



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

**Facultad de Biología
Departamento de Estadística**

**Programa de Doctorado en
Estadística, Análisis de Datos y Bioestadística
Bienio: 2003-2004**

**Análisis de Procedimientos para la Evaluación de Medicamentos:
Bioequivalencia y Farmacogenética**

Doctoranda:

María Pilar Sánchez Olavarría

Directores de Tesis:

Jordi Ocaña Rebull
Facultad de Biología
Departamento de Estadística
Universidad de Barcelona

Josep Lluís Carrasco Jordán
Facultad de Medicina
Departamento de Salud Pública
Universidad de Barcelona

Escribir una novela es como bordar una tapicería con hilos de muchos colores: es un trabajo artesanal de cuidado y disciplina....

Isabel Allende

A Rodrigo, Francisco y Felipe, a quienes amo por sobre todas las cosas, son lo mas bello que me ha ocurrido en esta vida. Su amor, apoyo y sacrificios me han permitido finalizar mi sueño.

Agradecimientos

A mis padres Hortensia y Fernando, a mi hermana Montserrat, Valentina y familia cuyo apoyo incondicional, perseverante, constante y afectuoso, me han dado la fuerza y ánimos necesarios para continuar adelante. Sin ustedes no podría haber concluido esta difícil tarea. A mi tía Carmen, no tuve oportunidad de despedirme de ti, porque te fuiste demasiado rápido, pero sé que siempre estas ahí acompañándome y feliz de ver realizado mi sueño.

A mis suegros Luis y Queni, a mi cuñada Coni, Stéphane, y familia toda, quienes también con mucho afecto me han proporcionado su ayuda, consejo y apoyo, para continuar y finalizar mis estudios.

A mi tía Georgina, mi madrina postiza, nunca olvidaré tu dulzura y afecto. Desde donde estas, sé que te sentirás feliz por ver finalizado mi sueño.

A mi Director de Tesis, Profesor Dr. Jordi Ocaña, por su apoyo incondicional, su crítica y consejo, paciencia, dedicación, por saber escucharme, por guiarme con su experiencia. He aprendido muchísimo en todas nuestras reuniones de tutoría de tesis, no solo aspectos de teoría sino también porque como parte de mi formación también me ha enseñado aspectos de la vida tan importantes para continuar, valorar y apreciar mi existencia.

A mi Director de Tesis, Dr. Josep Lluís Carrasco, por tu apoyo sin condiciones, consejos, crítica afectuosa, dedicación, simpatía, y amabilidad que me han servido no solo para ampliar mis conocimientos sino también porque me has permitido aprender y crecer como persona, creo que también debería ser un objetivo importante de todo trabajo de tesis doctoral. Te podría decir que la suma aleatoria de todas las muchas conversaciones me dejan una huella imborrable en el corazón. También mi afecto para Teresa, por su gran humanidad y vocación de servicio, por ayudarme en alguna urgencia médica y en especial por darme con cariño sabios consejos de vida que no olvidaré nunca.

Al Profesor Dr. Albert Cobos por su inapreciable ayuda, su dedicación, consejos y guía, además de su gran simpatía, espontaneidad y cordialidad, imprescindibles para poder concluirlo. Quisiera expresarle mi gran agradecimiento, fundamental para una parte de esta tesis y que sin ella no habría podido concluirlo.

A mis ex-colegas y amigos de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, del Departamento de Ciencia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Chile: Tere, Nella, Anita María, Fresia, Gianni, Oscar, Claudio, Jorge, Edward, Hans por los momentos inolvidables que disfrute en mi paso por la Facultad; a Juanita, don Víctor, Mari y Chendo, por su calidez y amistad maravillosa. He dejado al final a una persona a quien quisiera darle mi agradecimiento especial, al profesor. Hernán Chávez, por su apoyo incondicional, y afecto en todos los momentos que me tocado vivir durante estos años no sólo por la distancia atlántica que me separa de mi país, sino también porque ha sido mi guía y mentor desde mis inicios como alumna y después como colega y jefe. Ha estado presente en muchos de los acontecimientos, circunstancias y momentos más importantes de mi vida, con la que me ha dado la generosidad de su amistad sin condiciones.

A Marcela, mi primera amiga chilena en Barcelona, lo serás para toda la vida, gracias por los hermosos momentos que me has permitido disfrutar, con tu amistad, por escucharme, tus palabras de aliento, que han hecho de mi estada una experiencia muy enriquecedora.

A Carolina y Ricardo, académicos de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Concepción por su ayuda y generosidad, además por darme el sabio apoyo de las palabras cuando a veces todo parecía encaminarse en forma complicada...

A José Luis e Israel (compañeros del curso de Doctorado) por compartir muchos momentos gratos durante este doctorado; a mis profesores del Doctorado por haber aprendido de ellos que no siempre los conocimientos “entran con sangre...”, a Roser del Departamento de Estadística, por su gran disposición, su afecto y amabilidad para atender y resolver todas las dudas cuando se es alumna extranjera.

A Félix y Pilar; Santi y Placi; Bertha y Jaume (mi pareja lingüística); Àlex (mi profesor de catalán); Rosa y Montse (“geganteras” y “castelleras”) y muchos amigos de Gavà (mi pueblo de acogida), por su hospitalidad, simpatía, afecto y respeto, con los cuales me he sentido muy integrada a esta magnífica cultura con sus hermosas tradiciones, las que he aprendido a valorar, me han dado a conocer lugares entrañables, aprender de su gente, una gastronomía exquisita y un clima excepcional que hacen de este lugar un rincón inolvidable para vivir.

Contenidos	Página
Índice	i
Listado de Tablas y Figuras	ii-iii
Listado de Abreviaciones	iv
1.- Introducción General	1 - 36
Bioequivalencia de Medicamentos y Farmacogenética	
1.1.- Marco Teórico.....	3 - 21
1.1.1.- El rol de la Farmacocinética y parámetros farmacocinéticos en Bioequivalencia.....	4 - 8
1.1.2.- Pruebas de Bioequivalencia, estableciendo el problema.....	9 - 11
1.1.3.- Límites de Bioequivalencia in vivo.....	11 - 12
1.1.4.- Carryover en Bioequivalencia.....	12 - 14
1.1.5.- Drogas de Alta Variabilidad.....	14
1.1.6.- Tamaño de muestra en Bioequivalencia.....	15
1.1.7.- Bioequivalencia in vitro: f_2	15 - 21
1.2.- El rol de la Farmacogenética en la Bioequivalencia.....	21 - 35
1.2.1.- Metabolismo de las drogas.....	26 - 29
1.2.1.1.- Enzimas metabolizadoras de drogas.....	26 - 27
1.2.1.2.- Transportadores de drogas.....	27 - 29
1.2.2.- Polimorfismos genéticos de los blancos de los fármacos (drug target).....	29 - 30
1.2.3.- Polimorfismos genéticos con efectos indirectos en la respuesta de fármacos.....	30 - 31
1.2.4.- Algunas consideraciones estadísticas.....	31 - 32
1.2.5.- Algunas consideraciones éticas.....	33 - 34
1.2.6.- Los desafíos para el futuro.....	34 - 36
2.- Objetivos	37 - 40
3.- Informe de los Directores	41 - 44
4.- Discusión Global	45 - 64
5.- Resum en Català	65 - 86
6.- Bibliografía	87 - 92
7. Publicaciones	93 - 118
7.1.- Artículo 1.....	95 - 122
7.2.- Artículo 2.....	123 - 135
7.3.- Artículo 3.....	137 - 154
7.4.- Artículo 4.....	155 - 164
7.5.- Artículo 5.....	165 - 177
8.- Anexos	179 - 209
Anexo 1: Intervalos de confianza en Bioequivalencia y Métodos de escalamiento de límites.....	181 - 185
Anexo 2: Glosario de Terminología Farmacogenética.....	187 - 199
Anexo 3: Material suplementario revista SORT.....	201 - 204
Anexo 4: Material suplementario revista Chemometrics and Intelligent laboratory system.....	205 - 209

Listado de Tablas y Figuras

Índice de Tablas	Página
Tabla 1: Errores de tipo I y II para Bioequivalencia.....	10
Tabla 2: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS).....	19
Tabla 3: Polimorfismos del CYP implicados en el metabolismo de fármacos.....	26
Tabla 4: Frecuencia de los metabolizadores lentos CYP2D6 y CYP2C19 en diversas poblaciones.....	26
Tabla 5: Localización celular de la Glicoproteína P para el efecto y disponibilidad de fármacos.....	28
Tabla 6: Polimorfismos genéticos en genes de blancos de fármacos que influyen en su respuesta.....	29
Tabla 7: Algunos polimorfismos en genes modificadores de tratamiento o enfermedad que pueden afectar la respuesta de fármacos.....	30
Tabla 8: Resumen de los métodos clásicos para ABE en Furosemida.....	47
Tabla 9: Evaluación de la ABE para $C_{m\acute{a}x}$ de acuerdo a diferentes límites de BE y tipos de intervalo de confianza.....	48
Tabla 10: Evaluación de la ABE para $C_{m\acute{a}x}/ABC_{0-\infty}$ de acuerdo a diferentes límites de BE y tipos de intervalo de confianza.....	49
Tabla 11: Decisión de ABE de acuerdo a métodos basados en el escalado de la medida del efecto formulación.....	50
Tabla 12: Resumen del estudio de Bioequivalencia con diferentes métodos.....	53
Tabla 13: Valores para \bar{D} and $se_{\bar{D}}$ del estudio de BE.....	53
Tabla 14: Valores del estadístico f_2 aplicados a los datos de Metoclopramida.....	61
Tabla 15: Fuentes de Multiplicidad.....	64

Índice de Figuras

Figura 1: Modelo de 1 compartimento.....	5
Figura 2: Modelo de un compartimento con eliminación de primer orden después de una administración intravenosa.....	5
Figura 3: Concentración plasmática en un modelo de un compartimento.....	5
Figura 4: Modelo de 2 Compartimentos con eliminación de 1er. orden.....	6
Figura 5: Proceso LADME y parámetros farmacocinéticos.....	7
Figura 6: Curva Concentración plasmática vs. Tiempo de Furosemida.....	8
Figura 7: Posibles Resultados de las Pruebas de Hipótesis con límites clásicos.....	11
Figura 8: Diseño crossover de 2×2	12
Figura 9: Perfil de Disolución de la Metoclopramida.....	16
Figura 10a: Perfiles de disolución in vitro e in vivo.....	20
Figura 10b: Esquema del desarrollo de la Correlación <i>in vitro/in vivo</i>	21
Figura 11: Polimorfismos de nucleótido único y Farmacogenética.....	24
Figura 12: Determinantes poligenéticos de la respuestas a fármacos.....	25
Figura 13: Actividad simulada del citocromo P 450 CYP3A4 y CYP3A5 en población de Negros y Blancos.....	27
Figura 14: Diagrama de algunas localizaciones de los transportadores de drogas.....	28
Figura 15: % de Aprobación de ABE vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$	56

Figura 16: Recubrimiento vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$	56
Figura 17: Longitud del intervalo vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$	56
Figura 18: % de Declaración de ABE en función de κ/ϕ de acuerdo a CV, para algunos ϕ y tamaños de muestras.....	57
Figura 19: Curvas de potencia para los perfiles de disolución según SUPAC; BCa y percentil.....	62

Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
$ABC_{0-\infty}$	Área bajo la curva de tiempo cero al tiempo infinito
ABC_{0-t}	Área bajo la curva de tiempo cero al tiempo t en el que se midió la concentración
ACE	Enzima Convertidora de Angiotensina
ABE	Bioequivalencia promedio (average bioequivalence)
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y eliminación)
AINES	Antiinflamatorios no esteroidales
BCS	Biopharmaceutics Classification System
BD	Biodisponibilidad
BE	Bioequivalencia
BCa	Percentil Biased corrected
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración plasmática máxima
Cl_s	“Clearance” o nivel de aclaramiento
CYP	Citocromo P 450
DAG	Directed Acyclical Graphs
EMEA	European Medicine Agency
FDA	Food and Drug Administration
f_2	Factor de similitud
GMR	Razón de Medias Geométricas
GO	Gene Ontology
IVIV	<i>In vivo- in vitro</i> correlations
K_e	Vida media de eliminación del fármaco
KS	Kolmogorov-Smirnov
MDR	Proteína de resistencia múltiple a droga
MGMT	Metil-Guanidina Metil-Transferasa
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SCI	Shortest Confidence Interval
TpMT	Tio purina Metil Transferasa
TOST	Two One-Sided Test
WHO	World Health Organization

1.- Introducción General

Bioequivalencia de Medicamentos y Farmacogenética

1.1.- Marco Teórico

La incorporación en el mercado farmacéutico de los llamados medicamentos genéricos, ha generado una problemática compleja que afecta un gran rango de entidades comenzando por el ámbito de la salud pública hasta llegar a la propia industria farmacéutica.

Cuando el período de patente de un fármaco está próximo a expirar, el laboratorio farmacéutico que desarrolló la marca registrada de este producto comúnmente designado como “innovador” o de “referencia” (R) puede intentar desarrollar una nueva formulación o forma farmacéutica, con el mismo principio activo para extender su marca de exclusividad. Paralelamente, otros laboratorios pueden intentar desarrollar marcas genéricas que contienen el mismo principio activo que el producto innovador, formulación de prueba (P).

Un tratamiento efectuado con un genérico tiene un coste indudablemente inferior a un medicamento de marca (el mismo principio activo y forma farmacéutica), y esta diferencia se debe principalmente a que el medicamento de marca refleja el costo de la gran inversión para desarrollarlo (estudios clínicos de eficacia y seguridad) que a diferencia del medicamento genérico no lo precisan. Para poder realizar una comparación de estos dos tipos de medicamentos e investigar si son intercambiables se recurre a la “biodisponibilidad” (BD) y “bioequivalencia promedio” (BE). (Zapater *et al.*, 1999).

Para entender más esta problemática comenzaremos con las definiciones de biodisponibilidad (BA) y bioequivalencia:

- De acuerdo a la FDA, (FDA, 2003), la biodisponibilidad se define como “la velocidad y extensión a la cual el ingrediente activo o entidad se absorbe desde una formulación y llega a estar disponible en el sitio de acción. Para formulaciones que no se absorban en el flujo sanguíneo, la biodisponibilidad se podría evaluar mediante mediciones que reflejasen la velocidad y extensión en la que el ingrediente activo o entidad esté disponible en el sitio de acción”. La definición dada por la Agencia del Medicamento europea (EMA, 2001) es casi la misma pero considera un elemento adicional y específico “que se entiende que la extensión y la velocidad de una sustancia activa o su entidad se libera desde una forma farmacéutica y llega a estar disponible en la circulación”.
- La bioequivalencia (BE) es un término utilizado para la comparación de dos o más formulaciones basadas en la velocidad y magnitud de la absorción. Para la FDA (2003) y EMA (2001), “dos productos medicinales son bioequivalentes si son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas y sus biodisponibilidades después de la administración en la misma dosis molar son similares en sus efectos con respecto a la eficiencia y seguridad, las que deben ser las mismas”.
- Una alternativa farmacéutica (WHO Working document QAS/04.093/Rev.4), es un término referido a aquellos medicamentos que contienen el mismo principio activo o entidad farmacéutica, pero difieren en la forma química (sal, éster, etc.) y/o forma farmacéutica (por ejemplo, tableta versus cápsula).
- La equivalencia farmacéutica, se refiere a aquellas formulaciones que contienen la misma cantidad molar del principio activo o entidad en la misma forma farmacéutica y que tienen los mismos

estándares (identidad, calidad, potencia, pureza, etc.). La equivalencia farmacéutica no implica necesariamente bioequivalencia y/o equivalencia terapéutica pues se pueden encontrar algunas diferencias en la calidad del producto, debido a los excipientes y/o proceso de manufactura.

La BE de medicamentos constituye un área en continuo desarrollo. Es una problemática que presenta algunas complejidades, lo que ha generado la necesidad de continuar realizando investigaciones para mejorar entre otros aspectos tan trascendentales como los diseños experimentales y las metodologías estadísticas asociadas a estos diseños. En especial abordaremos el caso de las drogas de alta variabilidad, que constituyen un gran problema para su evaluación en la actualidad.

