasmáticas ha sido basada en la teoría clásica de pruebas de hipótesis, en donde a cada caso le corresponde un análisis de varianzas donde la hipótesis nula es que no existe diferencia entre las formulaciones; sin embargo, si el punto principal al llevar a cabo un estudio de biodisponibilidad es

determinar si las formulaciones son "prácticamente" equivalentes a una formulación estándar o innovadora, podría resultar irrelevante decidir esto solamente en base a un análisis de varianza. El decir "prácticamente" equivalentes implica que como se está manejando la equivalencia en base a niveles de fármaco en plasma, pudiera ser que para lograr un efecto terapéutico, fuera necesario una concentración plasmática que no necesariamente es un valor fijo, sino que deba estar en un rango determinado (ver Gráfica 4), de tal forma que si la concentración del fármaco está en ese rango, lo más seguro es que se de la respuesta farmacológica deseada, y de esta manera las formulaciones serían "prácticamente" equivalentes, pues estarían dando el mismo efecto terapéutico.



Gráfica 4. Niveles plasmáticos y efectos ocasionados con la administración de medicamentos, en dosis única (+) y dosis repetidas (\*).

Así mismo, en la planeación del estudio, el número de sujetos necesario esta basado en la diferencia que se desea detectar en las formulaciones. Si esta diferencia mínima, fuera por ejemplo del 10 % (suponiendo que diferencias menores no son significativas), y que si esto ocurriera, las formulaciones serían bioequivalentes desde el punto de vista práctico, y al llevar a cabo el estudio, la variabilidad propia de la respuesta fuera mucho menor que la esperada, la diferencia entre formulaciones podría detectarse como altamente significativa.

A la fecha, existen varios métodos que han sido propuestos como reglas de decisión en estudios de bioequivalencia, los cuales están basados en fundamentos estadísticos sólidos (1). La primera alternativa para la evaluación de biodisponibilidad relativa fue el uso de intervalos de confianza de Westlake(1, 22 y 23), el cual actualmente es el método más utilizado y sera el único descrito en este trabajo. Posteriormente se sugirió el análisis Bayesiano (24, 25 y 26). En algunas publicaciones se han comparados y discutido algunos de estos métodos (25, 26 , 27, 28 y 29).

#### 4.1 Intervalos de Confianza de Westlake

Si  $\mu_s$  y  $\mu_n$  son las medias poblacionales verdaderas de cualquier parámetro en plasma u orina, para la formulación estándar y para la formulación nueva respectivamente, y  $\bar{y}_s$  y  $\bar{y}_n$  son las medias correspondientes obtenidas de las muestras, suponiendo que los datos tienen una distribución normal con homogeneidad de varianzas, entonces  $\bar{y}_s - \bar{y}_n \sim N(\mu_s - \mu_n, 2\sigma^2/n)$ , y :

$$\frac{(\bar{y}_s - \bar{y}_n) - (\mu_s - \mu_n)}{\frac{S}{\sqrt{(n/2)}}} \quad [1]$$

tiene una distribución t con el mismo número de grados de libertad que el cuadrado medio del error del análisis de varianza, donde S representa la desviación estándar calculada para el error del ANDEVA (CME) y n el número total de sujetos en el estudio.

Ahora, se escogen dos constantes  $K_1$  y  $K_2$ , de la tabla de distribución t a un nivel de significancia ( $\alpha$ ) determinado, obteniendo que la probabilidad sea  $1-\alpha$  de que se tenga:

$$K_2 < \frac{(\bar{y}_s - \bar{y}_n) - (\mu_s - \mu_n)}{\frac{S}{\sqrt{(n/2)}}} < K_1 \quad [2]$$

lo cual puede ser reordenado, teniendo

$$K_2 \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} < (\bar{y}_s - \bar{y}_n) - (\mu_s - \mu_n) < K_1 \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} \quad [3]$$

Usualmente  $K_1$  es elegido igual a  $-K_2$  para dar un intervalo simétrico para  $(\mu_s - \mu_n)$ . Una desventaja de este intervalo de confianza convencional, es que cuando se tiene presente el intervalo en esta forma:

$$\mu_s + K_2 \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} - (\bar{y}_s - \bar{y}_n) < \mu_n < \mu_s + K_1 \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} - (\bar{y}_s - \bar{y}_n) \quad [4]$$

que de forma reducida sería

$$\mu_s - \Delta_1 \leq \mu_n \leq \mu_s + \Delta_2 \quad [5]$$

la cual resultaría asimétrica para  $\mu_s$ , de modo que para tomar una decisión de equivalencia, deberá ser hecha en base al mayor valor absoluto de  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$ , no siendo de esta manera el ancho efectivo del intervalo  $\Delta_1 - \Delta_2$ , sino  $2K$ , donde  $K$  es el máximo de  $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$ . Es por esto que Westlake (22 y 23) propone disminuir el máximo de  $\Delta_1$ ,  $\Delta_2$  hasta que  $\Delta_1 = -\Delta_2$ , y de esta manera asegurar un acortamiento en el intervalo de confianza efectivo.

Como en estudios de bioequivalencia, es común, que la decisión quiera hacerse a partir de valores simétricos de la formulación estándar (equivalencia si es 20 % de la respuesta

del estándar) para asumir una equivalencia terapéutica, resulta más práctico utilizar este intervalo propuesto por Westlake, donde si

$$\Delta = K_1 \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} - (\bar{y}_s - \bar{y}_n) = - \left[ K_2 \frac{S}{(n/2)} - (\bar{y}_s - \bar{y}_n) \right] \quad [6]$$

esta relación implica que  $K_1$  y  $K_2$  deben ser elegidas de tal forma que esta igualdad se cumpla, o sea:

$$2 (\bar{y}_s - \bar{y}_n) = (K_1 + K_2) \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} \quad [7]$$

Westlake (23) da un ejemplo para un diseño cruzado donde cada uno de 12 sujetos recibe ambas formulaciones, la nueva y la estándar, este ejemplo será tomado aquí para su descripción detallada. En este caso, del ANDEVA usual, basado en la presencia de efectos aditivos debido a sujetos (11 gl), días de administración (1 gl) y formulaciones (1 gl), puede verificarse que el cuadrado medio del error,  $S^2$ , está basado en los 10 gl restantes. Suponiendo que los valores de este experimento fueran  $\bar{y}_s = 11.5$ ,  $\bar{y}_n = 10.75$  y  $S = 0.75$ , substituyendo en ecuación [7], se encuentra que  $K_1 + K_2 = 4.90$ .

La determinación de  $K_1$  y  $K_2$  puede ser hecha por ensayo y error en una tabla detallada de la integral de la Distribución t. Así,  $K_2 = t_{(0.05, 10 \text{ gl})} = -1.82$ , por lo que  $K_1 = 1.82 + 4.90 = 6.72$ . Con estos valores y substituyendo en la ecuación [6] se obtiene un valor de  $\Delta = 1.31$ , o sea que el intervalo  $\mu_s + 1.31$  cubre la media  $\mu_n$ , ó, alternativamente, si  $\mu_s$  es aproximada por  $\bar{y}_s$ , al 95 % de confianza el valor  $\bar{y}_n$  esta dentro del 11.4 % ( $1.31/11.5 \times 100$ ) del valor medio para la formulación estándar.