1.1.1.- El rol de la Farmacocinética y parámetros farmacocinéticos en Bioequivalencia

La Farmacocinética juega un rol muy importante en la biodisponibilidad. La Farmacocinética, es la rama de la farmacología que estudia los procesos a los que un fármaco es sometido a través de su paso por el organismo. Su objetivo principal es comprender qué ocurre con un medicamento desde el momento en el que es administrado hasta su total eliminación del organismo. Para ello, se han utilizado modelos matemáticos para caracterizar y estimar parámetros clínicos relevantes asociados a la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de la droga. Estos modelos y parámetros asociados, por un lado, tienen algunas propiedades que informan sobre la velocidad de absorción, acumulación, distribución, metabolismo y eliminación y por otro lado permiten construir modelos que incluyen factores importantes para el metabolismo de una droga, (Rodda, 1990).

Los modelos utilizados para describir la dinámica del fármaco en el organismo suelen estar basados en compartimentos, donde cada compartimento se puede tomar como un espacio imaginario en el cuerpo que representa una combinación de tejidos y órganos en los cuales la concentración de una droga entra en equilibrio (Kwon, 2001). El número de compartimentos se determina en forma empírica dependiendo de los perfiles de la concentración vs tiempo de la droga en el organismo.

El modelo compartimental permite:

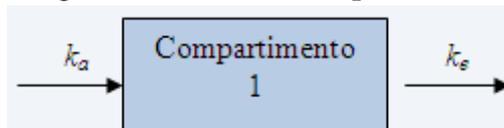
- a.- La comprensión conceptual de los ambientes de distribución de una droga entre el plasma (sangre) y otros tejidos u órganos en el cuerpo.
- b.- Evaluar empíricamente cambios en los procesos fisiológicos como el transporte de membranas o metabolismo sin efectuar investigaciones del mecanismo.
- c.- Estimar los parámetros farmacocinéticos, tales como: constantes de eliminación, clearance, y volumen aparente de distribución.

El modelo compartimental requiere de un análisis matemático (usualmente a través de regresiones no lineales), para estimar los parámetros a partir del perfil farmacocinético. El primer paso es determinar el modelo: mono, bi o multicompartimental.

Los modelos monocompartimental y bicompartimental son los más utilizados. Las propiedades de las sustancias que actúan como excipientes, las características de las membranas biológicas y la forma en que las sustancias pueden atravesarlas, o las características de las reacciones enzimáticas que inactivan al fármaco, son de necesario conocimiento para la correcta comprensión de la cinética del fármaco (Weiner *et al.* 1994).

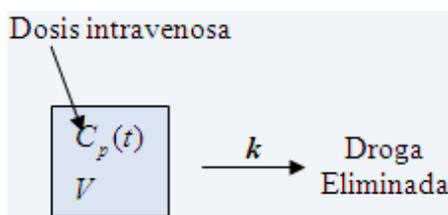
El modelo de un compartimento se visualiza en la Figura 1.

Figura 1: **Modelo de 1 compartimento**



Cuando se administra una droga, ésta se localiza en este primer sitio de administración, antes de distribuirse a las diferentes regiones del cuerpo. Por ejemplo, una inyección intravenosa, se distribuye a todo el cuerpo en forma instantánea desde el sitio de su administración y podría considerarse que su distribución es farmacocinéticamente homogénea en él. En la Figura 2, $C_p(t)$ corresponde a la concentración de la droga en el plasma a tiempo t , k es la constante de eliminación de primer orden y V es el volumen aparente de distribución en el compartimento (Kwon, 2001).

Figura 2: **Modelo de un compartimento con eliminación de primer orden después de una administración intravenosa**



El análisis simple de un modelo de un compartimento lo podemos resumir de la siguiente manera: La cantidad de droga presente en el cuerpo a cualquier tiempo t , en un modelo de un compartimento está representada por la ecuación:

$$A(t) = C_p(t) \cdot V$$

Donde, $C_p(t)$ y V es la concentración de la droga en el plasma y volumen aparente de distribución respectivamente. La ecuación que describe la concentración plasmática $C_p(t)$ a un tiempo t en un modelo de un compartimento después de una inyección intravenosa está representada en la ecuación de la Figura 3:

Figura 3: **Concentración plasmática en un modelo de un compartimento**

$$C_p(t) = \frac{D_{iv}}{V} e^{-k \cdot t}$$

$\underbrace{\hspace{1.5cm}}_{C_p(0)}$

Donde $C_p(0)$ es la cantidad a tiempo cero y k es la constante de eliminación de primer orden. Los valores de esta ecuación se pueden ajustar a datos de concentración plasmática y tiempo para estimaciones de V y k . El “clearance” o nivel de aclaramiento (Cl_s) y vida media ($t_{1/2}$) de una droga, se puede estimar a través de las siguientes ecuaciones:

$$Cl_s = k \cdot V, \quad y \quad t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

En el modelo de un compartimento (Kwon, 2001), la droga no tiene necesariamente la misma concentración en todos los tejidos y órganos en el cuerpo. Esto significa que las concentraciones de la droga en los diferentes tejidos y órganos están en un equilibrio instantáneo, en los cuales se establece un equilibrio tejido-droga constante.

La ecuación logarítmica que permite calcular la concentración del fármaco en este modelo es:

$$\ln C_p(t) = \ln C_p(0) - k \cdot t, \text{ donde:}$$

$C_p(t)$ = concentración de la droga en el compartimento a tiempo t

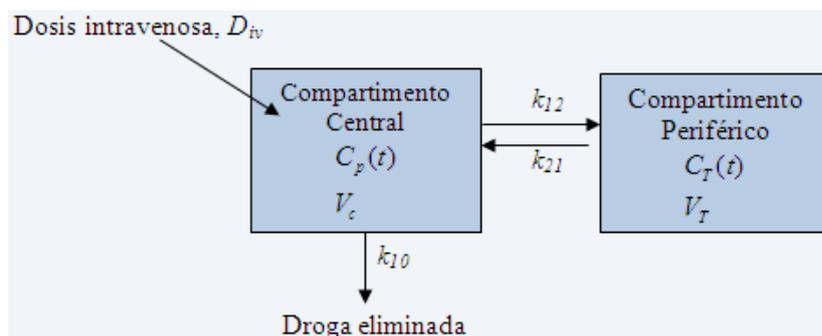
$C_p(0)$ = concentración de la droga en el compartimento a tiempo cero

k = constante de eliminación de primer orden

En este modelo, el cuerpo es visto como un compartimento único con las velocidades de absorción de la droga en el sistema y eliminación de la droga del sistema. Ver el cuerpo como un solo compartimento no significa que la concentración de la droga en los tejidos del cuerpo a un tiempo dado sean los mismos, si el modelo asume que los cambios cuantitativos de concentraciones en el plasma reflejan los cambios de concentración de la droga. Esta ecuación puede ser inapropiada cuando la droga se administra en forma oral (Kwon, 2001).

En un sistema de 2 compartimientos, Figura 4, el primer compartimento (central) representa el plasma sanguíneo y el segundo compartimento los tejidos periféricos. Las constantes k_{12} y k_{21} , representan las velocidades de transferencia entre plasma y tejido y la k_{10} indica la velocidad de eliminación de la droga.

Figura 4: **Modelo de 2 Compartimientos con eliminación de 1er. orden**



donde,

$C_p(t)$ = concentración de la droga en el compartimento central (plasma) a tiempo t

$C_T(t)$ = concentración de la droga en el compartimento periférico (tejido) a tiempo t

D_{iv} = Es una dosis intravenosa,

k_{12} = constante de distribución de primer orden de la droga del compartimento central al periférico.

k_{21} = constante de distribución de primer orden de la droga del compartimento periférico al central.

k_{10} = constante de eliminación del compartimento central,

V_c = Volumen de distribución en el compartimento central

V_T = Volumen de distribución en el compartimento periférico.

El cálculo de la concentración plasmática en este modelo esta descrita por la siguiente ecuación:

$$C_p(t) = A \cdot e^{-\alpha t} + B \cdot e^{-\beta t}$$

Los valores de A, B, α y β que se pueden obtener de los interceptos y pendientes de la gráfica concentración plasmática vs tiempo. Estos parámetros se pueden utilizar para estimar $C_p(0)$, V_c y las constantes k_{12}, k_{21}, k_{10} . A tiempo cero se cumple que:

$$C_p(0) = A + B, \text{ por lo tanto, } V_c = \frac{D_{iv}}{C_p(0)} = \frac{D_{iv}}{A + B}$$

Las relaciones que existen entre las constantes son las siguientes:

$$k_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A + B}; k_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}} \text{ y } k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10}$$

A partir de estas relaciones entre las constantes y V_c se pueden calcular el “clearance” sistémico (Cl_s) y volumen de distribución al estado de equilibrio (“steady state”, V_{ss}), importantes de considerar en el cálculo de los parámetros farmacocinéticos que se utilizarán en el análisis de la bioequivalencia.

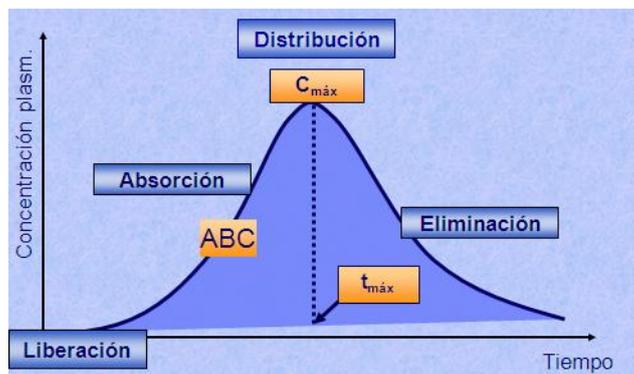
$$Cl_s = k_{10} \cdot V_c \text{ y } V_{ss} = V_c \cdot (1 + k_{12} / k_{21})$$

El ajuste a un modelo determinado es una etapa de gran importancia, pues determinará el cálculo de los parámetros farmacocinéticos que se analizarán dentro de un estudio de Bioequivalencia. Es una de las etapas que forma parte de la complejidad asociada a los estudios de BE y que en algunos casos como en drogas de alta variabilidad puede ser determinante en su resultado final.

Una vez que los datos obtenidos se ajustan a un modelo, se procede al cálculo de los parámetros farmacocinéticos que se utilizarán en el estudio de la bioequivalencia. Hay diferentes parámetros, pero principalmente son dos los fundamentales para el análisis de la BE: el área bajo la curva y la concentración máxima. El área bajo la curva que es un muy buen indicador de la cantidad de droga absorbida (FDA, 2003; Shah *et al.*, 1996) y la concentración máxima que es un indicador de la velocidad de absorción con que la droga llega al sitio de acción.

Hay también otros parámetros farmacocinéticos que se calculan a partir de la curva de concentración vs tiempo del principio activo, medidas en el plasma de los voluntarios sanos que participan en el estudio. Todos estos parámetros nos entregan diversa información acerca de la velocidad con que llega al sitio de acción, la cantidad que se ha absorbido, la velocidad de eliminación, etc., todos ellos importantes también para la caracterización cinética de la droga a partir de la primera etapa del metabolismo, que se caracteriza por la liberación, absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y eliminación (proceso denominado LADME). Ver en Figura 5, los parámetros farmacocinéticos y la representación del proceso LADME de un fármaco.

Figura 5: Proceso LADME y parámetros farmacocinéticos



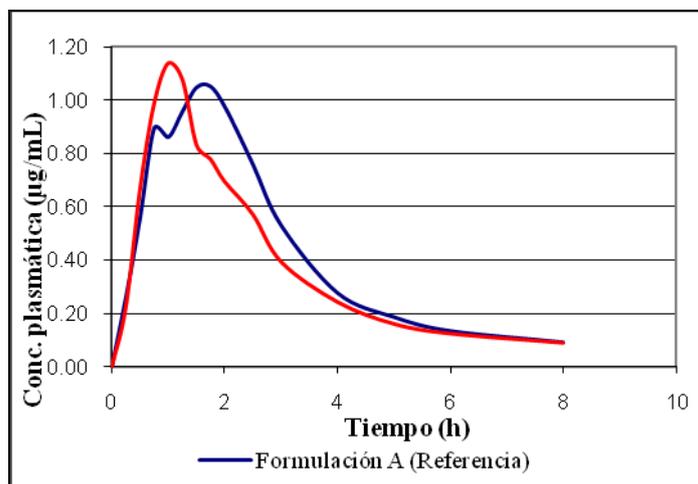
Las agencias reguladoras destacan como más importantes los siguientes parámetros farmacocinéticos: Área bajo la curva de tiempo cero al tiempo t , donde t es el último punto al que es medible una concentración en cada formulación (ABC_{0-t}); Área bajo la curva de tiempo cero al tiempo infinito ($ABC_{0-\infty}$), en donde $ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + C_t/\lambda_z$, donde C_t es la última concentración de droga medible y λ_z , es la constante de eliminación; la vida media de eliminación del fármaco (K_e), la concentración plasmática máxima ($C_{máx}$), y, el tiempo en que aparece esta concentración máxima $T_{máx}$.

Los parámetros ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$, nos permiten conocer la cantidad de droga absorbida en el organismo, y $C_{máx}$, con $T_{máx}$, nos indican la velocidad a la que fármaco se absorbe y llega a la circulación sistémica.

Hay un problema importante en el parámetro indicador de la velocidad de absorción. Tradicionalmente $T_{máx}$ y $C_{máx}$ representan en parte este fenómeno, sin embargo, $T_{máx}$ tiene la gran desventaja de su alta dependencia de la frecuencia de muestreo y $C_{máx}$ es una medida mixta que no solo representa a la velocidad de absorción sino también a la extensión o cantidad de droga absorbida. A pesar de este inconveniente, $C_{máx}$ sigue siendo el parámetro farmacocinético crítico para evaluar algún efecto adverso potencial en ciertos medicamentos y en conjunto con $T_{máx}$ proporcionan información clínica muy importante en términos de la velocidad de absorción (Tothfalusi *et al.*, 2001).

Estos dos últimos parámetros presentan algunas problemáticas que se ven acentuadas en el caso de drogas de alta variabilidad. Para este caso particular de drogas, existen una serie de recomendaciones de medidas alternativas que permitirían evaluar en forma mas cercana la velocidad, si bien dichas medidas aun son objeto de opiniones controvertidas; las examinaremos con detalle para ver su comportamiento con datos reales de una droga de muy alta variabilidad, la Furosemida. La Figura 6, representa las dos curvas de concentración vs tiempo de la formulación de referencia y de prueba de la Furosemida, droga de la cual se ha efectuado un análisis comparativo de Bioequivalencia.

Figura 6: Curva Concentración plasmática vs. Tiempo de Furosemida



La importancia de la Farmacocinética, la Farmacodinamia y en especial algunos parámetros farmacocinéticos se aborda en el artículo de la revista International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics (ver apartado 7), donde se muestra un estudio comparativo de bioequivalencia promedio realizado sobre datos reales de una droga clasificada de alta variabilidad, la Furosemida, y en la cual se analizan y discuten diferentes metodologías para la determinación de la ABE.

1.1.2.- Pruebas de Bioequivalencia, estableciendo el problema

La BE es un concepto complejo y multidimensional. Hemos revisado en el capítulo anterior los parámetros que se utilizan en forma cuantitativa para su estudio y algunas de las variables que intervienen en su cálculo. La hipótesis asociada a la “bioequivalencia promedio” (ABE) es que, la droga o principio activo está en la misma cantidad media en las dos formulaciones que están bajo comparación y que su efecto terapéutico depende principalmente de su concentración en el sitio de acción y que debería ser similar en todas las formulaciones comparadas.

A pasar de los años, se han utilizado varios criterios para establecer la condición de ABE. En Chow *et al.*, (2000), se resumen de acuerdo a las principales recomendaciones regulatorias:

a.- Regla 80/20: Las medias de la formulación de referencia y de prueba no deberían ser significativamente diferentes, a un nivel de significación del 5%, es decir $\alpha = 0.05$. Debería haber al menos un 80% de potencia para detectar diferencias, es decir, $1 - \beta = 0.80$, considerando que la verdadera diferencia podría ser al menos un 20% de la media observada de la formulación de referencia.

b.- Regla 75/75: Al menos un 75% de los sujetos deberían mostrar un valor de biodisponibilidad de al menos un 75% de la correspondiente medida de la biodisponibilidad de la formulación de referencia.

c.- Regla ± 20 : La biodisponibilidad media de la formulación de prueba μ_T , debería estar dentro del $\pm 20\%$ de la media de la formulación de referencia, μ_R , es decir, la razón de medias debería estar en el intervalo $0.8 < \mu_T / \mu_R < 1.20$.

d.- Regla 80/125: En la actualidad es la más ampliamente utilizada y esta recogida en las principales regulaciones de las agencias del medicamento. Se aplica a los datos transformados a la escala logarítmica. Permite declarar BE en términos de una diferencia (en la escala logarítmica) en lugar de una razón en la escala original. Si, en la escala original de la biodisponibilidad, se considera que una razón de medias geométricas entre el 0,8 y el 1.25 es admisible, es decir, $0.8 < \text{media}_T / \text{media}_R < 1.25 = 1/0.8$, así las medias de las variables en escala logarítmica corresponden a las medias geométricas en la escala original, esta desigualdad se convierte en $-\ln(0.8) < \mu_T - \mu_R < \ln(1.25) = 0.22314$. Es decir, el criterio 80/125 en escala original se convierte en ± 0.223 para la diferencia de medias en la escala logarítmica. Ambos criterios son equivalentes (80/125 o ± 0.223), cada uno en su escala.

La forma de plantear las hipótesis en los estudios clínicos clásicos no es la más adecuada para la bioequivalencia (Zapater *et al.*, 1999). Si se plantease de la forma tradicional, y se utilizase un valor arbitrario del error de tipo I (probabilidad de rechazar H_0 cuando es cierta), usualmente prefijado en $\alpha=0.05$, como criterio de rechazo o no rechazo y considerando un valor de potencia también prefijado en forma arbitraria en 0.80 (valor utilizado para el cálculo del tamaño muestral), la prueba no permitiría detectar diferencias en al menos 20 de cada 100 comparaciones. Por ello se plantea una estrategia diferente, es decir, se busca rechazar la hipótesis de *No Bioequivalencia* al nivel nominal del 5% a favor de la hipótesis alternativa de *Bioequivalencia*.

La declaración de BE se establece en función de una prueba de equivalencia para el efecto de la formulación denominado ϕ , donde ($\phi = \mu_T - \mu_R$).

$$H_0: \phi \leq \theta_1 \text{ y } \phi \geq \theta_2$$

$$H_1: \theta_1 < \phi < \theta_2$$

Donde, habitualmente $-\theta_1 = \theta_2 = \theta = 0.223$ y en el que se asumen límites de equivalencia simétricos: $\pm \theta = \pm 0.223$ para los datos en la escala logarítmica. Schuirmann (1987), sugirió descomponer la hipótesis de bioequivalencia en dos hipótesis unilaterales:

$$\begin{aligned} H_{01}: \phi \leq \theta_1 & & H_{02}: \phi \geq \theta_2 \\ H_{11}: \phi > \theta_1 & \text{ y } & H_{12}: \phi < \theta_2 \end{aligned}$$

y concluir la condición de ABE si y sólo si ambas hipótesis H_{01} and H_{02} se rechazan a un nivel nominal de significación α (por ejemplo, 0.05). Este procedimiento se conoce con el nombre de two one-sided test (TOST).

Ahora, bajo esta nueva forma de plantear la hipótesis nula, si se rechazan ambas hipótesis nulas, H_{01} y H_{02} podemos decir que ambos fármacos son bioequivalentes, y, en cambio, si no se rechazan alguna de las dos hipótesis nulas, los fármacos no son considerados bioequivalentes.

Este procedimiento es operacionalmente equivalente al “principio de inclusión del intervalo de confianza”. Se declara ABE si el intervalo de confianza $1 - 2\alpha$ más estrecho (shortest confidence interval):

$$\bar{D} \pm t_{\alpha, N-2} \cdot se_{\bar{D}}$$

está dentro de los límites de bioequivalencia $[\theta_1, \theta_2]$, donde $t_{(\alpha, N-2)}$ es el cuantil $1 - \alpha$ de una distribución t de Student con $N - 2$ grados de libertad. Específicamente, se declara ABE con $\alpha = 5\%$ si el intervalo de confianza del 90% para la diferencia de medias con datos transformados logarítmicamente están dentro de los límites $\theta = \pm 0.223$. En el artículo de la revista SORT, se detalla el sentido de N y de los estadísticos \bar{D} y $se_{\bar{D}}$

En la toma de decisión se pueden plantear dos errores posibles:

- Error del Tipo I, que implica declarar bioequivalencia cuando efectivamente las formulaciones comparadas no lo son.
- Error del Tipo II, que implica no poder declarar bioequivalencia cuando en realidad sí lo son.

De estos dos tipos de errores el menos aceptable es el del Tipo I o *Riesgo Sanitario* o *del consumidor*, es decir, declarar bioequivalencia cuando realmente no la hay. Se admite una probabilidad no mayor al 5% para la ocurrencia de este error. De ahí entonces que la prueba de hipótesis se construya bajo la hipótesis de no bioequivalencia. El error del tipo II o *riesgo del sponsor* (o *productor* o *patrocinador*), es no poder declarar bioequivalencia cuando en realidad sí la hay, véase Tabla 1.

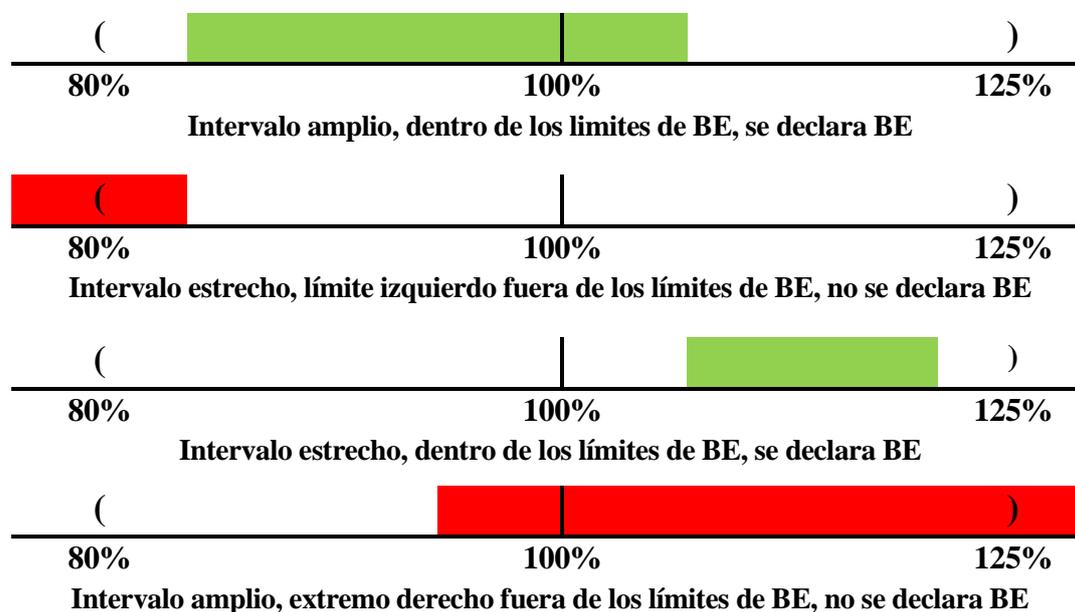
Tabla 1: Errores de tipo I y II para Bioequivalencia

La decisión es:	La hipótesis Nula de bioequivalencia es:	
	Verdadera	Falsa
No rechazar la hipótesis nula de bioequivalencia	Decisión correcta	Error del tipo II Riesgo del productor β
Rechazar la hipótesis nula de bioequivalencia	Error del tipo I Riesgo del consumidor α	Decisión correcta

Hauschke et al., *Bioequivalence Studies in Drug Development*. 2007

Una forma gráfica de visualizar los posibles resultados de las pruebas de hipótesis aplicados a datos en la escala original, de acuerdo a los criterios clásicos de la bioequivalencia los podemos visualizar en la Figura 7 (la zona coloreada representa la amplitud del intervalo calculado).

Figura 7: Posibles Resultados de las Pruebas de Hipótesis con límites clásicos



El planteamiento de hipótesis en términos de equivalencia permite realizar numerosas aplicaciones en diferentes ámbitos de investigación. Dichas aplicaciones se enumeran, y algunas se examinan con cierto detalle, en el artículo de la revista SORT. Este artículo, revisa a fondo el concepto de equivalencia asociado a algunos ejemplos de aplicación: bioequivalencia en una droga de variabilidad intermedia, ontología genética, bondad de ajuste de un modelo, etc.

1.1.3.- Límites o Criterios de Bioequivalencia

Tal como ya se ha comentado, en la actualidad, las agencias del medicamento más importantes a nivel mundial, FDA (2001) y EMEA (2001), establecen que para evaluar la bioequivalencia (denominada como bioequivalencia promedio, ABE, en las dos regulaciones actuales), se debe realizar la comparación entre una formulación estándar o de referencia y otra la otra formulación de prueba. Si la razón de medias geométricas (GMR) de las medidas de biodisponibilidad de las dos formulaciones (Prueba/Referencia) comparadas cae dentro de unos límites preestablecidos – 80/125% – la formulación de prueba puede ser considerada como bioequivalente respecto a la formulación de referencia.

Para el caso de drogas de alta variabilidad, estos límites son muy difíciles de cumplir para esta misma condición. Se ha propuesto por parte de estas agencias reguladoras ciertos límites ampliados, pero también hay otros métodos publicados en la literatura que permiten escalar estos límites.

La importancia de la ampliación de límites y de criterios para ampliar y establecer la ABE, se consideran en detalle en el artículo de la revista International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics (ver versión completa en el apartado 7 de Publicaciones), donde se muestra un estudio comparativo de ABE aplicados a datos reales. Aquí se discuten algunas propuestas de las agencias del medicamento para el caso de medicamentos o productos de alta variabilidad en conjunto con algunas

propuestas innovadoras de la literatura científica de las cuales hasta este momento no se han realizado ningún tipo de evaluación con datos reales.

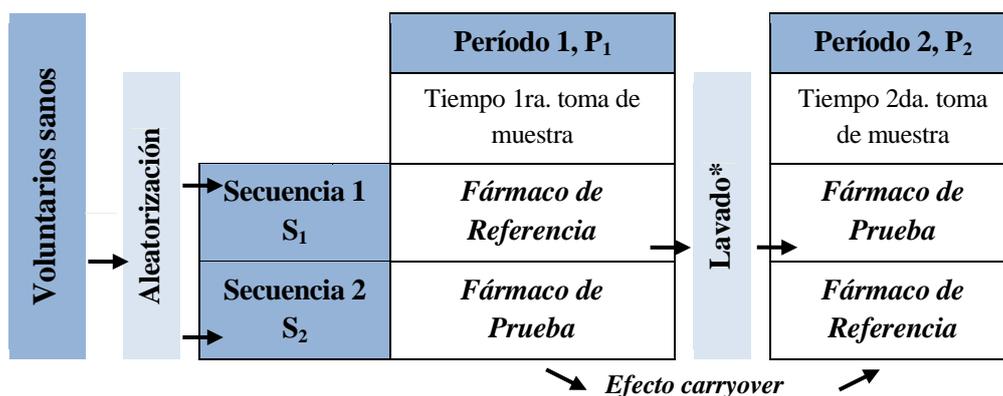
1.1.4.- Carryover en Bioequivalencia

El diseño requerido por la mayoría de agencias regulatorias para realizar un estudio de bioequivalencia corresponde a un diseño cruzado (“crossover”) de 2×2 (dos periodos, dos secuencias). Cada voluntario sano es asignado al azar a la secuencia 1 ó 2. Los voluntarios de la secuencia 1, reciben primero la formulación de referencia y en el segundo periodo la formulación de prueba. En la secuencia 2, los voluntarios en el primer periodo reciben la formulación de prueba y en el segundo período reciben la formulación de referencia, ver Figura 8.

Los dos periodos están separados por un tiempo de depuración suficiente que permite en teoría la total eliminación del fármaco o metabolitos administrados durante el primer período. Este diseño tiene algunas ventajas como:

- Cada individuo sirve como su propio control, es decir, permite la comparación de las dos formulaciones en el mismo individuo.
- Cuando se comparan ambas formulaciones, la variabilidad interindividual es mínima.
- Se requieren menos individuos que en un estudio en paralelo para obtener la misma potencia.

Figura 8: Diseño crossover de 2×2



* Tiempo de depuración, (≈ 6 a 8 vidas medias del Fármaco).

Este diseño, presenta algunos efectos propios que conviene tener en cuenta:

a.- Posible **Efecto Carryover** en estudios de BE, se refiere al efecto que persiste del fármaco administrado anteriormente en el periodo siguiente (Senn, 2002). Producido principalmente cuando no ha habido un tiempo de depuración adecuado del fármaco administrado entre período evaluados. Este efecto puede deberse también a otros factores. Lo hemos examinado en profundidad en el artículo enviado a la revista Pharmaceutical Statistics: “The Effect of Variability and Carryover on Average Bioequivalence”, dado la influencia que tiene en los demás efectos y su posible impacto en el resultado final de un estudio de BE en caso de estar presente.

b.- **Efecto Formulación** (Formulaciones de Prueba, F_P y de Referencia F_R) (Senn, 2002): Se refiere al efecto que ocurre si el tratamiento no es constante en el tiempo, también lo denomina como interacción del periodo - formulación. Si este efecto resulta ser significativo, según Zanen (2003), se podría ignorar, ya que se puede producir en forma artificial cuando la variabilidad es baja o hay un número de voluntarios

muy alto. No tiene el sentido de comparar en si mismo a las dos formulaciones, que se deben evaluar por el procedimiento de TOST o el intervalo de confianza estrecho al 90% para la diferencia de medias transformadas a logaritmo. Esto lo corrobora Chow *et al.*, (2000), donde especifica que la hipótesis nula de igualdad de biodisponibilidad entre formulaciones no implica ABE entre formulaciones de acuerdo a los requerimientos de la FDA.

c.- **Efecto Secuencia** (S_1 vs S_2): Se refiere a las diferencias que se pueden encontrar según el orden de administración de las formulaciones que se comparan. Si este efecto fuese significativo (Zanen, 2009), se podría suponer que hay un efecto carryover presente o bien un efecto de la interacción entre tratamiento y período. Estos dos efectos se confunden y es difícil reconocerlos con certeza. Por consiguiente, bajo ciertas circunstancias el efecto secuencia significativo se puede ignorar en el caso de que:

- El estudio se realice bajo el régimen de dosis única,
- El estudio se ejecute en voluntarios sanos,
- No se realice la comparación en sustancias endógenas,
- El estudio cuente con un periodo de depuración adecuado,
- Se utilice un diseño y análisis apropiado.

d.- **Efecto Período** (P_1 vs P_2), es el efecto que se pueda encontrar entre los resultados obtenidos en el primer período y segundo período de estudio dentro del diseño.

Si está presente (Zapater *et al.*, 1999), puede indicar algún problema en el desarrollo del estudio: problemas de manejo, análisis y almacenamiento de la muestra, diferencias climáticas, dietéticas, actividad física u otras. Este efecto también se puede dar (Senn, 2002) cuando al momento de inicio del estudio no todos los voluntarios se presentan, y algunos de ellos comienzan mas tarde. Al final, algunos de ellos habrán finalizado el estudio en diferentes tiempos. Para Zanen (2009), si hay diferencias significativas, este puede deberse al hecho de que en uno de los dos períodos, los niveles plasmáticos ($C_{máx}$ y ABC) son mayores o menores que en el otro. La causa puede deberse a muchos factores, uno frecuente puede deberse a que en el segundo período todos los voluntarios recibieron zumo de pomelo en vez de agua y se detectaron niveles incrementados en las dos secuencias. El zumo de pomelo puede inhibir el metabolismo de algunas drogas. Este no es un problema del carryover, además el efecto es igual en ambas secuencias y es indetectable utilizando las pruebas para carryover.

Hay aún discusión acerca del significado que puede tener la presencia de un efecto período y su causa. Algunos argumentan que si ambos tratamientos son afectados en la misma forma, no hay cambios, las diferencias son iguales y la comparación sigue siendo válida entre los tratamientos. En todo caso, el supuesto básico de que ambos tratamientos son igualmente afectados debe probarse, lo que puede llegar ser difícil.

De todos estos efectos que se deben evaluar al inicio del estudio de BE, el más importante está dado por el efecto carryover. Si se detecta en el estudio:

- Puede invalidar el análisis para detectar el efecto formulación y período, pues condiciona su cálculo.
- Puede inhabilitar la conclusión de un estudio de BE.

En la actualidad el efecto carryover no está exento de controversias. Algunos investigadores indican que la probabilidad de que se presente en un estudio de BE bien planificado es muy baja

(D'Angelo *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 2004; Senn *et al.*, 2005), otros sin embargo, indican que esta probabilidad no es tan baja y se discuten diferentes formas de plantear la evaluación de su presencia (Putt, 2004; 2005).