Este cálculo da una base para una decisión realista de cuando  $\mu_n$  y  $\mu_s$  son suficientemente cercanas, de manera que pueda suponerse que las formulaciones son "prácticamente" equivalentes.

En el ejemplo, si la decisión de equivalencia debiera tomarse cuando la formulación nueva estuviera dentro del 80 al 120 % de la formulación estándar, podría concluirse que estas dos formulaciones son "prácticamente equivalentes". Es de interés mencionar que con una prueba de t podría encontrarse una diferencia significativa entre  $\mu_n$  y  $\mu_s$  a un nivel  $\alpha = 0.05$ .

En un experimento bien controlado con un número de sujetos adecuado, se obtendrá un intervalo de confianza menor y una alta probabilidad de demostrar una equivalencia práctica. En cambio, en un 2º caso, experimentos pobremente controlados con un número de sujetos pequeño, a pesar de que no se rechace la hipótesis nula, puede haber diferencias grandes entre tratamientos, obteniendo intervalos más amplios, con lo que no se podría probar la bioequivalencia.

## II. SECCION EXPERIMENTAL

Se evaluó la biodisponibilidad de cuatro productos comerciales de Diazepam, tres de ellos de fabricación nacional y uno de referencia que fue el producto innovador Valium Roche (Suiza). Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes psiquiátricos cuyo principal diagnóstico era la ansiedad y el tratamiento recomendado por el médico fue el diazepam. Al médico responsable se le entregó el protocolo de la investigación, con el fin de que se sujetará a las restricciones de los pacientes lo más posible, como era el evitar modificaciones en la administración de los medicamentos una vez iniciado el estudio, salvo que fuera indispensable para la salud del paciente.

El estudio se llevó a cabo en 8 pacientes (2 hombres y 6 mujeres) cuyas edades se encuentran comprendidas entre los 17 y 46 años y en estado de salud somática general buena, sin antecedentes de alteraciones vasculares, gastrointestinales, hepáticas y renales. Los pacientes y sus familiares fueron enterados del propósito del estudio y de los riesgos posibles. Es bien conocido, que ni el sexo ni la edad (18-50 años) son factores que influyan marcadamente la respuesta al diazepam.

El régimen de dosificación utilizado fue un régimen múltiple de 5 mg de diazepam (una tableta) tres veces al día, a las 9, 14 y 19 hrs, siguiendo un diseño experimental de doble cuadro latino cruzado. Los pacientes fueron asignados al azar en las secuencias de tratamientos, como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Ensayo de niveles sanguíneos utilizado en el estudio de Bioequivalencia de Diazepam.

Sujeto	Período 1	Período 2	Período 3	Período 4
1	A	B	C	D
2	B	D	A	C
3	C	A	D	B
4	D	C	B	A
5	A	B	C	D
6	B	D	A	C
7	C	A	D	B
8	D	C	B	A

Las características de este diseño son:

1) Ortogonalidad entre efectos de formulación, períodos y sujetos (por ser dos cuadros latinos completos 4 x 4).

2) Ortogonalidad entre efectos residuales y sujetos, es decir en cada sujeto estan presentes los diferentes efectos residuales. y el numero de veces que están presentes es de dos, esto es:

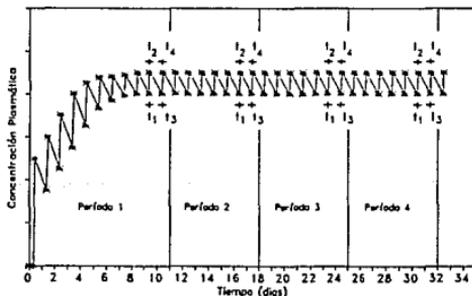
BA 11	AB 11	AC 11	AD 11
CA 11	CB 11	BC 11	BD 11
DA 11	DB 11	DC 11	CD 11

3) No ortogonalidad entre efectos residuales y directos de formulaciones, esto es porque no existe un efecto residual de cualquiera de las formulaciones sobre ella misma, es decir, como se ve en los pares de formulaciones del párrafo anterior no existe ninguna formulación precedida por sí misma.

El primer producto se administró durante los 10 primeros días, el segundo producto por los siguientes 7 días, el tercero los siguientes 7 días y el cuarto los últimos 7 días del protocolo. La razón de que el primer período fuera más largo, fue la de asegurar que la concentración plasmática del paciente hubiera alcanzado el estado estacionario.

Los medicamentos se asignaron aleatoriamente a las letras, correspondiendo el producto Suizo a la formulación D, y los productos nacionales a las formulaciones A, B y C.

Se recolectaron las muestras de plasma de cada paciente, a las 9 hrs. (antes de la administración) y a las 10:30 hrs (después de la administración) los días 9 y 10, 16 y 17, 23 y 24, y 30 y 31 del tratamiento. De tal manera que como se muestra en la gráfica 5, se tomaron cuatro muestras plasmáticas para cada formulación,  $t_1$  y  $t_2$  para el primer día (antes y después de la administración), y  $t_3$  y  $t_4$  para el segundo.



Gráfica 5. Simulación del comportamiento de niveles plasmáticos con dosis repetidas, mostrando los tiempos de muestreo (+).

### III. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

#### 1. RESULTADOS

Las muestras sanguíneas fueron analizadas por triplicado con un método específico de Cromatografía de Líquidos, previamente validado.

Los resultados obtenidos de concentración plasmática de Diazepam en mg/Kg de peso se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Concentraciones de Diazepam en mg/Kg de peso.

		Período 1	Período 2	Período 3	Período 4
Sujeto	T. muestr.	A	B	C	D
1	1	4.91	5.21	4.16	3.69
1	2	5.93	5.63	4.67	4.48
1	3	4.86	4.54	5.44	4.66
1	4	5.53	6.37	6.44	4.66
		B	D	A	C
2	1	8.21	7.74	8.91	3.85
2	2	8.39	8.08	9.71	3.95
2	3	8.08	6.87	8.92	3.70
2	4	8.42	7.70	9.45	4.82
		C	A	D	B
3	1	10.23	7.42	9.03	8.80
3	2	10.25	9.56	10.03	11.35
3	3	8.70	6.92	8.96	8.73
3	4	12.66	9.83	10.01	9.17
		D	C	B	A
4	1	8.19	6.54	6.73	6.79
4	2	8.59	11.25	9.81	9.47
4	3	6.96	8.29	7.10	6.87
4	4	8.10	8.82	10.55	7.23

		A	B	C	D
5	1	5.03	3.81	2.87	3.99
5	2	5.54	5.92	5.16	4.48
5	3	5.09	5.57	3.16	3.74
5	4	5.65	5.14	5.06	5.49
		B	D	A	C
6	1	6.17	8.87	8.32	9.68
6	2	9.13	11.12	9.23	9.74
6	3	8.56	9.50	8.62	9.62
6	4	9.41	11.01	9.27	10.14
		C	A	C	B
7	1	4.04	6.22	7.08	5.81
7	2	4.62	6.64	7.33	6.63
7	3	6.16	6.35	6.18	6.16
7	4	4.21	6.23	5.88	7.65
		D	C	B	A
8	1	8.17	5.66	6.67	9.01
8	2	9.22	9.57	11.67	12.85
8	3	8.21	6.21	6.68	7.88
8	4	8.46	9.23	11.73	11.09

## 2. ANALISIS DE RESULTADOS.

Había dos posibilidades de análisis, una tratándolo como dos cuadros latinos y la otra como un modelo conmutativo, de estos se optó por el segundo, ya que la aleatorización de los sujetos se hizo a las 4 secuencias de administración, esto es, no se agruparon en base a alguna característica los que serían del cuadro 1 y los que serían del cuadro 2, por lo que no se esperaba tener diferencias entre cuadros.

El análisis se dividió en cuatro partes: en la 1a. se realizó el análisis a los 4 tiempos de muestreo; con un análisis de medidas repetidas, sin considerar efectos residuales.

En la 2a. y 3a. partes se trabajó con los promedios de los 4 tiempos de muestreo para la evaluación de los efectos residuales, pues no se encontró reportado este análisis para medidas repetidas; así, en la 2a. parte se realizó el análisis común para cuadro latino y en la 3a. se evaluaron los efectos residuales con un modelo de regresión lineal, conjuntando ambos resultados en un solo ANDEVA que incluyera la fuente de variación para los efectos residuales. El realizar este análisis en dos partes fué porque no se encontró en el software la manera de hacerlo directamente. Y por último en la 4a. parte se obtuvo el intervalo de confianza de Westlake para las diferencias de formulaciones.

### Parte I.

#### Análisis de medidas repetidas

Esta parte consistió en el análisis de un modelo con medidas repetidas, sin considerar los efectos residuales, el cual está dado por:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + e_{ijk} + \nu_i + \nu\tau_{ij} + \nu\beta_{ji} + \nu\delta_{ki} + f_{ijk} \quad (\text{Modelo 1})$$

donde  $\tau_i$ ,  $\beta_j$ ,  $\delta_k$  y  $\nu_i$  son los efectos principales asociados a formulaciones, sujetos, períodos y tiempos de muestreo;  $\nu\tau_{ij}$ ,  $\nu\beta_{ji}$  y  $\nu\delta_{ki}$  son las interacciones de tiempos de muestreo con formulaciones, sujetos y períodos. El modelo supone que todos los efectos son fijos y que la suma de cualquier efecto principal o interacción sobre cualquier índice es igual a cero, y que  $e_{ijk}$  y  $f_{ijk}$  son independientes y normalmente distribuidos con media cero y varianzas  $\sigma^2_e$  (para  $e_{ijk}$ ) y  $\sigma^2_f$  (para  $f_{ijk}$ ). Lo cual representa un modelo del tipo de un arreglo de Parcelas Divididas.

Como se mencionó (pag. 17), este modelo supone que la correlación entre los niveles sanguíneos de una combinación dada de sujeto-formulación a diferentes tiempos de muestreo es independiente de el intervalo entre los tiempos de muestreo, o bien la homogeneidad de covarianzas entre cualesquiera dos tiempos de muestreo. Específicamente, la matriz de varianzas-covarianza es uniforme, esto es que los elementos de la diagonal tienen el mismo valor ( $\sigma^2_e + \sigma^2_f$ ) e igualmente los elementos fuera de la diagonal tienen el mismo valor ( $\sigma^2_e$ ).

Esta primera parte del análisis se realizó con el módulo 2V (Análisis de varianza y covarianza con medidad repetidas) del BMDP y la salida se muestra en el Apéndice A (pag.33-40) . Uno de los supuestos mencionados para este modelo, es la homogeneidad de covarianzas entre cualesquiera dos tiempos de muestreo, lo cual se puede probar por medio de la esfericidad, y como puede verse si se esta cumpliendo ya que  $p=0.6588$  por lo que no se rechaza la hipótesis de que existe esfericidad, esto puede relacionarse con la suma de cuadrados de los componentes ortogonales del error 2, los cuales no difieren mucho en magnitud, así como con la matriz de correlación de los mismos, cuyos valores fuera de la diagonal son similares y pequeños.

Para probar la igualdad de niveles plasmáticos obtenidos con las diferentes formulaciones, se analiza (pag.34) el renglón de Formulación en el ANDEVA (donde se prueba el promedio de concentraciones de los diferentes tiempos de muestreo), así como el de la interacción Tiempo \* Formulación (para evaluar si los perfiles a través del tiempo son similares) y se observa que para cada caso el nivel de significancia para el rechazo de  $H_0$  es de 0.89 y 0.14 respectivamente, con lo que se supone que los promedios de los niveles plasmáticos y el perfil de estos con respecto al tiempo son iguales.

Los resultados anteriores son satisfactorios ya que no se consideró necesaria la transformación de Greenhouse-Geisser por existir esfericidad (pag.33).

Finalmente, para evaluar la normalidad de los residuales se utilizó el estadístico de Shapiro y Wilk's (pag. 35-37) , así como sus respectivas gráficas probabilísticas, Apéndice A (pag.38-40) con lo cual queda demostrado que la normalidad es aceptable.

## Parte 2.

### Análisis del diseño cuadro latino (sin efectos residuales)

Suponiendo que se tienen  $s$  formulaciones a comparar en  $r$  períodos y  $q$  sujetos, donde de cada sujeto se considera la respuesta como el promedio de concentración plasmática para los cuatro tiempos de muestreo, y considerando que el estudio se diseño como un cuadro latino, donde cada formulación se administró a intervalos de una semana, cada nivel sanguíneo sera denotado  $y_{ijk}$  donde  $i, j$ , y  $k$  son los índices para sujeto, semana y formulación, respectivamente. El modelo estará dado por:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + e_{ijk} \quad (\text{Modelo 2})$$

donde  $\mu$  = constante,  $\tau_i$  = efecto de la formulación,  $\beta_j$  = efecto de sujeto,  $\delta_k$  = efecto de período y  $e_{ijk}$  = error aleatorio.

El modelo supone que todos los efectos son fijos y que la suma de cualquier efecto principal sobre cualquier índice es igual a cero, y que  $e_{ijk}$  es normalmente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2_e$ .

El análisis se realizó en el módulo 2V (Análisis de varianza y covarianza con medidas repetidas) del BMDP dando la salida que se muestra en el Apéndice B (pag.41-42) , el ANDEVA mostrado aquí se conjuntó con la 3a. parte del análisis que se muestra a continuación.

### Parte 3.

#### Estimación de Efectos Residuales de Formulaciones

Se considerarán únicamente efectos residuales al primer período, donde el modelo al que se quiere llegar es:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \delta_k + \rho_l + e_{ijkl} \quad (\text{Modelo 3})$$

donde  $\mu$  = constante,  $\tau_i$  = efecto de la formulación,  $\beta_j$  = efecto de sujeto,  $\delta_k$  = efecto de período,  $\rho_l$  = efecto residual y  $e_{ijkl}$  = error aleatorio, notese que la diferencia con el modelo 2 es solo el término  $\rho_l$ .