En el artículo enviado a la revista *Pharmaceutical Statistics* (ver apartado 7), se estudia el efecto de la variabilidad y carryover en estudios de ABE, a través de simulaciones realizadas bajo el diseño de crossover 2×2. Se analizaron varias combinaciones de efecto carryover, variabilidad, efecto formulación y tamaño de muestra aplicados a varios tipos de intervalos de confianza descritos en la literatura: el intervalo clásico “shortest”, Westlake, Hsu *et al.* (1994) simétrico y no simétrico (específico). La evaluación se realizó en términos del porcentaje de aprobación de la declaración de ABE, recubrimiento y precisión del intervalo.

1.1.5.- Drogas de alta variabilidad

Una de las problemáticas no resueltas aún dentro de la evaluación de la bioequivalencia son las drogas de alta variabilidad que se caracterizan por una gran variación intrasujeto (Tothfalusi *et al.*, 2001) y que hacen difícil la evaluación de la bioequivalencia.

Todas aquellas drogas o productos cuyos parámetros (en la escala original de medida, no en la transformada logarítmicamente) exhiben una variabilidad intrasujeto superior a un coeficiente de variación-ANOVA del 30% se consideran “drogas de alta variabilidad” (Blume *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1996; Midha *et al.*, 1997; 2005; 2006). Boddy *et al.*, (1995), considera un rango algo más amplio y las define como aquellas que muestran una variabilidad intrasujeto que excede un 25%. Midha *et al.*, 2005, recopila una serie de opciones para el análisis de este tipo de medicamentos, destacando, desde la ampliación de los límites y escalar la métrica hasta emplear una segunda métrica para la velocidad de absorción.

Algunos autores como Kytariolos *et al.*, (2006) y Karalis *et al.*, (2004; 2005), han desarrollado algunas aproximaciones metodológicas para analizar este tipo de drogas.

Conviene distinguir dos situaciones (Midha *et al.*, 2005):

- Las drogas de alta variabilidad presentan una *variabilidad intrasujeto* igual o superior al 30% ya sea de las Áreas bajo la curva y/o Concentración máxima, y
- Los productos de alta variabilidad, que son aquellas formulaciones que tienen una pobre calidad en su formulación y que presentan una *variabilidad intra-formulación* alta (por ejemplo, variabilidad tableta a tableta) y que también constituyen un problema de alta variabilidad, (aunque la droga no esté considerada como de alta variabilidad) y que deben también ser resueltas bajo estas mismas consideraciones.

Esta problemática la hemos examinado en el artículo aceptado en la revista *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* (en apartado de Publicaciones). En él se discuten las diferentes opciones descritas en la literatura para abordar la problemática de las drogas de alta variabilidad y se aplica a datos reales provenientes de una droga utilizada en enfermedades cardiovasculares que presenta una alta variabilidad, ampliamente descrita en la literatura, la Furosemida. Se analizan algunas metodologías recientemente publicadas y se consideran en el análisis algunas características farmacocinéticas y farmacodinámicas que enriquecen la discusión. También se puede revisar el artículo de la revista SORT que fundamenta la base teórica del anterior.

1.1.6.- Tamaño de muestra en Bioequivalencia

El tamaño de muestra que recogen las dos principales agencias del medicamento: FDA, 2001 y EMEA, 2001, mínimo para la realización de un estudio de BE, es de 12 voluntarios.

En la actualidad, una gran mayoría de estudios de BE fluctúan entre los 24 a 36 voluntarios sanos, muy pocos si los comparamos en relación a los miles de pacientes que se podrían llegar a necesitar para llevar a cabo los estudios clínicos en pacientes.

Si consideramos la potencia que pueda tener el estudio de Bioequivalencia, ésta va a depender de la diferencia que podamos encontrar entre las dos formulaciones a comparar de la variabilidad y también del número de voluntarios que participen en el estudio. A mayor número de voluntarios mayor es la potencia. Esta situación implica un mayor costo del estudio y una mayor cantidad de voluntarios expuestos a la droga.

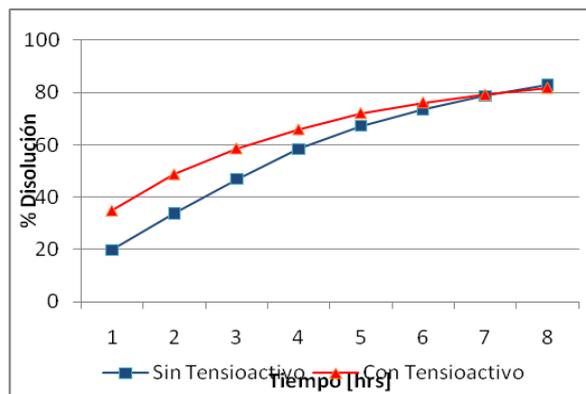
En el artículo de la revista SORT, se revisan algunas consideraciones de orden conceptual y en el artículo de la revista Pharmaceutical Statistics, se analiza el impacto del tamaño de muestra en un estudio de ABE, a través de simulaciones considerando la ausencia y presencia del efecto carryover en las propiedades de los intervalos de confianza que se construyen para la evaluación de la Bioequivalencia.

1.1.7.- Perfiles de disolución *in vitro*, Factor de similitud y Bioequivalencia

La absorción de un principio activo (FDA, 1997) depende de la liberación desde la forma farmacéutica que se ha administrado, la disolución o solubilización de la droga o principio activo bajo condiciones fisiológicas y de la permeabilidad a través de la membrana gastrointestinal. Estas características hacen pensar que la disolución *in vitro* puede ser muy relevante para predecir como será el desempeño *in vivo*. De ahí que las pruebas de disolución *in vitro* para formulaciones orales de liberación inmediata sean fundamentales para evaluar la calidad lote a lote, como herramienta de desarrollo de nuevas formulaciones y para asegurar la calidad del producto después de ciertos cambios como los asociados a: cambios de formulación (componente y composición), proceso de manufactura (equipamiento y proceso), sitio (lugar) de la manufactura y el escalamiento del proceso de manufactura.

El perfil de disolución *in vitro* se obtiene de lotes que se han usado en estudios clínicos, de biodisponibilidad o realizados durante el periodo de desarrollo del producto o formulación. Permiten generar una gráfica del porcentaje disuelto vs tiempo. La Figura 9, muestra dos perfiles de disolución de la Metoclopramida, realizados para estudiar el efecto de incorporar un tensioactivo a la fórmula. En ellos se graficó el perfil de disolución de las tabletas sin y con tensioactivo, como una herramienta de control de calidad.

Figura 9: Perfiles de disolución de Metoclopramida



Habitualmente estas comparaciones se realizan entre (Shah *et al.*, 1998):

- lote de referencia y un lote de prueba,
- lote de pre cambio y lote de post cambio,
- para comparar diferencias de efectividad, potencia, etc.

Los perfiles de disolución (EMA, 2001) tienen dos grandes aplicaciones:

a.- En el aseguramiento de la calidad:

- para obtener información en lotes de prueba utilizados en estudios de bioequivalencia/biodisponibilidad y en estudios clínicos para apoyar las especificaciones del control de calidad,
- como herramienta de control de calidad para demostrar consistencia en la manufactura,
- para obtener información del producto de referencia utilizado en los estudios de bioequivalencia/biodisponibilidad y estudios clínicos.

b.- Sustitución de la inferencia de Bioequivalencia:

- para demostrar similitud entre productos de referencia de diferentes estados miembros de la Comunidad Europea,
- demostrar similitud entre diferentes formulaciones de una sustancia activa (variaciones y nuevas) y el producto de referencia medicinal,
- para reunir información de lote a lote para examinar la consistencia de los productos (de prueba y referencia) que serán utilizados para la selección del lote apropiado para el estudio *in vivo*.

Los estudios de disolución son siempre necesarios, y la comparación de los perfiles de disolución forma parte de la evaluación de las solicitudes de exención de la bioequivalencia según el tipo de droga.

Para la agencia europea del medicamento, EMA, los estudios de disolución *in vitro* tienen como uno de sus objetivos prioritarios permitir la sustitución de pruebas de BE *in vivo*, para algunas drogas bajo ciertas condiciones, a través de la comparación de un índice matemático definido como factor de similitud (permite la comparación de dos perfiles de disolución):

- para demostrar similitud entre productos de referencia de diferentes estados miembros de la Comunidad europea. Aquí se destaca que solamente se considera a los productos de referencia,
- para demostrar similitud entre diferentes formulaciones de una sustancia activa (variaciones y nuevas) y el producto de referencia medicinal. Siempre sigue siendo objeto de comparación el producto de referencia.
- para reunir información de lote a lote para examinar la consistencia de los productos (de prueba y referencia) que serán utilizados para la selección del lote apropiado para el estudio *in vivo*.

En esta regulación, se establecen algunas condiciones (Blume *et al.*, 1999) sobre las cuales se podría evitar realizar un estudio de BE *in vivo* y por la cual la droga debería cumplir con algunos criterios relacionados con sus propiedades y patrones de calidad.

Respecto de sus propiedades:

- a.- No sea de margen terapéutico estrecho.
- b.- Exhiba una farmacocinética lineal y un efecto primer paso menor del 70%.
- c.- Sea altamente soluble en agua, en condiciones de rangos de pH de 1 a 8 a 37°C.
- d.- Sea altamente permeable en el intestino, es decir, la extensión de su absorción es mayor del 80%.

Respecto de sus patrones de calidad:

- a.- Los excipientes no deben tener un impacto significativo en la sustancia(s) activa (s).
- b.- La liberación de la sustancia activa es rápida en solución buffer durante todo el rango de pH fisiológico (1 a 8) a 37°C.

Si se cumplen todos estos criterios, los datos provenientes de los perfiles de disolución (comparados a través del factor de similitud, f_2 , detallado más adelante) permitirían determinar la BE. La similitud se debe establecer en todo el rango de pH de 1.3, 4.6 y 6.8.

Para la agencia americana, FDA (2000) en cambio, hay algunas exigencias más específicas. Está orientada principalmente a formulaciones orales de liberación inmediata para uso sistémico. En esta regulación, todas aquellas drogas que son de baja permeabilidad y solubilidad (pobre) y/o formuladas en formas farmacéuticas de disolución lenta, podrían ser consideradas como drogas con problemas potenciales de bioequivalencia. Por lo tanto, los estudios de BE *in vivo* se requieren precisamente para este tipo de drogas.

En otras palabras, la exención de la BE *in vivo* podría ser solicitada por el patrocinador (o Sponsor) si:

- a.- La droga es altamente soluble y altamente permeable.
- b.- La droga (producto) se disuelve rápidamente, es decir, más del 85% en los 30 minutos en todos los rangos de pH fisiológico: 1.3; 4.6 y 6.8.
- c.- La droga no sea de margen terapéutico estrecho.
- d.- Considerar además la estabilidad, de la droga en el tracto gastrointestinal debe estar asegurada en mas del 95% a las 3 horas, dado que sólo así se podrá asegurar una interpretación adecuada a partir de los estudios de solubilidad y permeabilidad.

Para la comparación de perfiles de disolución (Shah *et al.*, 1998), se han propuesto en la literatura mediante diferentes métodos: Shah *et al.* 1987-1989; Chow *et al.*, 2003; Sathe *et al.*, 1996; y Tsong *et al.*, 1996. En la actualidad se utiliza principalmente el método propuesto por Moore *et al.*, (1996), que define dos índices matemáticos independientes de todo modelo, llamados índice de similitud o f_2 , e índice de disimilaridad, f_1 . De los dos índices, es el índice de similitud, f_2 , se ha convertido en el método de elección habitual para la comparación de los perfiles de disolución.

Este índice se define en Shah *et al.*, (1998) como:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P (\mu_{Tj} - \mu_{Rj})^2 \right]^{1/2} \cdot 100 \right\}, \text{ donde}$$

μ_{Tj} y μ_{Rj} indican las “medias verdaderas” de la población correspondientes al tiempo $j, j = 1, \dots, P$, que deben estimarse a través de las medias muestrales:

$$\bar{X}_{Tj} = \hat{\mu}_{Tj} = \left(\sum_{k=1}^n \frac{x_{Tjk}}{n} \right) \text{ y } \bar{X}_{Rj} = \hat{\mu}_{Rj} = \left(\sum_{k=1}^n \frac{x_{Rjk}}{n} \right), \text{ donde}$$

x_{ijk} es el porcentaje disuelto acumulado desde la tableta o unidad $k, (k = 1, \dots, n)$; al tiempo de muestreo $t_j (j=1, \dots, P)$; del lote de referencia o de prueba, $i = T, R$. A partir de las medias muestrales se calcula el índice de similitud muestral \hat{f}_2 .

Los datos de disolución acostumbran a ser la medición de $n = 12$ tabletas o unidades de acuerdo a las especificaciones de la droga evaluada que están descritas en la Farmacopea correspondiente a cada país o región, por ejemplo, la Farmacopea americana (USP); la Farmacopea europea (Ph. Eur); la española (Real Farmacopea Española, RFE) etc. La Farmacopea es un libro oficial que contiene la información sobre medicamentos y drogas en sus distintos aspectos. Incluye el origen, la preparación, la identificación, la pureza, la valoración, la dosis y las demás condiciones que aseguren la calidad y uniformidad de sus propiedades.

Un valor de \hat{f}_2 comprendido en el rango de 50 a 100 se toma como evidencia de que los dos perfiles de disolución comparados son similares (FDA, 1997b). Este criterio presenta algunos problemas y limitaciones.

Liu *et al.*, 1997; argumenta que dado que \hat{f}_2 es un índice basado en un estadístico aleatorio, puede tomar diferentes valores en cada repetición con las mismas formulaciones de referencia y de prueba considerando las mismas condiciones experimentales. Ello implica que el criterio especificado por la SUPAC (FDA, 1997), no se puede formular como una hipótesis estadística en términos de los parámetros poblacionales para el cálculo de la similitud de la disolución. Al no haber una hipótesis estadística, no se puede evaluar las tasas de falsos positivos y falsos negativos para concluir similitud entre perfiles de disolución correctamente, es complicado evaluar la potencia, el tamaño de muestra, magnitud de los sesgos, validez de la aproximación y sensibilidad de la prueba. Por tanto, no puede haber inferencia estadística de la similitud entre perfiles a partir de la muestra con el criterio de que el índice de similitud muestral exceda un límite como 50. Shah *et al.*, 1998, corrobora estas apreciaciones, agrega además que dado que f_2 es una función de la diferencia de medias, no toma en cuenta las diferencias entre las disoluciones dentro de cada lote (referencia y de prueba). En especial, se requiere una interpretación muy cuidadosa cuando los lotes a comparar presentan diferencias grandes en la varianza.

Ma *et al.*, 2000, y Liu *et al.*, 1997, han establecido en forma precisa el problema de la comparación de las pruebas de disolución. Estos autores distinguen dos valores de f_2 : el valor “poblacional” o “teórico” de f_2 , construyen las hipótesis de similitud, y el valor muestral de f_2, \hat{f}_2 , (o estadísticos relacionados) para ser utilizados en la estimación del verdadero valor de f_2 o las pruebas de hipótesis.

Así, se han establecido las siguientes hipótesis de similitud en base a los perfiles de disolución:

$$H_0 : f_2 \leq \theta_0 \text{ vs. } H_1 : f_2 > \theta_0$$

donde el valor de θ_0 es el límite de similitud que habitualmente toma el valor de $\theta_0 = 50$ y es el valor considerado en la SUPAC.

Otra relación de importancia en el ámbito de aplicación de los perfiles de disolución, es el llamado Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS). Este sistema (Amidon *et al.*, 1995) se ha propuesto como una forma de correlacionar la disolución *in vitro* de una droga con la biodisponibilidad *in vivo*, a través del reconocimiento de que la disolución de una droga en conjunto con la permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales que controlan la velocidad y extensión de la absorción de una droga (conocimiento vital para un estudio de bioequivalencia). Este sistema utiliza un modelo humano de transporte y permeabilidad para la estimación de la absorción *in vivo* de la droga, que da cuenta de la importancia primaria que tiene la solubilidad y permeabilidad sobre la absorción oral de una droga.

De acuerdo a este sistema BCS, las drogas se podrían clasificar de acuerdo a su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal en cuatro clases que incorpora también la correlación *in vitro* – *in vivo* (IVIV), en la misma Tabla 2.

Tabla 2: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

Clase	Solubilidad Acuosa	Permeabilidad intestinal	Correlación <i>In Vivo/In Vitro</i> (IVIV) esperada
I	Alta solubilidad	Alta permeabilidad	Hay correlación IVIV, si la velocidad de disolución es mas lenta que el vaciamiento gástrico, de otra forma, la correlación está limitada o no la hay,
II	Baja solubilidad	Alta permeabilidad	Se espera correlación IVIV, si la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la disolución <i>in vivo</i> , a menos que la dosis sea muy alta.
III	Alta solubilidad	Baja permeabilidad	La absorción (permeabilidad) es la velocidad que determina y limita o no la correlación IVIV con la velocidad de disolución
IV	Baja Solubilidad	Baja permeabilidad	La correlación IVIV está limitada o no existe.

En la actualidad las drogas que están clasificadas como del grupo I, podrían ser objeto de la exención de los estudios de BE, por su alta solubilidad, alta permeabilidad y porque su desempeño no depende de su biodisponibilidad. Para el caso de drogas clasificadas en el grupo III, que también se caracterizan por una alta solubilidad, hay alguna situación algo más compleja. Para productos de liberación inmediata, se podrían asumir los mismos supuestos de exención, siempre y cuando su disolución sea rápida bajo todas las condiciones de pH gástrico. Sin embargo, hay otros argumentos en los cuales podrían ser considerados incluso mejores candidatos que las de clase I.

En este tipo de compuestos, la permeabilidad a través de la membrana intestinal será la velocidad que limita el proceso de la absorción. En estas condiciones la velocidad y extensión de la biodisponibilidad no es demasiado dependiente de las propiedades de la formulación, pero, sólo en el patrón de la permeabilidad *in vivo*.

Las pruebas de disolución y el correspondiente cálculo del factor de similitud en conjunto con el sistema BCS, se utilizan para justificar la exención de los estudios *in vivo* de bioequivalencia. Además, proporcionan una base científica para explorar e identificar la posibilidad de establecer una correlación IVIV. El establecimiento de esta correlación permite una base importante para tomar una decisión respecto de evitar un estudio de BE que realmente puede ser innecesario.

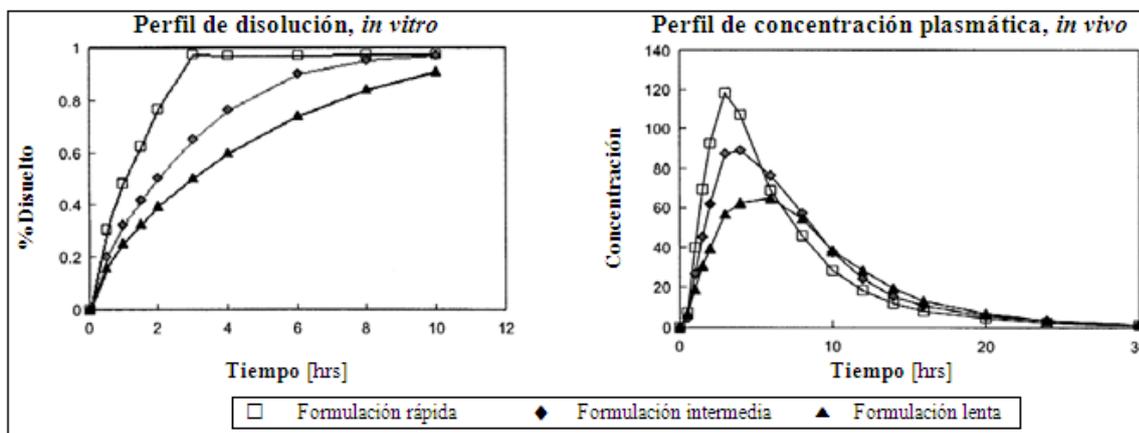
Dada la importancia que tiene la sustitución de estudios de BE *in vivo* por estudios *in vitro*, el cálculo del factor de similitud no solamente debe ser cuidadoso, respetando de forma estricta los protocolos establecidos, si no que es necesario analizar la validez de dichos protocolos y proponer métodos alternativos más adecuados si es necesario. La adecuación de substituir un estudio de BE *in vivo* por un estudio *in vitro* de perfiles de disolución se sustenta, en principio, en la validez estadística de los métodos *in vitro* (por ejemplo, que realmente respeten el *riesgo de usuario* o probabilidad de error de tipo I), tema estudiado en la presente monografía, y en la existencia de correlación IVIV.

La correlación IVIV es un modelo matemático predictivo (FDA, 1997b) que describe la relación entre un propiedad *in vitro* de una dosis oral (habitualmente la velocidad o extensión de la disolución de la droga o liberación) y una respuesta *in vivo* importante (por ejemplo, la concentración plasmática o cantidad de droga absorbida).

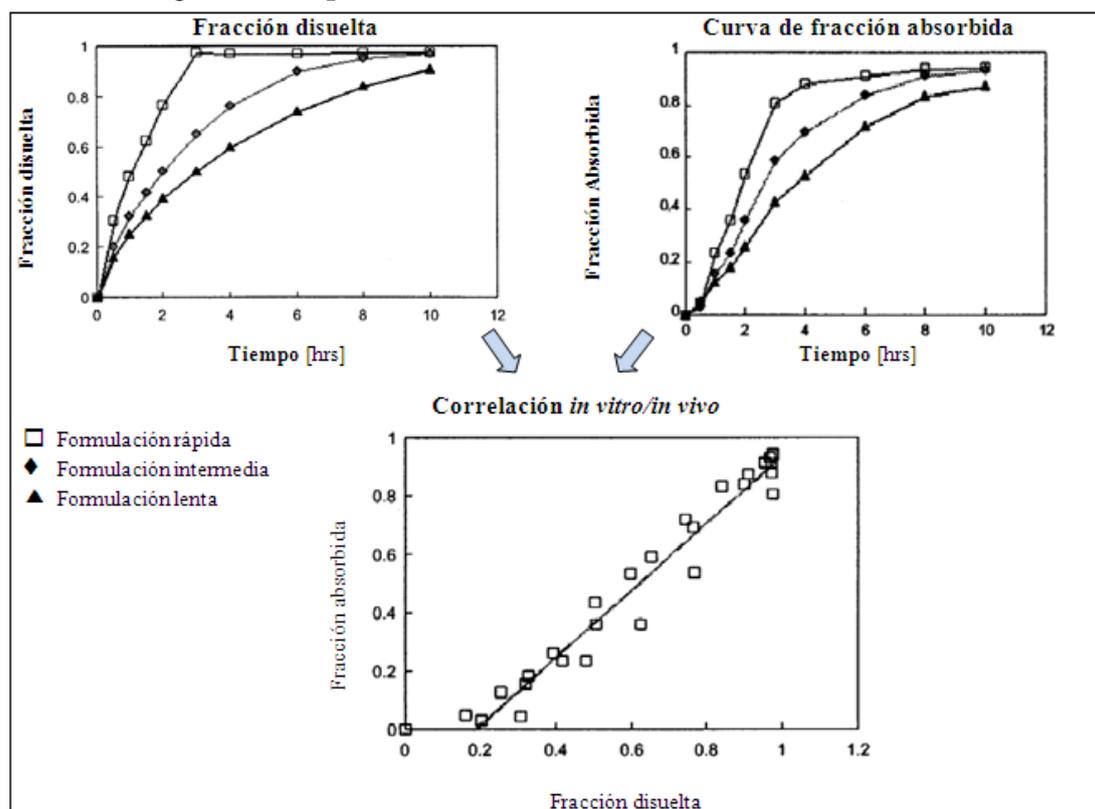
Un ejemplo de aplicación de esta correlación la podemos considerar para el caso de formas farmacéuticas de liberación modificada. Si se cambia un excipiente que controla la liberación en la formulación, debería estar dentro del rango establecido para la correlación. Si se ha establecido una correlación *in vitro/in vivo* se podría desarrollar solo una prueba de disolución a efectos de comparación. Además, con esta correlación ya establecida, se puede aplicar también a los cuatro niveles de post-cambio o escalado que están considerados en la guía de FDA, (1997a).

Una forma de visualizar como se construye esta correlación a partir del perfil de disolución y la curva de concentración plasmática las podemos examinar en las Figuras 10a y 10b.

Figura 10a: **Perfiles de disolución *in vitro* e *in vivo***



Ramana K. J. *Controlled Rel.* 72:127-132

Figura 10b: Esquema del desarrollo de la Correlación *in vitro/in vivo*

Ramana K. J. *Controlled Rel.* 72:127-132

Finalmente, los factores que permitirían decidir o no la bioexención de un estudio de BE *in vivo*, corresponden al sistema de clasificación biofarmacéutica de la droga estudiada, el perfil de disolución, perfil de concentración plasmática y la presencia o no de correlación *in vitro/in vivo*. Todos ellos analizados en forma conjunta pueden definir esta condición de exención.

En el artículo publicado en *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, se desarrollan varios índices con su correspondiente intervalo de confianza asociados a f_2 : \hat{f}_2 (valor muestral), $\hat{f}_{2,bc}$ (valor corregido por el sesgo), $\hat{f}_{2,Bbc}$ (valor corregido por el sesgo por método bootstrap), $\hat{f}_{2,Jbc}$ (valor corregido por el sesgo por método Jackknife) y se introducen diversos estimadores del error estándar de \hat{f}_2 . Se busca estudiar el comportamiento de todos estos índices y cual de ellos puede resolver mejor las limitaciones del índice original.

Este estudio se realizó a partir de datos reales de perfiles de disolución de Metoclopramida y de simulaciones.

1.2.- El rol de la Farmacogenética en la Bioequivalencia.

La Farmacogenética (Nussbaum, 2008) es relevante para la variación interindividual en la respuesta a medicamentos a través de dos procesos. Uno de ellos es el objeto de estudio de la **Farmacocinética**, que estudia la velocidad con la que el organismo absorbe, transporta, metaboliza o elimina los fármacos o sus metabolitos (un ejemplo fundamental es el sistema del citocromo P 450); el otro proceso es el objetivo de estudio de la **Farmacodinamia**, que estudia los efectos bioquímicos y fisiológicos de los fármacos y sus

mecanismos de acción y la relación entre la concentración del fármaco y el efecto de éste sobre un organismo (es decir, en receptores, enzimas o vías metabólicas).

La Farmacocinética y la Farmacodinamia, que ya hemos revisado anteriormente, cumplen un rol fundamental para conocer el paso de un medicamento por el organismo. A veces, hay algunas características propias del sujeto que hacen que este paso esté alterado, generando con ellos respuestas muy diferentes a los esperados. Es aquí donde la Farmacogenética juega un rol primordial que permite complementar el conocimiento de este paso por el organismo incluyendo las características genéticas al análisis de estas respuestas diferentes.

La Farmacogenética (Evans *et al.*, 2003; Brockmüller *et al.*, 2008; Roses, 2000; Weinsilboum, 2003), se relaciona con el estudio del rol de la herencia (las diferencias o factores genéticos) que influyen la variabilidad individual de la respuesta a los fármacos. Por otro lado, también se puede definir como una disciplina científica (Abad *et al.*, 2005; Com. Eur. EUR 21120: 25) destinada al estudio de los aspectos genéticos relacionados con la variabilidad en la respuesta a los medicamentos en individuos o poblaciones.

Hay otro término que frecuentemente se utiliza para referirse a la misma problemática: la Farmacogenómica. Sin embargo, esta disciplina (Ruiz-Canela, 2005) hace referencia al estudio sistemático de todo el genoma y sus productos en relación con los procedimientos de diseño, descubrimiento y desarrollo de medicamentos. También se relaciona con la identificación de nuevas dianas terapéuticas mediante herramientas genómicas.

La Farmacogenómica y la Farmacogenética están estrechamente ligadas y el desarrollo de estas dos disciplinas ha permitido impulsar la llamada medicina individualizada, cuya meta principal es que cada paciente reciba un tratamiento farmacológico más seguro y eficaz de acuerdo con su perfil genético.

En la actualidad se han identificado más de 12 millones de polimorfismos de nucleótido único (Brockmüller *et al.*, 2008) (polimorfismo en la secuencia de ADN que consiste en la variación de una sola base) en el secuenciamiento inicial del genoma humano, y cerca de 60.000 (Evans *et al.*, 2003) de ellos en la región de codificación de los genes.

Durante la última década del siglo XX y los inicios del siglo XXI, comenzó un esfuerzo internacional para determinar el genoma humano completo, denominado **Proyecto genoma humano** tratando de resumir toda la información genética de nuestra especie contenida en cada célula nucleada del cuerpo (Nussbaum *et al.*, 2008).

Este proyecto ha permitido poner a disposición de todos los investigadores la secuencia completa de todo el ADN humano. Uno de sus objetivos más relevantes es conseguir que este conocimiento de la secuencia completa permita identificar todos los genes humanos y se traduzca en conocer y determinar como la variación de esos genes contribuye a la salud y a la enfermedad.

En forma más específica podemos destacar que este conocimiento permite evaluar genes en las diferentes poblaciones para (Khoury, 2006):

- Determinar la relación entre la variación genética y los riesgos para varias enfermedades.
- Identificar los factores de riesgo que pueden ser modificados, tales como el comportamiento y el medio ambiente, y que pueden tener interacción con los genes.

- Evaluar la utilidad y exactitud de las pruebas genéticas y los beneficios de la intervención en la prevención de enfermedades y la mejora de la salud.
- Determinar el impacto de las pruebas genéticas y los servicios en la persona y la sociedad.
- Atender los aspectos sociales, legales y éticos.

Con este proyecto en desarrollo, en los últimos años se ha producido un avance muy importante en el conocimiento de algunos factores de tipo genético que influyen en el efecto que tienen los medicamentos. Existe mucha documentación e información de que diferentes pacientes responden de distinta manera a la misma medicación (Evans *et al.*, 2003; Ruiz-Canela, 2005).

La Farmacogenética (Nuffield Council, 2003) representa algunos beneficios potenciales de gran importancia, los que se pueden englobar en tres aspectos principales:

a.- Mejorar la seguridad:

Algunos fármacos tienen efectos adversos que pueden llegar incluso a la muerte. Si se encuentra que una variante alélica que esté asociada con un efecto adverso para un cierto fármaco, los médicos deberían evitar prescribirlas a aquellos pacientes con esa variante. También existen otras razones por las cuales los fármacos pueden ser peligrosos, por ejemplo: errores en la prescripción o administración, pacientes que no siguen las instrucciones en forma cuidadosa, o interacciones entre fármacos u otras sustancias. Hay una estadística que ilustra esta situación sobre las reacciones adversas en USA (Shastry, 2006), que causan más de dos millones de hospitalizaciones, que incluyen 100.000 muertes al año en USA. Estas reacciones adversas pueden deberse a múltiples factores tales como los factores de la enfermedad, factores ambientales y genéticos.

b.- Ajustar la dosis:

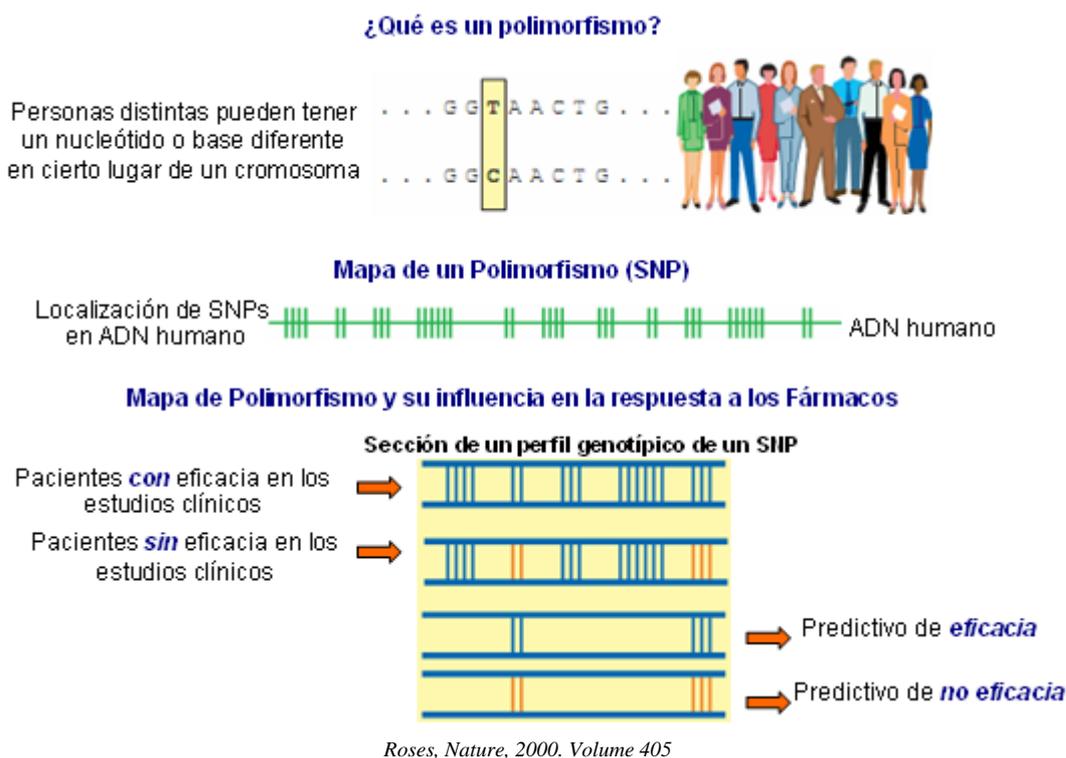
La información genética se puede utilizar para ajustar la dosis de un fármaco, reduciendo la fase de ensayo/error que en algunos casos se usa para determinar la mejor dosis. Una de las aplicaciones de la Farmacogenética apunta hacia la llamada medicina individualizada que toma en cuenta las características genéticas del paciente para ajustar la dosis del medicamento.

c.- Aumentar la eficacia:

Muchos de los fármacos no son efectivos para todos los pacientes que están siendo tratados para una misma enfermedad. Algunos tratamientos comunes para la diabetes, depresión y asma son efectivos en sólo un 60% de los pacientes.