El modelo supone que todos los efectos son fijos y que la suma de cualquier efecto principal sobre cualquier índice es igual a cero, y que  $e_{ijk}$  es normalmente distribuido con media cero y varianza  $\sigma^2_e$ .

Como en el software no se podía estimar directamente este modelo de diseño experimental, entonces, se trabajó en el módulo 3R (Regresión no lineal) del BMDP, reparametrizando con variables indicadoras los sujetos, períodos y formulaciones, así como incluyendo nuevas variables que indicaran los efectos residuales de una formulación sobre la aplicada posteriormente, la reparametrización fue:

a) Para sujeto, período y tratamiento se introdujeron S-1, P-1 y T-1 variables, de la siguiente manera:

V1	V2	V3	
0	0	0	si S, P o T = 1
1	0	0	si S, P o T = 2
0	1	0	si S, P o T = 3
0	0	1	si S, P o T = 4

b) Para los efectos residuales se incluyeron 4 variables, de la siguiente forma:

	Form.	D1	D2	D3	D4	
Suj.1	A	0	0	0	0	para 1er periodo(no ef. res.)
	B	1	0	0	0	para form. precedidas por A
	C	0	1	0	0	para form. precedidas por B
	D	0	0	1	0	para form. precedidas por C
Suj.2	D	0	0	0	0	
	C	0	0	0	1	para form. precedidas por D

Es importante destacar que se requiere de la restricción de que la  $\Sigma \rho_i = 0$ , donde  $\rho_i$  = Coeficientes asociados a cada efecto residual.

La salida se muestra en el Apéndice C (pag.43-45) de donde se extrajo el CM del error que fué de 1.6388 que por 15 grados de libertad da una S.C. de 24.582. Este valor se sustituyó por la SC del error de la tabla de ANDEVA del modelo 2 (Apendice B, pag. 43). Restando esta cantidad de la S.C. del Error del modelo anterior, se obtuvo la S.C. para el efecto residual de formulaciones, para finalmente tener la tabla análisis de varianza que se muestra a continuación (Tabla 10)

Tabla 10. Tabla de análisis de varianza para un cuadro latino, considerando los efectos residuales.

F.V.	S.C.	gl	C.M.	F	P
Media	1728.39	1	1728.39	1224.68	0.0000
Sujeto	101.89	7	14.56	8.88	0.0000
Período	2.82	3	0.94	0.57	0.4460
Formulación	0.86	3	0.29	0.18	0.8342
Ef. Residual	0.82	3	0.27	0.17	0.8432
ERROR	24.58	15	1.64		

En la Tabla 10 se observa que no existe la presencia de efectos residuales, por lo que no hay necesidad de calcular la S.C. para el efecto de formulación ajustado por efecto residual.

Con este análisis, una vez probada la no existencia de efectos residuales se concluyó que los niveles promedio de Diazepam alcanzados con la administración de las cuatro marcas comerciales, para estos 8 sujetos son iguales.

#### Parte 4.

##### Intervalo de Confianza de Westlake.

Independientemente de los resultados obtenidos con el ANDEVA anterior, deben obtenerse los intervalos de confianza, para evaluar finalmente con ellos, sí en la práctica clínica, estos resultados son importantes.

Aunque en este estudio se encontró que no existe diferencia entre las 4 formulaciones de Diazepam, se ejemplificará a continuación el uso de los intervalos de confianza de Westlake.

Para este ejemplo solo se considerará a la diferencia entre la formulación estándar (D) y la formulación (B), por ser la mayor. El estadístico utilizado será la d de Dunnett por estar comparando varios tratamientos contra un control.

Los datos a utilizar serán:

$\bar{y}_s = 7.27$  que es la concentración plasmática media para la formulación estándar;  $\bar{y}_n = 7.56$  la concentración plasmática media para la formulación B;  $\sigma^2 = 1.6388$  la varianza del error de la tabla del ANDEVA obtenida en la 3a. parte (pag. 29) y  $n = 8$  el número de sujetos.

$$K_2 = d_{0.05(3,15)} = -2.24$$

$$K_1 + K_2 = \frac{2(\bar{y}_s - \bar{y}_n)}{\frac{S}{\sqrt{(n/2)}}}$$

Substituyendo se tiene que:

$$K_1 + K_2 = -0.91$$

y despejando

$$K_1 = 1.33$$

Substituyendo en

$$\Delta = K \frac{S}{\sqrt{(n/2)}} - (\bar{y}_s - \bar{y}_n)$$

se tiene que

$$\Delta = 1.14$$

y como el intervalo de confianza estará dado por

$$\mu_s - \Delta < \mu_n < \mu_s + \Delta$$

entonces:

$$7.27 - 1.14 < \mu_n < 7.27 + 1.14$$

$$6.13 < \mu_n < 8.41$$

lo cual puede ser escrito como:

$$0.84 \mu_s < \mu_n < 1.16 \mu_s$$

lo cual representa que la formulación B, esta en el rango de 16% de la formulación estándar, por lo que se dice son "prácticamente equivalentes".

## CONCLUSIONES

- No se encontró presencia de efectos residuales de formulaciones al 1er período, a pesar de que no existió un período real de lavado, suponiendo con esto que no hubo problemas de acumulación, ni de inhibición o inducción metabólica que alterara la respuesta.
- Los niveles plasmáticos de diazepam alcanzados con la administración de las cuatro formulaciones, así como su perfil a través del tiempo, son los mismos en los ocho pacientes estudiados.
- La bioequivalencia queda demostrada con los intervalos de Westlake, observando que los niveles plasmáticos obtenidos con las formulaciones genéricas (Nacionales) están dentro de un 16 % de los obtenidos con la estándar (Suiza), con lo que se supone que aunque hubiera un cambio de prescripción en cuanto a los tres productos nacionales no implicaría ningún riesgo para el paciente.
- Ya que no se encontró diferencia significativa entre formulaciones, se puede considerar que el proceso y las sustancias utilizadas en la fabricación de las cuatro formulaciones estudiadas, no alteran los procesos farmacocinéticos en el organismo.
- La amplitud relativamente grande de los intervalos de confianza de Westlake, considerando el nivel de significancia del rechazo de  $H_0$  para igualdad de formulaciones (0.8), sugiere la utilización de un mayor número de sujetos para estudios posteriores de bioequivalencia (al estado estacionario) de tabletas de diazepam.
- A pesar de que se logró realizar el análisis para evaluar la presencia de efectos residuales, por medio de la reparametrización con modelos de regresión lineal, sería adecuado contar con software que estimara estos efectos directamente, facilitando de esta manera el análisis.

## APENDICE A

BMDP2V - ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE WITH REPEATED MEASURES.  
Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
by BMDP Statistical Software, Inc.