Algunos de esos polimorfismos de nucleótido único se han asociado a cambios sustanciales tanto en el metabolismo como en el efecto de los fármacos (ver Figura 11). En este sentido, hoy en día están siendo utilizados para predecir la respuesta clínica.

Figura 11: Polimorfismos de nucleótido único y Farmacogenética



En todas estas relaciones entre polimorfismos y fármacos destacan dos tipos de situación:

- las diferencias heredadas en el blanco del fármaco (drug target), como los receptores y,
- la disponibilidad del fármaco, cuyos ejemplos mas importantes son las enzimas metabolizadoras y transportadoras de fármacos, que son determinantes poligenéticos de los efectos de los fármacos (ver Figura 12).

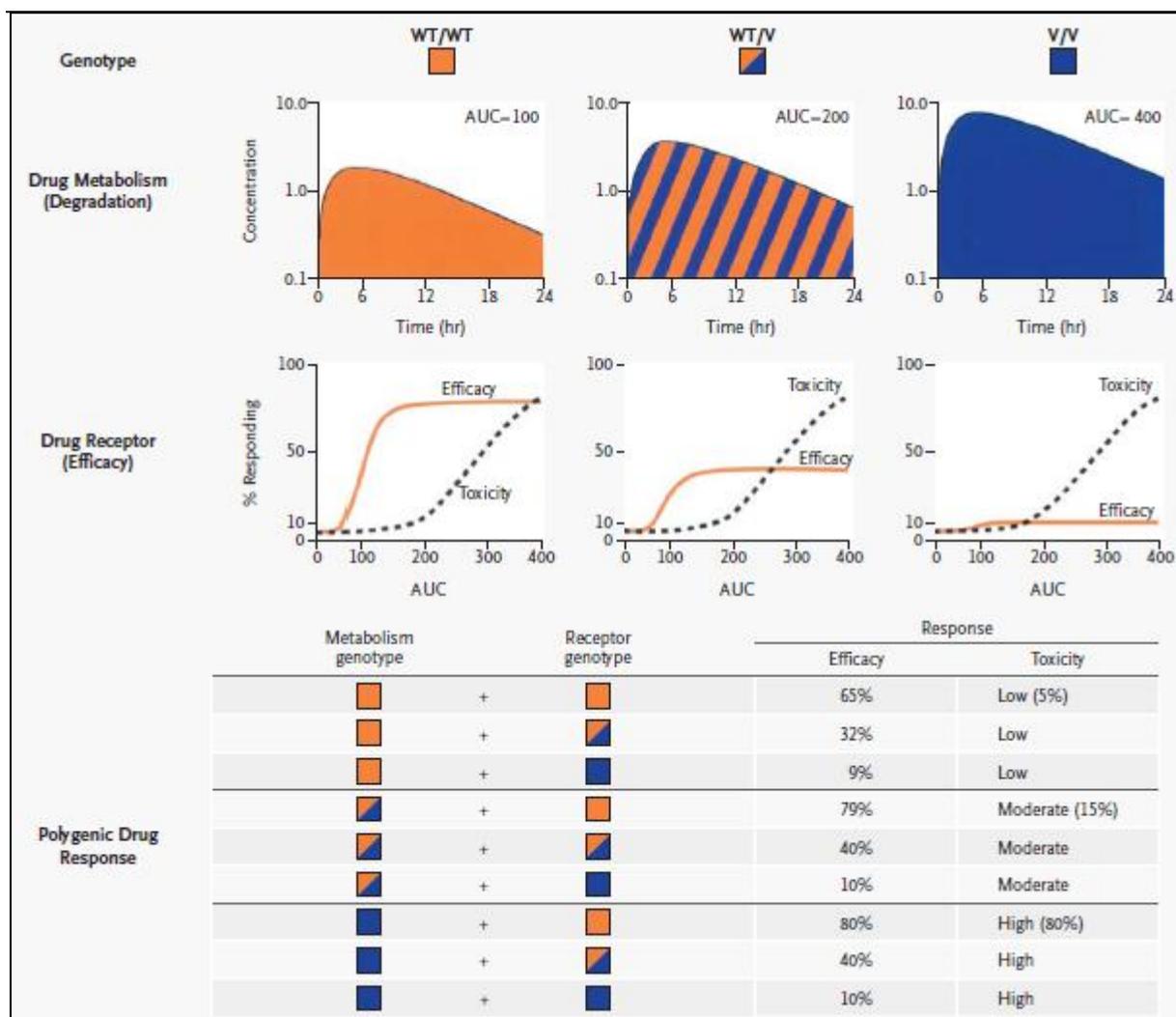
En esta Figura 12, se representan los efectos potenciales de dos polimorfismos genéticos (uno relacionado con el metabolismo de la droga (degradación) y el otro con el receptor de la droga (eficacia).

Hay pacientes que son:

- homocigotos para los alelos salvajes (Wild Type) *WT/WT*,
- pacientes heterocigotos para la variante tipo salvaje *W* y una variante *V*, o
- pacientes con las variantes alélicas *V/V* para los dos polimorfismos.

El metabolismo de las drogas, que se puede medir por la degradación a través del clearance, manifiesta diferencias en estos tres tipos de pacientes, aquellos con la variante *V/V* presentan una concentración bajo la curva bastante mayor en comparación con los de la variante *WT/WT*.

Figura 12: Determinantes poligénicos de la respuestas a fármacos



Evans, WE. *The New England Journal of Medicine*, 2003.

Si examinamos la eficacia, ésta es mucho mayor en pacientes que tienen la variante *WT/WT*, (Wild type, salvaje) que aquellos con la variante *V/V*. En la parte de abajo se aprecian nueve posibles combinaciones entre el genotipo del metabolismo de la droga y el genotipo del receptor de la droga en las cuales se midió la respuesta en términos de la eficacia y toxicidad. Se destacan valores que van desde un 65% de eficacia con una toxicidad muy baja del 5%, hasta valores de eficacia de apenas el 10% con una toxicidad muy alta (80%).

La Farmacogenética (Evans *et al.*, 2003), comenzó centrándose en el metabolismo de los fármacos y se ha ampliado a todo el espectro de la disposición de los fármacos, incluyendo a los transportadores que influyen su absorción, distribución y excreción, sus enzimas metabolizadoras, enzimas relacionadas con la síntesis y reparación de ADN (que pueden determinar la eficacia o toxicidad del fármaco).

A continuación se revisarán algunos polimorfismos genéticos que influyen la disponibilidad de las drogas.

1.2.1.- Metabolismo de las drogas

Hay más de 30 familias de enzimas metabolizadoras en humanos, esencialmente todas ellas con variantes genéticas. Dentro de ellas, uno de los grupos más importantes están representadas por la familia del citocromo P 450 (CYP). Algunos medicamentos interactúan sólo con una de las enzimas del Citocromo P 450, mientras que otras lo hacen con dos o más isoenzimas. Entre otras enzimas, las hay que activan o inactivan medicamentos, como la Tio Purina Metil Transferasa (TpMT).

1.2.1.1 - Enzimas metabolizadoras de drogas

Una de las enzimas más importantes para el metabolismo de los fármacos (Shastry, 2006), es el citocromo P 450. Las enzimas del CYP, se agrupan (Nussbaum *et al.*, 2008) en 20 familias, de acuerdo a la secuencia de los aminoácidos. Tres de estas familias: CYP1, CYP2 y CYP3, son las más “promiscuas” respecto de los sustratos donde actúan y porque participan en una amplia gama de sustancias que no pertenecen al organismo (los llamados xenobióticos), incluyendo los medicamentos. Hay seis genes concretos especialmente importantes porque son responsables del más del 90% de los fármacos utilizados con mayor frecuencia, ver Tabla 3.

Tabla 3: Polimorfismos del CYP implicados en el metabolismo de fármacos

Familia	Gen	Alelos significativos	Fármaco o sustancia metabolizada
CYP1	CYP1A2	↑ y ↓ actividad alélica	Caféina, Propanolol
CYP2	CYP2C9	↑, ↓ y 0 actividad alélica	AINES, Hipoglucemiantes orales, Warfarina
	CYP2C19	↓ y 0 actividad alélica	Antiepilépticos, Antidepresivos, Ansiolíticos
	CYP2D6	↑, ↓ y 0 actividad alélica	Antiarrítmicos, Antidepresivos, Antisicóticos, β-Bloqueadores Adrenérgicos, Analgésicos opiáceos.
CYP3	CYP3A4	↑, ↓ y 0 actividad alélica	Paracetamol, Antifúngicos, Cocaína, Codeína, Diazepam, Eritromicina, Warfarina

Nussbaum, *Genética en Medicina*. 2008

Las frecuencias de las variantes alélicas de las familias de los citocromos es variable entre poblaciones de acuerdo a la raza y características étnicas. Por ejemplo, las familias de citocromo CYP2D6, y CYP2C19 se han asociado a diferencias étnicas y raciales, ver Tabla 4.

Tabla 4: Frecuencia de los metabolizadores lentos CYP2D6 y CYP2C19 en diversas poblaciones

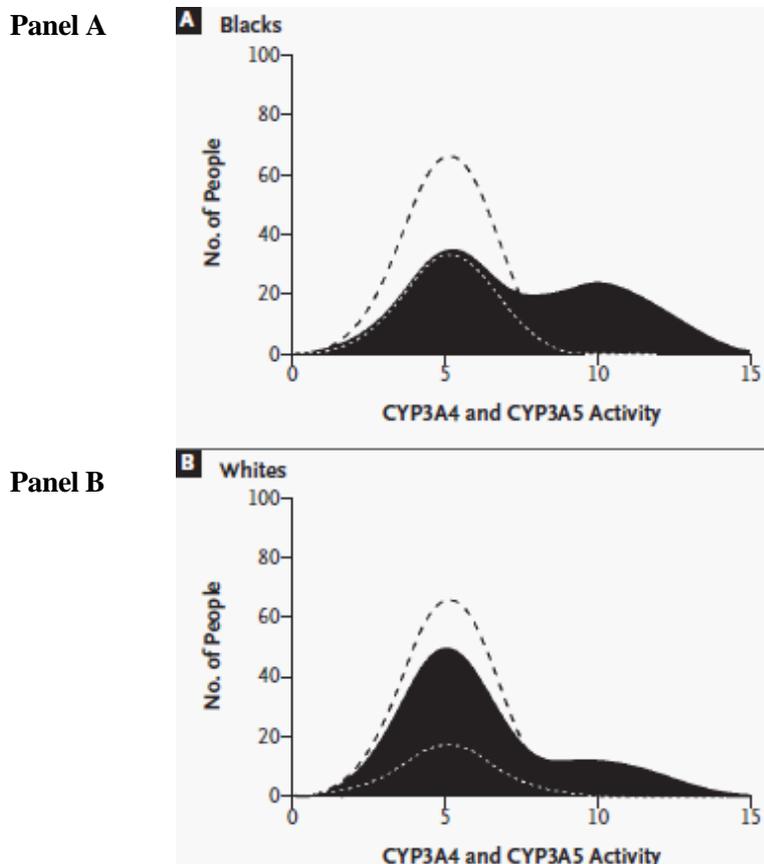
Origen étnico de la población	Frecuencia de metabolizadores lentos en la población %	
	CYP2D6	CYP2C19
<i>África subsahariana</i>	3.4	4.0
<i>Indios Americanos</i>	0	2.0
<i>Asiáticos</i>	0.5	15.7
<i>Raza Blanca</i>	7.2	2.9
<i>Oriente Medio/África del Norte</i>	1.5	2.0
<i>Islas del Pacífico</i>	0	13.6

Burroughs VJ, *J. Natl. Med. Assoc.* 94:(Suppl):1-26, 2002

Un ejemplo asociado a reacciones adversas en combinación con dos enzimas de la familia CYP, lo podemos visualizar en la Figura 13. En particular estas enzimas son responsables de la inhibición de la bomba de protones (por ejemplo, Omeprazol, Lansoprazol). Aproximadamente el 75% de la población blanca y el 50% de los afroamericanos es incapaz de expresar el citocromo CYP3A5. La falta de funcionalidad de este citocromo podría no ser tan evidente, porque muchos medicamentos son

metabolizados también por el citocromo CYP3A4, lo que da cuenta de la importancia de conocer su funcionalidad.

Figura 13: Actividad simulada del citocromo P 450 CYP3A4 y CYP3A5 en población de Negros y Blancos



La actividad simulada de CYP3A4 (línea discontinua negra) y de CYP3A5 (línea discontinua blanca) se muestra para negros en el Panel A y en blancos en el Panel B

Todos los pacientes, blancos y negros expresan a CYP3A4, pero sólo el 25% de los blancos y el 50% de los negros expresa a CYP3A5 debido al polimorfismo genético.

Las áreas en negro reflejan la actividad combinada de CYP3A4 y CYP3A5 en las dos poblaciones, para fármacos que son metabolizadas igualmente por las dos enzimas.

Evans, WE. *The New England Journal of Medicine*, 2003.

El epitelio intestinal y el hígado contienen la mayoría de las familias del CYP, CYP3A, y estas enzimas son las responsables del metabolismo de más de la mitad de los fármacos. Su actividad varía entre los miembros de una misma población.

1.2.1.2.- Transportadores de drogas

Los transportadores de drogas tienen un papel muy importante en la regulación de la absorción, distribución y excreción de muchos fármacos (Evans *et al.*, 2003; Marzolini *et al.*, 2004; Fromm, 2002).

Entre los transportadores de drogas mas extensamente estudiados están los miembros de la familia de Transportadores ABC (de *Adenosin trifosfato ATP binding cassette*), la glicoproteína P, que está codificada por el gen humano ABCB1 también llamado MDR1 (multi -resistencia a drogas). En humanos existen dos 2 miembros de la familia MDR, denominados MDR1 y MDR2.

La proteína de resistencia múltiple a droga MDR-1 sirve como transportador para extraer numerosos medicamentos de la célula. Una sobreexpresión del MDR-1 se puede asociar con una mayor resistencia a algún fármaco, o niveles bajos de MDR-1 pueden alterar la distribución de los medicamentos con resultado de mayor incidencia de toxicidad. Una variante genética del transportador

Na-H (NHE1), que sirve de lugar de acción para el diurético Amilorida, llevaría consigo a una resistencia al medicamento, mayores efectos tóxicos y acidosis crónica.

La principal función de la glicoproteína P, es el eflujo celular (dependiente de la energía) de sustratos como la bilirrubina, algunas drogas anti-cancerígenas, glucósidos cardíacos, inmunosupresores, glucocorticoides, inhibidores de la proteasa tipo1 del virus de la inmunodeficiencia adquirida, ver Tabla 5.

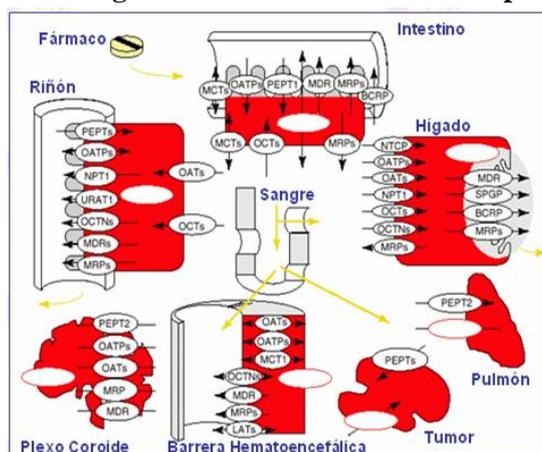
La expresión de la glicoproteína P (Evans *et al.*, 2003) en muchos tejidos sugiere que tiene un rol en la excreción de xenobióticos y metabolitos en la orina, bilis y lumen intestinal (ver Figura 14). La localización (Marzolini *et al.*, 2004; Fromm, 2002) de esta glicoproteína en conjunto con la enzima CYP 3A4, en el intestino delgado e hígado, también apunta a que este transportador juega un rol significativo en la disponibilidad oral, distribución y excreción de fármacos. Por ejemplo, la coadministración de Paclitaxel con Ciclosporina, aumenta la disponibilidad oral de Paclitaxel.

Tabla 5: Localización celular de la Glicoproteína P para el efecto y disponibilidad de fármacos

Tejido	Localización	Función
Intestino Delgado y Colon	Membrana apical de células epiteliales.	Secreción de fármacos al lumen.
Hígado	Membrana canalicular de los hepatocitos.	Secreción de Fármacos en la bilis.
Riñón	Membrana apical de células epiteliales de los túbulos proximales.	Secreción de Fármacos en el lumen tubular.
Sistema Nervioso Central	Membrana luminal de células endoteliales que forman la barrera hemato-encefálica.	Protección del Sistema nerviosos central de xenobióticos.
Testículos	Células endoteliales de los vasos capilares.	Barrera hemato-testicular.
Placenta	Trofoblastos.	Protección del feto de xenobióticos.

Fromm, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002

Figura 14: Diagrama de algunas localizaciones de los transportadores de drogas



Adaptado de: Prof. A. Domínguez-Gil Hurlé Servicio de Farmacia, Hospital Universitario de Salamanca.2005

La inhibición e inducción de la glicoproteína P, aunque menos estudiada que las enzimas del citocromo P 450 tiene implicaciones clínicas muy importantes en términos de la eficacia del tratamiento y toxicidad para un fármaco.

También es importante tener en cuenta que en la respuesta a los medicamentos intervienen gran variedad de factores externos (otros medicamentos, consumo de alcohol, estilo de vida, etc.) y factores

internos como edad, sexo, presencia de otras enfermedades, factores genéticos, etc. Por lo tanto también es posible en estos estudios poder caracterizar a un paciente según su grado de respuesta a un tratamiento en: bajo, medio o alto, importante a la hora de decidirse por un cierto fármaco.

1.2.2.- Polimorfismos Genéticos de los blancos de los fármacos (drug target)

Las variaciones genéticas en los blancos de los fármacos (Evans *et al.*, 2003), como por ejemplo receptores, tienen un efecto profundo en la eficacia de los fármacos. Se han identificado más de 25 ejemplos, ver Tabla 6.

Tabla 6: Polimorfismos genéticos en genes de blancos de fármacos que influyen en su respuesta

Gen o producto genético	Fármaco/Medicación	Efecto de la droga asociado al polimorfismo
ACE (enzima convertidora de la angiotensina)	Inhibidores de la enzima convertasa.	Efecto reno-protector, reducción de la presión sanguínea, reducción en la masa ventricular izquierda, función endotelial
	Fluvastatina	Cambios en los lípidos (por ejemplo, reducciones en la lipoproteína de baja densidad colesterol y Apolipoproteína B); progresión o regresión de la arterioesclerosis
Araquidonato 5 lipo-oxigenasa	Inhibidores Leucotrieno	Mejora en FEV ₁ (Volumen espiratorio forzado en 1 segundo)
Receptor β_2 adrenérgico	Agonistas β_2 (por ejemplo, Albuterol)	Bronco-dilatación, susceptibilidad a la desensibilización agonista-inducida
Receptor de Bradiquinina	Inhibidores de la ACE	Tos inducida por los inhibidores de la ACE
Receptores de la Dopamina (D2, D3 y D4)	Anti-sicóticos (por ejemplo, Haloperidol, Clozapina)	Respuesta anti-sicótica (D2,D3,D4), Disquinesia tardía inducida (D3), Akatisia aguda inducida por anti-sicóticos (D3)
Receptor α de Estrógenos	Estrógenos conjugados	Aumento de la densidad mineral en la médula
	Terapia hormonal de reemplazo	Aumento en la lipoproteína del colesterol de baja densidad
Glicoproteína IIIa subunidad de la glicoproteína Iib/IIIa	Aspirina o inhibidores de la glicoproteína Iib/IIIa	Efecto antiplaquetario
Transportador de la Serotonina (5-hidroxitriptamina)	Antidepresivos (por ejemplo, Clomipramina, Fluoxetina, Paroxetina)	Neurotransmisión de la 5-hidroxitriptamina, respuesta antidepresiva

Evans, WE. *The New England Journal of Medicine*, 2003.

Hay algunas diferencias genéticas (Evans *et al.*, 2003) que tienen efectos indirectos sobre la respuesta a drogas y que no están relacionadas ni con el metabolismo de las drogas o el transporte. Se puede ver el caso de la mutación del gen promotor de la metil-guanidina metil-transferasa (MGMT), que altera la respuesta de los gliomas al tratamiento con Carmustina. El mecanismo de este efecto se relaciona con la disminución en la eficiencia de reparar el ADN alquilado en pacientes con la MGMT metilada.

Es crítico distinguir este mecanismo blanco, de los polimorfismos genéticos, en enzimas metabolizadoras de fármacos que afectan la respuesta por la alteración de las concentraciones de drogas,

tal como el polimorfismo de la TpMT asociada a la toxicidad hematopoyética de la mercaptopurina y susceptibilidad a tumores inducidos por radiación.

El receptor adrenérgico β_2 (codificado por el gen ADRB2), también puede mostrar la relación existente entre el polimorfismo genético en blancos de fármacos y sus respuestas clínicas. El polimorfismo genético del receptor β_2 adrenérgico puede alterar el proceso de transducción de señales de ese receptor. Se han asociado tres polimorfismos de nucleótido único de ADRB2 con la alteración de la expresión, baja regulación, o el acoplamiento del receptor en la respuesta a agonistas β_2 adrenérgicos.

También se han identificado 13 polimorfismos de nucleótido único en ADRB2. Este hallazgo (Evans *et al.*, 2003) ha llevado a la evaluación de la importancia de estructuras de haplotipos comparados con polimorfismos de nucleótido único en la determinación de la función del receptor y de la respuesta farmacológica. En este sentido, un ejemplo muy importante se da en la respuesta bronco-dilatadora a la terapia de inhalación de agonistas β en pacientes con asma, revela una fuerte asociación entre la respuesta bronco-dilatadora y haplotipos que entre cualquier polimorfismo de nucleótido único solo. Esto no es una sorpresa porque las estructuras de haplotipos frecuentemente son los mejores predictores de consecuencias fenotípicas que un polimorfismo individual. Este resultado sugiere que sería deseable desarrollar métodos robustos y simples para determinar la estructura haplotípica de los pacientes.

1.2.3.- Polimorfismos genéticos con efectos indirectos en la respuesta de fármacos

Ciertos polimorfismos en genes (Evans *et al.*, 2003) que no están directamente relacionados con el blanco de los fármacos ni con su disponibilidad, se ha visto que alteran la respuesta al tratamiento en determinadas situaciones. Un ejemplo clásico se puede ver en las diferencias de herencia de los factores de coagulación que pueden predisponer a las mujeres que toman anticonceptivos orales a una trombosis de vena profunda o cerebral. Existen otros ejemplos, los que se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: Algunos polimorfismos en genes modificadores de tratamiento o enfermedad que pueden afectar la respuesta de fármacos

Gen o producto genético	Enfermedad o Respuesta de la asociación	Fármaco/ Medicación	Influencia del polimorfismo sobre el efectos de la droga o toxicidad
Adducin	Hipertensión	Diuréticos	Infarto miocardio o apoplejía.
Apolipoproteína E (APOE)	Progresión de artero-esclerosis, eventos cardiovasculares isquémicos	Estatinas (Simvastatina)	Sobrevida aumentada
Apolipoproteína E (APOE)	Enfermedad de Alzheimer	Tacrinás	Mejora clínica
Metil-guanidina metil transferasa (MGMT)	Glimas	Carmustina	Respuesta del glioma a la Carmustina
Parkin	Enfermedad de Parkinson	Levodopa	Mejora clínica y disquinesia inducida por Levodopa.
Protrombina y factor 5	Trombosis vena-profunda y trombosis veno-cerebral	Anticonceptivos orales	Riesgo aumentado de trombosis veno-profundas y veno-cerebrales con anticonceptivos orales.

Evans, WE. The New England Journal of Medicine, 2003.

Otro elemento a considerar en este tipo de polimorfismos con efectos indirectos sobre las drogas son las variaciones genéticas en los transportadores celulares iónicos que pueden tener un rol indirecto en la predisposición a pacientes a los efectos tóxicos de fármacos. Un ejemplo en este sentido son los pacientes con variantes alélicas para los transportadores de sodio o potasio, que producen morbilidad o mortalidad a partir del síndrome del QT prolongado. Es el caso de una mutación en el gen KCNE2, el gen de una sub-unidad integrante de la membrana que se une a HERG para formar los canales de potasio I_{Kr} . Estos se identificaron en pacientes que habían fallecido después de tener una arritmia cardíaca después de

recibir Claritromicina. Hay otras variantes adicionales de KCNE2, que se han asociado con el desarrollo de un intervalo prolongado de QT después de terapias con Trimetoprima-sulfametoxazol, con el sulfametoxazol inhibiendo los canales codificados por la variante KCNE2 (8T→A).

A causa de que estas variantes están en el 1.6% de la población y su efecto sobre las acciones de la droga puede causar la muerte, son excelentes candidatos para estrategias poligenéticas para prevenir los serios efectos tóxicos fármaco-inducidos.

Hay varios ejemplos que se pueden revisar con mayor profundidad en el artículo de Evans *et al.*, 2003.

1.2.4.- Algunas consideraciones estadísticas

Los estudios farmacogenéticos tienen de base inicial los diseños epidemiológicos clásicos. Sin embargo, hay algunas particularidades que hacen que no todos los diseños sean adecuados. Un punto de partida es conocer las metodologías clásicas de los estudios de asociación genéticos que se pueden examinar en profundidad en Cordell *et al.*, 2005. No obstante, por la propia definición de la Farmacogenética, hay algunas peculiaridades que hacen que estos estudios tengan que ser algo diferentes.

Algunas de estas particularidades están relacionadas con los siguientes elementos claves:

- La reacción individual a una droga puede estar influenciada por rasgos genéticos que afectan la absorción, biodistribución, excreción y efectos fisiológicos.
- La prueba genética para polimorfismos específicos involucrados en el metabolismo de la droga ofrece grandes posibilidades de evitar efectos adversos y la personalizar los tratamientos a las necesidades individuales.
- Se espera que las pruebas farmacogenéticas se utilicen cada vez más como un componente habitual en la toma de decisiones médicas.

Hay varios temas que hemos examinado en la revisión de artículos juntamente con la creación de la base de datos. Estos puntos comprenden tres aspectos fundamentales en el desarrollo de cualquier estudio clínico relacionados con la calidad:

- El diseño,
- Los métodos estadísticos aplicados y
- El reporte de los resultados.

La calidad de la investigación en el área de los estudios clínicos ha generado muchas revisiones, de donde se concluye que la información que se proporciona es insuficiente, o inadecuada y en forma recurrente se aprecian errores metodológicos. Como consecuencia a esta situación, se han publicado algunos referentes para mejorar la calidad del diseño, análisis y reporte de los estudios clínicos, en especial existe una extensión de la declaración STROBE recientemente publicada, llamada STREGA (Little *et al.*, 2009).

Dentro del ámbito específico de la Farmacogenética, hay una serie de consideraciones (Schork *et al.*, 2001) que es necesario tener en cuenta para el manejo eficiente de los estudios de esta área. Entre las principales podemos mencionar:

a.- **Eficacia y respuesta aumentada versus efectos adversos:** Es necesario hacer una distinción entre eficacia y respuesta aumentada con respecto a las reacciones adversas. La eficacia y la respuesta aumentada es mucho más probable que se evalúe sobre escalas o métricas cuantitativas mientras que las reacciones adversas frecuentemente se evalúan cualitativamente. Hay algunas reacciones adversas que son muy raras y pueden reflejar etiologías idiopáticas o heterogéneas difíciles de dilucidar. El análisis genético de reacciones adversas debe ir acompañado de otras covariantes medidas para realizar la mejor interpretación de los resultados obtenidos.

b.- **Respuestas cuantitativas versus respuestas cualitativas:** Dentro de los estudios clínicos, hay respuestas a medicamentos evaluadas en forma cuantitativa (por ejemplo, la reducción de tensión o colesterol) o a veces en forma cualitativa (morbilidad o muerte), que corresponden al punto final evaluado de interés. Aquí la elección del fenotipo será crucial para planificar los análisis más adecuados.

c.- **Evaluación fenotípica y definición:** Antes de iniciar un estudio de los factores genéticos (por ejemplo, mutaciones, polimorfismos) en lo que se refiere a un determinado fenotipo, los investigadores deberían considerar en forma previa la evaluación de la evidencia del factor genético que influye en el fenotipo en cuestión. Esto se logra frecuentemente por la vía del análisis de segregación y herencia en la que participan individuos relacionados. La mayoría de los ensayos clínicos no consideran dentro de la muestra a individuos relacionados, para poder generalizar los resultados a la población en general. Con el fin de obtener conclusiones acerca de la probabilidad con que los factores genéticos influyen en los resultados de un ensayo clínico, se podría considerar las propiedades de la distribución de los resultados. Este resultado podría informar de la potencia y del requerimiento de los tamaños de muestra.

d.- **Submuestreo óptimo para estudios farmacogenéticos:** Genotipar individuos en cualquier locus con el fin de determinar las asociaciones entre variantes de ese locus con la respuesta clínica investigada puede ser muy costoso además de ineficiente. Por tanto, lo deseable, sería aplicar estrategias óptimas para determinar el genotipo de los individuos en grandes ensayos clínicos para el análisis farmacogenético. Estas estrategias probablemente se aplicarán después de que los ensayos se hagan, de forma que los resultados pueden ser recopilados y proporcionar más información acerca de los efectos genéticos.

Una forma tradicional de maximizar la eficiencia estadística del estudio es identificar individuos que puedan contribuir con información relevante a la hipótesis del estudio. La identificación de individuos con un fenotipo “extremo” ha sido una aproximación de elección durante algún tiempo para estadísticos genéticos y epidemiólogos genéticos. Utilizando esta estrategia en el análisis de un locus individual es sencillo si se conoce el efecto genético del locus estudiado.

e.- **Equilibrio de Hardy Weinberg:** Esta relación matemática, que permite el cálculo de las frecuencias genotípicas a partir de datos de frecuencia alélica, se basa en dos principios: la relación simple entre frecuencias genotípicas y fenotípicas en una población y en que la frecuencia alélica no cambia de generación en generación. Es muy importante considerar su demostración previa a la aplicación de los métodos estadísticos propios del estudio como también hacer un reporte adecuado del resultado dentro del estudio (informar poblaciones a las que se aplicó, resultado y valor de probabilidad asociado).

1.2.5.- Algunas consideraciones éticas

El aspecto ético de la Farmacogenética (Khoury, 2006; Comisión Europea. EUR 21120: 25; 11; Nuffield Council, 2003), es otro tema de gran importancia, considerando que aún no hay una normativa específica que regule a los estudios farmacogenéticos. Lo que se ha hecho es tener de base la normativa sobre investigación biomédica en seres humanos (la declaración de Helsinki y el convenio de Oviedo, el real decreto 223/2004 y las normas de la buena práctica clínica) en las que se pueden resumir los cuatro principios éticos más ampliamente aceptados:

- Respeto a las personas (autonomía y protección del que no la posee, para lo que es fundamental la obtención del consentimiento informado).
- Beneficiar, es decir, aumentar al máximo los beneficios y disminuir al mínimo los riesgos.
- No “maleficencia” a las personas, es decir, no hacer daño.
- Justicia, es decir, distribuir con equidad los beneficios y riesgos de la investigación, para lo que se definen cuidadosamente tanto los criterios de inclusión como los de exclusión.

Otra situación que se debe tener en cuenta es que la muestra biológica humana que contiene material genético presenta una característica que la hace muy diferente de otros tipos de muestra (Nuffield Council, 2003) por diferentes razones de las cuales las más relevantes son:

- El material genético es único para cada individuo y no cambia con el tiempo, por lo que a partir de la muestra se puede conocer el paciente de la que procede, aunque en la mayoría de los casos no sea fácil y se requiera investigación policial. Esto se traduce en que el paciente puede ser potencialmente identificable.
- Como el ADN es estable, puede ser susceptible de múltiples investigaciones futuras, algunas de las cuales no necesariamente relacionadas con el objetivo para los que se obtuvo.
- En estas muestras para estudios farmacogenéticos se pueden obtener datos, buscados o no buscados, que sirvan para predecir enfermedades que el paciente no quiera conocer.
- Como parte del material genético es común para padres y hermanos, los hallazgos pueden tener implicaciones para los familiares del sujeto o paciente, con los que se podrían sobrepasar los problemas éticos individuales.