### PROGRAM INSTRUCTIONS

```
/BMDP2V
/PROBLEM TITLE IS 'BIOEQUIVALENCIA'.
/INPUT VARIABLES ARE 7.
FORMAT IS FREE.
/VARIABLE NAMES ARE Sujeto, Periodo, Form, t1,t2,t3,t4.
/GROUP CODES(1) ARE 1 to 8.
NAMES(1) ARE Suj1,Suj2,Suj3,Suj4,Suj5,Suj6,Suj7,Suj8.
CODES(2) ARE 1 to 4.
NAMES(2) ARE Periodo1,Periodo2,Periodo3,Periodo4.
CODES(3) ARE 1 to 4.
NAMES(3) ARE Form1,Form2,Form3,Form4.
/SAVE RESIDUAL
FILE IS RESIDUAL.
CODE IS RESIDUAL.
NEW.
/DESIGN GROUPING ARE Sujeto, Periodo, Form.
DEPENDENT ARE 4 to 7.
LEVEL IS 4.
NAME IS Tiempo.
EXCLUDE ARE 12,13,23,123.
RESIDUAL IS MEAN.
/PRINT #LINESIZE = 72.
RESIDUAL
/END
```

### DESIGN SPECIFICATIONS

```
GROUP = 1 2 3
DEPEND = 4 5 6 7
LEVEL = 4
```

SUMS OF SQUARES AND CORRELATION MATRIX OF THE  
ORTHOGONAL COMPONENTS POOLED FOR ERROR 2 IN ANOVA TABLE BELOW.

7.40719	1		
10.82226	-0.229	1	
7.79299	0.291	0.026	1

SPHERICITY TEST APPLIED TO ORTHOGONAL COMPONENTS - TAIL PROBABILITY 0.6588

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE - 11 12 13 14

	SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F	TAIL PROB.	GREENH GEISSER	HUYNH FELDT
	MEAN	6913.5571	1	6913.5571	1224.68	0.0000		
	Sujeto	407.5788	7	58.2255	10.31	0.0000		
	Periodo	11.2768	3	3.7559	0.67	0.5838		
	Form	3.4422	3	1.1474	0.20	0.8928		
1	ERROR	101.6133	18	5.6452				
	Tiempo	63.9333	3	21.3111	44.22	0.0000	0.0000	0.0000
	TS	29.8961	21	1.4236	2.95	0.0007	0.0012	0.0007
	TP	8.3984	9	0.9332	1.94	0.0660	0.0749	0.0660
	TF	6.9838	9	0.7760	1.61	0.1357	0.1457	0.1357
2	ERROR	26.0224	54	0.4819				

ERROR TERM EPSILON FACTORS FOR DEGREES OF FREEDOM ADJUSTMENT  
 GREENHOUSE-GEISSER HUYNH-FELDT

2 0.8994 1.0000

ERROR SUM OF SQUARES CORRESPONDING RESIDUALS

CASE	Sujeto	Periodo	Form	RESIDUALS					
				R0	R1	R2	R3	R4	
1	Suj1	Per1	Form1	0.50141	-0.23703	0.87484	-0.56453	-0.07328	
2	Suj1	Per2	Form2	-0.29109	0.60047	-0.34391	-0.52078	0.26422	
3	Suj1	Per3	Form3	0.41234	-0.22047	-0.59734	0.85203	-0.03422	
4	Suj1	Per4	Form4	-0.62266	-0.14297	0.06641	0.23328	-0.15672	
5	Suj2	Per1	Form1	0.92641	0.02547	-0.03766	-0.02453	0.03672	
6	Suj2	Per2	Form2	-0.46359	-0.05953	0.02109	0.41672	-0.37828	
7	Suj2	Per3	Form3	-0.29766	-0.23297	0.50516	0.01703	-0.28922	
8	Suj2	Per4	Form4	-0.16516	0.26703	-0.48659	-0.40922	0.63078	
9	Suj3	Per3	Form1	-2.60516	0.04328	-0.29484	0.07078	0.18078	
10	Suj3	Per1	Form2	0.80659	0.21703	0.02391	0.14203	-0.38297	
11	Suj3	Per4	Form3	0.21297	0.53241	-0.06297	-0.18484	-0.26839	
12	Suj3	Per2	Form4	1.56359	-0.79672	0.33391	-0.02797	0.49078	
13	Suj4	Per3	Form1	1.13547	1.05016	-0.51797	0.06766	-0.59094	
14	Suj4	Per1	Form2	-1.12328	-0.97359	0.42328	0.37141	0.17891	
15	Suj4	Per4	Form3	0.76609	0.03078	0.15141	-0.29047	0.10828	
16	Suj4	Per2	Form4	-0.77828	-0.10734	-0.05672	-0.14859	0.31266	
17	Suj5	Per2	Form1	-0.14141	-0.05297	-0.56484	0.48578	0.13203	
18	Suj5	Per4	Form2	-0.32797	0.23234	0.69422	0.55109	-1.47766	
19	Suj5	Per1	Form3	0.99328	0.17234	-0.77703	-0.62766	1.23234	
20	Suj5	Per3	Form4	-0.52891	-0.35172	0.64766	-0.40922	0.11328	
21	Suj6	Per2	Form1	0.44734	0.29078	0.13891	-0.26797	-0.16172	
22	Suj6	Per4	Form2	0.40078	0.19609	-0.76203	-0.13266	0.69859	
23	Suj6	Per1	Form3	-1.73047	-0.41141	0.30922	0.17109	-0.06891	
24	Suj6	Per3	Form4	0.88234	-0.07547	0.31391	0.22953	-0.46797	
25	Suj7	Per4	Form1	0.74109	-0.83547	0.69141	0.25328	-0.10922	
26	Suj7	Per3	Form2	0.52266	0.05672	-0.45891	-0.25828	0.66047	
27	Suj7	Per2	Form3	-1.14266	0.07453	0.03391	0.46078	-0.56922	
28	Suj7	Per1	Form4	-0.12109	0.70422	-0.26641	-0.45578	0.01797	
29	Suj8	Per4	Form1	-1.00516	-0.28422	-0.28984	-0.02047	0.59453	
30	Suj8	Per3	Form2	0.47391	-0.26953	0.40234	-0.56953	0.43672	
31	Suj8	Per2	Form3	0.78609	0.05078	0.43766	-0.39797	-0.09047	
32	Suj8	Per1	Form4	-0.25484	0.50297	-0.55016	0.98797	-0.94078	

ERROR TERM	SUM OF SQUARES	RECOMPUTED FROM RESIDUALS	RELATIVE ERROR
1	101.61330	101.61330	0.00000
2	26.02244	26.02244	0.00000

BMDP2D - DETAILED DATA DESCRIPTION, INCLUDING FREQUENCIES  
 Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
 by BMDP Statistical Software, Inc.

PROGRAM INSTRUCTIONS

/BMDP 2D  
 /PROBLEM TITLE = 'Análisis de residuos para el diseño con medidas repetidas'.  
 /INPUT FILE = RESIDUAL  
 /CODE = RESIDUAL  
 /VARIABLES USE = 4 to 17.  
 /PRINT WSTAT.  
 /NO COUNT.  
 /END

```

*****
      DO
*****
VARIABLE NUMBER      . . . . . 13
NUMBER OF DISTINCT VALUES . . . 32
NUMBER OF VALUES COUNTED . . . 32
NUMBER OF VALUES NOT COUNTED . . 0

                                MAXIMUM      1.5829337
                                MINIMUM     -2.6051562
                                RANGE        4.1887458
                                UNBIASED    0.8191621
                                ST. DEV.    0.9052414
                                (Q3-Q1)/2    0.6313258
                                P4. ST. SC.  1.75
                                P4. ST. SC. -2.88

                                H H          EACH 'H'
                                H H          DEPOSITS
                                H H          1
                                H H          COUNT(S)

                                95% CONFIDENCE
                                LOWER        UPPER
                                -0.3263742  0.3263744
                                H H H H H H H H H H H H
                                L-----J

MEAN      ESTIMATE      ST. COEFF
0.000001  0.1600256    0.2208365
MEDIAN    0.0459375
MODE      NOT UNIQUE

TEST OF NORMALITY
U STATISTIC  0.9536
SIGNIFICANCE LEVEL  0.2207

                                EACH " " ABOVE = 0.3000
                                L = -2.7000
                                U = 1.8000
                                CASE NO. OF MIN. VAL. = 9
                                CASE NO. OF MAX. VAL. = 12

                                VALUE  VALUE/S.E.
                                SKEWNESS  -0.74      -1.70
                                KURTOSIS   0.35       0.41
                                S1 = -0.5088280
                                S2 = 0.7598438
                                S3 = -0.9052414
                                S4 = 0.9052415

                                EACH " " BELOW = 0.0500
                                S      0
                                -      1
                                P4      3
                                ST. SC. 4
                                NO      X
    
```

```

*****
* R1 *
*****
VARIABLE NUMBER . . . . . 14
NUMBER OF DISTINCT VALUES . 22
NUMBER OF VALUES COUNTED . . 32
NUMBER OF VALUES NOT COUNTED 0

          ESTIMATE      ST. CR000
MEAN      0.000000      0.0747666
MEDIAN    0.0281250      0.0525029
MODE      NOT UNIQUE

          95% CONFIDENCE
LOWER      -0.1555467
UPPER      0.1555467

          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          L-----U

EACH 'H' ABOVE = 0.1500
L = -1.0500
U = 1.2000
CASE NO. OF MIN. UNCL. = 14
CASE NO. OF MAX. UNCL. = 13

          VALUE      VALUE/S.E.
SKEWNESS  -0.05      -0.11
KURTOSIS   0.26      0.30

          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          L-----U

EACH 'H' BELOW = 0.0200
L = 0
U = 3
CASE NO. OF MIN. UNCL. = 0
CASE NO. OF MAX. UNCL. = 3

```

```

*****
* R2 *
*****
VARIABLE NUMBER . . . . . 15
NUMBER OF DISTINCT VALUES . 22
NUMBER OF VALUES COUNTED . . 32
NUMBER OF VALUES NOT COUNTED 0

          ESTIMATE      ST. CR000
MEAN      0.000000      0.0811731
MEDIAN    0.0225000      0.1206122
MODE      NOT UNIQUE

          95% CONFIDENCE
LOWER      -0.1655543
UPPER      0.1655543

          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          L-----U

EACH 'H' ABOVE = 0.1500
L = -1.0500
U = 1.2000
CASE NO. OF MIN. UNCL. = 19
CASE NO. OF MAX. UNCL. = 1

          VALUE      VALUE/S.E.
SKEWNESS  0.04      0.10
KURTOSIS  -1.14     -1.32

          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          H H H H H H H H H H
          L-----U

EACH 'H' BELOW = 0.0150
L = 0
U = 3
CASE NO. OF MIN. UNCL. = 0
CASE NO. OF MAX. UNCL. = 3

```



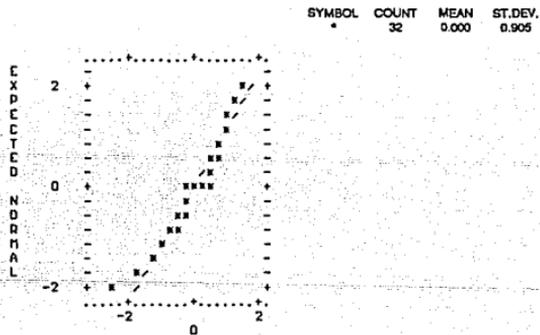
BMDP5D - HISTOGRAMS AND UNIVARIATE PLOTS  
 Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
 by BMDP Statistical Software, Inc.

PROGRAM INSTRUCTIONS

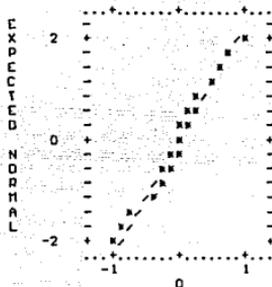
```

/BMDP 5D
/PROBLEM TITLE = 'Analisis de Residuales'.
/INPUT FILE = RESIDUAL.
        CODE = RESIDUAL.
/VARIABLES USE = 13 to 17.
/PLOT TYPE = NORM.
        SIZE = 20,15.
/END
  
```

NORMAL PLOT OF VARIABLE 13 PD



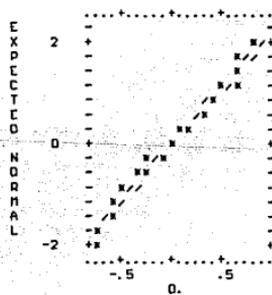
NORMAL PLOT OF VARIABLE 14 R1



SYMBOL	COUNT	MEAN	ST.DEV.
x	32	0.000	0.431

R1  
VALUES FROM NORMAL DISTRIBUTION WOULD LIE  
ON THE LINE INDICATED BY THE SYMBOL / .

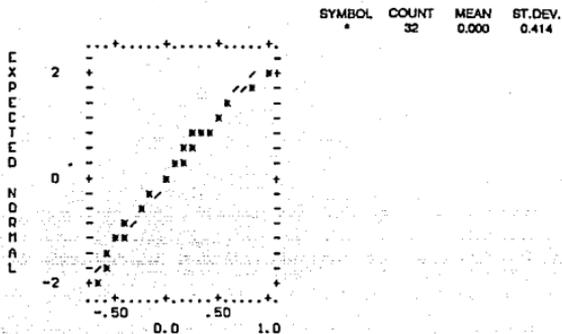
NORMAL PLOT OF VARIABLE 15 R2



SYMBOL	COUNT	MEAN	ST.DEV.
x	32	0.000	0.459

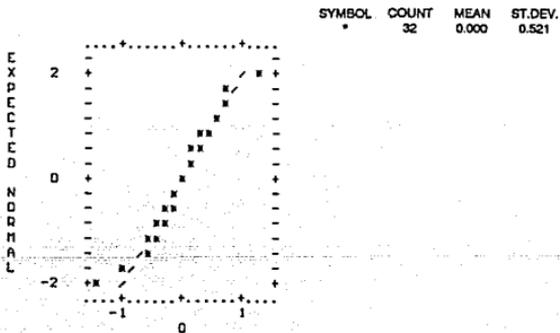
R2  
VALUES FROM NORMAL DISTRIBUTION WOULD LIE  
ON THE LINE INDICATED BY THE SYMBOL / .

NORMAL PLOT OF VARIABLE 16 R3



R3  
VALUES FROM NORMAL DISTRIBUTION WOULD LIE  
ON THE LINE INDICATED BY THE SYMBOL / .

NORMAL PLOT OF VARIABLE 17 R4



R4  
VALUES FROM NORMAL DISTRIBUTION WOULD LIE  
ON THE LINE INDICATED BY THE SYMBOL / .

## APENDICE B

BMDP3R - NONLINEAR REGRESSION  
Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
by BMDP Statistical Software, Inc.

### PROGRAM INSTRUCTIONS

```
/BMDP 3R  
/PROBLEM TITLE IS 'BIOEQUIVALENCIA'.  
/INPUT VARIABLES ARE 25.  
FORMAT IS FREE.  
/TRANSFORM PROM IS MEAN(m1,m2,m3,m4).  
/VARIABLE NAMES ARE Sujeto, PERIODO, Form, m1,m2,m3,m4,d1,d2,d3,d4,  
e1,e2,e3,e4,e5,e6,s7,w1,w2,w3,f1,f2,f3,uno.  
USE ARE 8 to 25, PROM.  
/REGRESS DEPENDENT IS PROM.  
NUMBER IS 6.  
PARAM IS 18.  
/PARAMETER CONST IS (1)1,(2)1,(3)1,(4)1.  
K = 0.  
/PRINT #LINESIZE IS 72.  
/END
```

### CONSTRAINTS

```
1.000000  
1.000000  
1.000000  
1.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000  
0.000000
```

### CONSTANTS

```
0.000000
```

## ASYMPTOTIC CORRELATION MATRIX OF THE PARAMETERS

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		
P1	1	1.000																		
P2	2	-0.333	1.000																	
P3	3	-0.333	-0.333	1.000																
P4	4	-0.333	-0.333	-0.333	1.000															
P5	5	-0.000	-0.000	0.000	0.000	1.000														
P6	6	-0.000	-0.000	0.178	-0.178	0.488	1.000													
P7	7	-0.000	-0.000	0.178	-0.178	0.488	0.524	1.000												
P8	8	-0.000	0.178	-0.000	-0.178	0.488	0.500	0.500	1.000											
P9	9	-0.000	0.178	-0.000	-0.178	0.488	0.500	0.500	0.500	1.000										
P10	10	0.178	-0.000	-0.000	-0.178	0.488	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000									
P11	11	0.178	-0.000	-0.000	-0.178	0.488	0.500	0.500	0.500	0.500	0.052	1.000								
P12	12	-0.000	-0.000	-0.000	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.000	1.000							
P13	13	-0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000						
P14	14	-0.000	-0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000					
P15	15	-0.248	0.248	0.000	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.033	-0.033	-0.000	0.000	0.000	0.000	1.000			
P16	16	-0.248	0.000	0.248	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.033	-0.033	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000		
P17	17	-0.248	0.000	0.000	0.248	0.000	-0.033	-0.033	-0.033	-0.033	-0.006	-0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	
P18	18	0.098	-0.098	-0.098	0.098	-0.527	-0.540	-0.540	-0.540	-0.540	-0.514	-0.514	-0.373	-0.373	-0.373	-0.373	-0.361	-0.361	-0.306	1.000

RESIDUAL MEAN SQUARE 1.63876

DEGREES OF FREEDOM 15

THE RESIDUAL MEAN SQUARE, 1.6388, IS USED IN COMPUTING STANDARD DEVIATIONS FOR PARAMETERS AND PREDICTED VALUES.

PARAMETER	ESTIMATE	ASYMPTOTIC STANDARD DEVIATION	TOLERANCE
P1	0.116562	0.495797	0.153846
P2	0.131188	0.495797	0.153846
P3	0.102937	0.495797	0.153846
P4	-0.250687	0.495797	0.153846
P5	-0.405000	0.905197	0.500000
P6	2.398656	0.927551	0.476190
P7	4.314031	0.927551	0.476190
P8	4.474844	0.927551	0.476190
P9	0.996094	0.927551	0.476190
P10	3.248688	0.927551	0.476190
P11	3.937438	0.927551	0.476190
P12	0.188437	0.640071	0.500000
P13	-0.347188	0.640071	0.500000
P14	0.045937	0.640071	0.486652
P15	0.437719	0.671312	0.454545
P16	0.302814	0.671312	0.454545
P17	0.026313	0.671312	0.454545
P18	4.747563	0.858745	0.065444

## APENDICE C

BMDP2V - ANALYSIS OF VARIANCE AND COVARIANCE WITH REPEATED MEASURES.  
 Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
 by BMDP Statistical Software, Inc.

PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/BMDP 2V
/PROBLEM TITLE IS 'BIOEQUVALENCIA'.
/INPUT VARIABLES ARE 7.
        FORMAT IS FREE.
/TRANSFORM PROM IS MEAN(1, 2, 3, 4).
/VARIABLE NAMES ARE Sujeto, Week, Form, 11, 12, 13, 14.
/SAVE RESIDUAL
        FILE IS CHICO.
        CODE IS CHICO.
        NEW.
/GROUP CODES(1) = 1 to 8.
        NAMES(1) = Suj1, Suj2, Suj3, Suj4, Suj5, Suj6, Suj7, Suj8.
        CODES(2) = 1 to 4.
        NAMES(2) = Week1, Week2, Week3, Week4.
        CODES(3) = 1 to 4.
        NAMES(3) = Form1, Form2, Form3, Form4.
/DESIGN GROUPING ARE Sujeto, Week, Form.
        DEPENDENT IS PROM.
        EXCLUDE ARE 12, 13, 23, 123.
/PRINT LINESIZE = 72.
        RESIDUAL
        NO MEAN.
/END
    
```

ANALYSIS OF VARIANCE FOR 1-ST DEPENDENT VARIABLE -  
 PROM

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F	TAIL PROB.
MEAN	1728.38931	1	1728.38931	1224.68	0.0000
Sujeto	101.89469	7	14.55638	10.31	0.0000
Week	2.81969	3	0.93990	0.67	0.5838
Form	0.86055	3	0.28685	0.20	0.8928
1 ERROR	25.40333	18	1.41130		



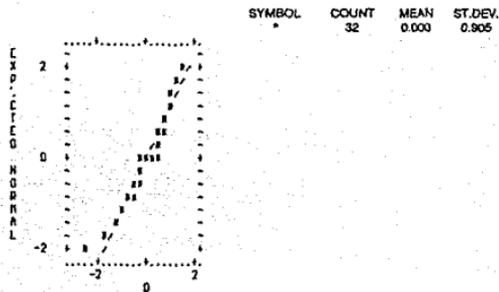
BMDF5D - HISTOGRAMS AND UNIVARIATE PLOTS  
 Copyright 1977, 1979, 1981, 1982, 1983, 1985, 1987, 1988, 1990  
 by BMDP Statistical Software, Inc.

PROGRAM INSTRUCTIONS

```

/BMDP 5D
/PROBLEM TITLE IS 'Analis de los residuales'.
/INPUT FILE IS RESIDUAL.
        CODE IS RESIDUAL.
/VARIABLES USE IS 10.
/PLOT TYPE IS NORM. SIZE = 20,15.
        SIZE = 20,15.
/END
    
```

NORMAL PLOT OF VARIABLE 10 RESIDUAL



RESIDUAL  
 VALUES FROM NORMAL DISTRIBUTION WOULD LIE  
 ON THE LINE INDICATED BY THE SYMBOL / .

## GLOSARIO

### **Absorción**

conjunto de fenómenos que permiten al principio activo pasar de su sitio de administración a la circulación sanguínea, a través de una barrera o tejido biológico.

### **Biodisponibilidad**

Cuantificación de la cantidad y velocidad a la cual el principio activo es absorbido desde un producto farmacéutico hasta la circulación sanguínea.

### **Bioequivalencia**

Estudio de biodisponibilidad utilizado para comparar, in vivo, dos o más formulaciones (medicamentos) que contengan la misma dosis del fármaco terapéuticamente activo y en los mismos sujetos.

### **Distribución**

Proceso mediante el cual un fármaco en el plasma es llevado a los diversos tejidos del organismo.

### **Eficacia Terapéutica**

Intensidad de la respuesta farmacológica alcanzada con cierta dosis del fármaco.

### **Eliminación**

Conjunto de fenómenos que conducen a la desaparición progresiva del principio activo (o de un metabolito) del medio interno.

### **Excreción**

Eliminación del principio activo o sus metabolitos, hacia el exterior del organismo.

### **Fármaco**

Sinónimo de principio activo

**Formulación**

Sinónimo de medicamento.

**Farmacocinética**

Estudio de la evolución temporal de los niveles de los medicamentos y sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y excretas del organismo.

**Medicamento**

Preparación farmacéutica que resulta de la incorporación exactamente medida de un principio activo (o de varios) en el seno de una forma farmacéutica.

**Metabolito**

Molécula resultante de la biotransformación de un principio activo.

**Metabolismo**

Cambios enzimáticos que sufre un fármaco en el organismo.

**Posología**

Régimen de dosificación de un medicamento.

**Principio Activo**

Substancia que posee, por ella misma o debido a sus metabolitos, propiedades farmacológicas.

**Vía de Administración**

Ruta por la cual un medicamento es aplicado al organismo.

**Vida Media**

Tiempo en el cual es eliminada del organismo, la mitad de la dosis administrada.

## REFERENCIAS

---

1. Secretaría de Salud y Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica. Registro para el Trámite de Registro Sanitario de Medicamentos en México. 1988.
2. Westlake W. J. [1979] Statistical aspects of comparative bioavailability trials. *Biometrics* 35, 273-280.
3. Alache J.M., Devissaguet J. Ph. & Guyot-Hermann A.M. Biofarmacia. México, El Manual Moderno 1983.
4. Box G.E.P.[1950] Problems in the analysis of growth and wear curves. *Biometrics* 6, 362-389.
5. Cole J.W.L. & Grizzle J.E. [1966] Applications of multivariate analysis of variance to repeated measurement experiments. *Biometrics* 22, 810-828.
6. Grizzle, J.E. & Allen D.M. [1969] Analysis of growth and dose response curves. *Biometrics* , 357-381.
7. Westlake W.J. [1973] Use of statistical methods in evaluation of In vivo performance of dosage forms. *Review. J. Pharm. Sci.* 62,1579-1589.
8. Westlake W. J. The design and analysis of comparative blood-label trials in Swarbrick J. (ed) *Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences: Dosage Form Design and Bioavailability*, Chap 5, pp.149-179, Philadelphia, Lea & Febiger, 1973.
9. Metzler C. M. [1974] Bioavailability-a problem in equivalence. *Biometrics* 30, 309-317.
10. John J. A. & Quenouille M. H. *Experiments: Design and Analysis*. pp. 196-205. London, Charles Griffin & Co. 2th. Ed. 1977.

11. Wolen R. L. & Gruber Ch. M. Application of the stable isotope technique in bioavailability assessment in Albert K. S. (ed) Drug Absorption and Disposition, Statistical Considerations. pp. 69-71. Washington, D.C. American Pharmaceutical Association, 1980.
12. Cochran W.G. y Cox G.M. Diseño Experimental, México, Trillas 1965.
13. Gill J. Design and Analysis of experiments in the Animal and Medical Sciences. Vol 2, pp 179-185, Iowa, The Iowa State University Press, 1978.
14. Lucas H.L. [1964] Extra-Period Latin-square change-over design. *J Dairy Sci.* 40, 225-239.
15. Williams E.J. [1949] Experimental design balanced for the estimation of residual effects of treatments. *Aust. J. Sci. Res. A*, 2, 149-168.
16. Berenblut I.I. [1964] Change-over design with complete balance for first residual effect. *Biometrics*, 707-712.
17. Wallenstein S. & Fisher A.C. [1977] The analysis of the two-period repeated measurements crossover design with application to clinical trials. *Biometrics* 33, 261-269.
18. Williams E.J. [1950] Experimental design balanced for pairs of residual effects. *Australian J. Sci. Research Series A*, 3: 351-363.
19. Westlake W.J. [1974] The use of balanced incomplete block designs in comparative bioavailability trials. *Biometrics* 30, 319-327.
20. Patterson, H. D. and Lucas, H.L. [1959]. Extra-period change-over design. *Biometrics* 15, 116-132.
21. Milliken G. A. & Johnson D.E. Analysis of Messy Data. Vol. 1 Design Experiments. Van Nostrand Reinhold, New York, 1984.

22. Westlake W. J. [1976] Symmetrical confidence intervals for bioequivalence trials. *Biometrics* 32, 741-744.
23. Westlake W. J. [1972] Use of confidence intervals in analysis of comparative bioavailability trials. *J. Pharm. Sci.* 61, 1340-1341.
24. Selwyn M. R. & Hall N. R. [1984] On bayesian methods for bioequivalence. *Biometrics* 40, 1103-1108.
25. Fluehler H., Hirtz J. & Moser, H.A. [1981] An aid to decision-making in bioequivalence assessment. *J. Pharmacok and Bioph.* 9,2, 235-243.
26. Mandallaz D. & Mau J. [1981] Comparison of different methods for decision-making in Bioequivalence Assessment. *Biometrics* 37, 213-222.
27. Rocke D. M. [1984] On testing for bioequivalence. *Biometrics* 40, 225-230.
28. Kirkwood T.B.L. [1981] Bioequivalence testing - A need to rethink. *Biometrics* 37, 589-594.
29. Metzler C.M. [1989] Bioavailability / Bioequivalence: Study design and statistical issues. *J. Clin. Pharmacol* 29, 289-292.