Para los estudios farmacogenéticos (al igual que para otros estudios) es fundamental la obtención de muestras biológicas. Esta gran variedad de muestras se pueden clasificar en dos grupos:

- Las muestras obtenidas en la práctica médica habitual o en procesos diagnósticos (biopsias, sangre), terapéuticos (órganos y tejidos extirpados), los que frecuentemente se conservan en bancos de muestras en los servicios de Anatomía Patológica o Análisis Clínicos.
- Las muestras obtenidas específicamente para proyectos de investigación, tanto de ensayos clínicos como de estudios epidemiológicos observacionales, los que habitualmente se mantienen almacenados después de terminar el proyecto para el cual se obtuvieron.

Es conveniente plantear si es adecuado utilizar muestras biológicas almacenadas para un fin y objetivo diferente para los que se tomaron inicialmente y si esta utilización puede perjudicar los intereses de los pacientes y sus familiares. Por otro lado tendremos que tener en cuenta si el paciente podrá ser identificado a partir de esa muestra.

En base a lo anterior, se percibe que los problemas éticos de las muestras que contienen ADN son mayores que la de una muestra biológica y por ello hay dos tipos de procedimientos que pueden ser importantes para solucionar en gran parte estos problemas:

- El proyecto de investigación farmacogenético debería (debe) siempre ser evaluado por un Comité Ético de Investigación Clínica antes de llevarlo a cabo.
- Siempre se deberá pedir el consentimiento informado para la obtención de las muestras biológicas humanas y/o para la investigación de las mismas.

La respuesta no es fácil para todas estas situaciones, siempre deberemos tener en cuenta que los intereses científicos no debieran comprometer ni los derechos ni el bienestar del paciente, aunque sea difícil en algunos casos prever los riesgos potenciales.

1.2.6.- Los desafíos para el futuro

Dentro de los desafíos futuros (Nuffield Council, 2003) es posible delinear algunos campos en los cuales aún queda bastante por hacer:

En el **conocimiento científico**:

- Aprovechar efectivamente el conocimiento científico, para saber como los genes afectan la respuesta a los fármacos,
- Desarrollar los beneficios potenciales de la Farmacogenética destacando los de mejorar la seguridad, ajustar la mejor dosis y aumentar la eficacia de los fármacos.

En la **investigación y desarrollo de nuevos fármacos**:

- Potenciación del desarrollo de nuevos fármacos y también el mejoramiento de algunos ya existentes, lo que trae consigo un nuevo concepto en los estudios clínicos, los estudios llamados farmacogenéticos y como ese conocimiento pueda mejorar efectivamente los fármacos ya existentes.
- Un uso adecuado y ético de la información farmacogenética en los estudios clínicos, bajo los criterios ya mencionados anteriormente en el punto 2.3

En **temas de regulación y de políticas de salud pública**: FDA. (2001):

- Que las pruebas farmacogenéticas estén siempre reguladas por la entidad que corresponda a cada región o país.
- Hacer esfuerzos para que la información farmacogenética se use en forma apropiada y en especial que no altere la provisión de salud por parte de los organismos privados destinados a ello como por ejemplo las aseguradoras privadas de salud.
- Incluir dentro de los estudios, categorizaciones de pacientes de acuerdo a sus características genéticas (enfermedad, ADN heredado, etc.) de tal forma que todos estén representados sin exclusión, incluyendo los grupos raciales.

En el **tratamiento y práctica clínica**:

- Que la información sea segura y de fácil obtención de fuentes independientes para los médicos y pacientes.
- Que los profesionales de la salud sean entrenados a comunicar la información acerca de la Farmacogenética.

- Se requieren de mayores recursos para implementar las pruebas farmacogenéticas, los médicos necesitan más tiempo para sus pacientes.
- Se requieren de nuevas instalaciones para permitir que los resultados se obtengan en forma rápida y eficiente.

Finalmente es importante estudiar y analizar como la Farmacogenética se puede aplicar al desarrollo y análisis de medicamentos para proporcionar la mejor terapia, en términos de la eficacia y seguridad y relacionarla con otra gran área dentro de la evaluación de medicamentos como lo es la bioequivalencia.

2.- Objetivos

Los objetivos planteados en esta tesis doctoral son los siguientes:

- a.- Conocer, describir y analizar algunos factores que afectan la evaluación de la bioequivalencia promedio en drogas de alta variabilidad.
- b.- Describir y aplicar las metodologías clásicas y las más actuales utilizadas en la determinación de la bioequivalencia promedio relacionadas con las drogas de alta variabilidad.
- c.- Conocer, describir y analizar como el carryover asociado a diseños crossover 2×2 , impacta el análisis de la bioequivalencia promedio.
- d.- Conocer y analizar como el tamaño de muestra de un crossover de 2×2 y la variabilidad de la droga evaluada afectan la evaluación de la bioequivalencia promedio, tanto en ausencia y presencia de carryover.
- e.- Describir la problemática asociada al cálculo del factor de similitud en la comparación de dos perfiles de disolución en su aplicación práctica a la bioequivalencia in vitro.
- f.- Describir los conceptos principales asociados a la Farmacogenética para comprender mejor la complejidad de este tipo de estudios.
- g.- Crear una base de datos con información de estudios farmacogenéticos efectuados con polimorfismos de nucleótido único (SNP) y variables dicotómicas.
- h.- Revisar y analizar la base de datos en términos del diseño, aspectos metodológicos y resultados, que pueden influir en el resultado final de un estudio de Farmacogenética.

En relación a los objetivos anteriores se han desarrollado una serie de investigaciones, que están plasmadas en los artículos numerados a continuación:

[1] Jordi Ocaña, Ma. Pilar Sánchez O, Alex Sánchez, Josep L. Carrasco J. "On Equivalence and Bioequivalence Testing". 2008. *SORT*. **32**(2):151-176. Con este artículo se han cumplido los objetivos *a* y *b*.

[2] Ma. Pilar Sánchez O, Carolina Gómez G, Josep L. Carrasco J, Jordi Ocaña, Carlos Von Plessing R, C. Gloria Godoy M, Rolando Reinbach H, Ricardo Godoy R. "Evaluating Average Bioequivalence using methods for high variability drugs: A case study". *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2008, **46**(10):527-537, cumpliendo así con los objetivos propuestos *a* y *b*.

[3] Ma. Pilar Sánchez O, Jordi Ocaña, Josep Lluís Carrasco. "The Effect of Variability and Carryover on Average Bioequivalence Assessment: A Simulation Study". Enviada "minor revision" a *Pharmaceutical Statistics*, Octubre 2009. Con este artículo se han cumplido los objetivos definidos en *c* y *d*.

[4] Albert Cobos, Ma. Pilar Sánchez, Jaume Aguado, Josep L Carrasco. "A systematic review on the methods used in pharmacogenetic studies with binary assessment of treatment response." Enviado a *Pharmacogenetics and Genomics*, Noviembre de 2009, para verificar los objetivos *f*, *g* y *h*.

[5] Jordi Ocaña, Gloria Frutos, Ma. Pilar Sánchez O. "Using the similarity factor f_2 in practice. A critical revision and suggestions for its standard error estimation". *Chemometrics and Intelligent*

Laboratory Systems, 2009, **99**(1):49–56, cumpliendo de esta forma con el objetivo *e* de la presente tesis.

3.- Informe de los Directores

Jordi Ocaña Rebull y Josep Lluís Carrasco Jordan, como directores de esta tesis doctoral, emiten el siguiente informe sobre el índice de impacto y la participación de María Pilar Sánchez Olavarría en los artículos presentados en la presente monografía:

Artículo 1

“On Equivalence and Bioequivalence Testing”. Jordi Ocaña, Ma. Pilar Sánchez O, Alex Sánchez, Josep L. Carrasco J. *SORT*. **32**(2):151-176. 2008.

SORT es la revista oficial del Institut d'Estadística de Catalunya, IDESCAT. Actualmente se halla en el tercer año del período de seguimiento para su posible inclusión en el JCR. Tal como se indica en la web del IDESCAT (<http://www.idescat.cat/sort/>), el índice de impacto acumulado en el año 2008 fue de 0.250 en la categoría Statistics & Probability.

María Pilar Sánchez participó en la redacción y revisión de todas las secciones del artículo, y es especialmente responsable del planteamiento farmacológico y regulatorio del problema de la Bioequivalencia, de la consecución de los datos y de los cálculos en los ejemplos de bioequivalencia y del anexo sobre escalamiento de límites de bioequivalencia.

Artículo 2

“Evaluating Average Bioequivalence using methods for high variability drugs: A case study”. Ma. Pilar Sánchez O, Carolina Gómez G, Josep L. Carrasco J, Jordi Ocaña, Carlos Von Plessing R, C. Gloria Godoy M, Rolando Reinbach H, Ricardo Godoy R. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **46**(10):527-537. 2008.

Índice de impacto, 2008: 1.299, posición 165 de 219 publicaciones indexadas en la categoría Pharmacology & Pharmacy.

María Pilar Sánchez participó activamente en el desarrollo de todas las partes del artículo y especialmente en la obtención de los datos, sirviendo de nexo principal con el grupo de investigación experimental en Chile, en la realización de los análisis estadísticos y en la interpretación fisiológica de los resultados del análisis estadístico, en la sección de discusión.

Artículo 3

“The Effect of Variability and Carryover on Average Bioequivalence Assessment: A Simulation Study”. Ma. Pilar Sánchez O, Jordi Ocaña, Josep Lluís Carrasco. Sometida “minor revision” a *Pharmaceutical Statistics*, Octubre de 2009.

Índice de Impacto, 2008: 1.652, posición 17 de 92 publicaciones en la categoría Statistics & Probability.

María Pilar Sánchez participó activamente en el planteamiento del problema, el diseño de las simulaciones y en la discusión. Es la principal responsable del análisis de los resultados de las simulaciones.

Artículo 4

“A systematic review on the methods used in pharmacogenetic studies with binary assessment of treatment response”. Albert Cobos, Ma. Pilar Sánchez, Jaume Aguado, Josep L Carrasco. Enviado a *Pharmacogenetics and Genomics*, Noviembre de 2009

Índice de Impacto, 2008: 4.409, posición 26 de 219 publicaciones en la categoría Pharmacology & Pharmacy

María Pilar Sánchez participó activamente en todas las fases de elaboración de este trabajo: búsqueda bibliográfica, revisión de artículos, elaboración y discusión de resultados, y redacción del manuscrito.

Artículo 5

“Using the similarity factor f_2 in practice. A critical revision and suggestions for its standard error estimation”. Jordi Ocaña, Gloria Frutos, Ma. Pilar Sánchez O. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **99**(1):49–56. 2009.

Índice de Impacto, 2008: 1.940, posición 11 de 92 publicaciones en la categoría Statistics & Probability.

María Pilar Sánchez participó activamente en la realización de las simulaciones y de los cálculos sobre datos reales y en la discusión de los aspectos regulatorios de las pruebas de disolución.

Fdo. Jordi Ocaña Rebull

Fdo. Josep Lluís Carrasco Jordan

4.- Discusión Global

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar algunos problemas que se presentan en la evaluación de medicamentos. Para iniciar este trabajo lo primero que se estudió fueron los métodos de la ABE en drogas de alta variabilidad para ver si aplicados coincidían o no en sus conclusiones, aplicados la misma base de datos. Para ello se evaluó la ABE sobre los resultados de un ensayo de bioequivalencia en Furosemida, fármaco diurético principalmente utilizado en hipertensión y algunas patologías cardiovasculares.

Los métodos aplicados consideraron las siguientes condiciones:

- Uso de los límites reglamentarios recogidos en las regulaciones de las Agencias del medicamento.
- Ampliación de los límites de ABE de acuerdo a las recomendaciones de las agencias reguladoras del medicamento.
- Escalamiento de los límites de bioequivalencia, basados en GMR, variabilidad y propiedades de corte (leveling-off properties) a través de diferentes distribuciones.
- Escalamiento de la medida de bioequivalencia, basados en dos aproximaciones: distribución t no-central y la linearización del criterio regulatorio.
- Evaluación con parámetros farmacocinéticos alternativos de la velocidad de absorción.
- Aplicación de métodos alternativos asociados con la construcción de los intervalos de confianza.

Las agencias del medicamento, proponen límites muy definidos tanto en el caso de las drogas de variabilidad intermedia como en drogas de margen terapéutico estrecho. En el caso de drogas de alta variabilidad la FDA y EMEA solo han efectuado una recomendación diferente en cada caso.

A continuación se muestra un resumen de los resultados en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de los métodos clásicos para ABE en Furosemida*

Parámetro Farmacocinético	Media Geométrica		GMRs (P a R)	Varianza Residual	TOST valor p		SCI [P/R]	ABE?
	Referencia	Prueba			Cola Superior	Cola Inferior		
$\ln ABC_{0-t}$	3.2278	2.8688	88.88	0.0308	$<1 \times 10^{-5}$	0.0559	[79.7, 99.1]	No
$\ln ABC_{0-\infty}$	3.6306	3.3609	92.58	0.0197	1.5×10^{-5}	0.0054	[84.8, 101.1]	Si
$\ln C_{\text{máx}}$	1.4059	1.1982	85.22	0.1262	0.0043	0.3112	[68.3, 106.3]	No
$\ln [C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}]$	0.3872	0.3565	92.05	0.0636	0.0020	0.0689	[78.9, 107.5]	No

*Todos los valores se muestran en la escala original. GMR (Razón de medias geométricas), Intervalo de Confianza de Westlake, 5% two one-sided tests (TOST) y 90% Shortest Confidence Interval (SCI).

Usando los métodos clásicos, la ABE solo se puede concluir para el caso de $\ln ABC_{0-\infty}$ y se rechaza para el resto de los parámetros. Sin embargo los resultados para $\ln ABC_{0-t}$ y $\ln C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}$ están muy cercanos al límite inferior de ABE.

Para poder tener una idea más amplia de cómo los métodos recomendados y alternativos pueden afectar el resultado final de BE, se aplicó todos los métodos basados en las diferentes

combinaciones de ampliación de límites, escalamientos de la métrica y límites, etc., al parámetro farmacocinético de $C_{m\acute{a}x}$. La Tabla 9, muestra los resultados aplicando estos nuevos métodos.

Tabla 9: Evaluación de la ABE para $C_{m\acute{a}x}$ de acuerdo a diferentes límites y tipos de intervalo de confianza

Límites de Bioequivalencia	Intervalo de Confianza			
	Shortest I [68.3, 106.3]	Westlake's I_W [68.3, 146.5]	Hsu <i>et al.</i> Symmetric I_s [68.3, 146.4]	Hsu <i>et al.</i> Specific I_* [68.3, 106.3]
Arlington Workshop [Shah 1996] [70.0, 143.0]	^b No BE	No BE	No BE	No BE
EMA [CPMP 2001] [75.0, 133.0]	No BE	No BE	No BE	No BE
Límites de Escalado Mixto basados en la varianza residual [Midha et al. 2005, Tothfalusi 2003b]				
$\sigma_0=0.20$ [67.3, 148.6]	^a BE	BE	BE	BE
$\sigma_0=0.223$ [70.1, 142.7]	No BE	No BE	No BE	No BE
$\sigma_0=0.294$ [76.4, 130.9]	No BE	No BE	No BE	No BE
Límites Escalados basados en la GMR y variabilidad [Karalis 2004]				
BELscG1 [75.8, 131.9]	No BE	No BE	No BE	No BE
BELscG2 [77.0, 129.8]	No BE	No BE	No BE	No BE
Límites Escalados basados en la GMR con propiedades de corte [Karalis 2005]				
BELscM (Michaelis-Menten) [79.8, 125.2]	No BE	No BE	No BE	No BE
BELscE (Simple Exponencial) [78.8, 126.9]	No BE	No BE	No BE	No BE
BELscW (Weibull) [78.7, 127.1]	No BE	No BE	No BE	No BE
Límites Escalados con propiedades de corte [Kytariolos 2006]				
$BE_{cf}W$ (límite de la función de expansión de Weibull) [75.8, 131.9]	No BE	No BE	No BE	No BE

^aBE= Bioequivalente, ^bNo BE = No hay evidencia de Bioequivalencia

Ninguno de los resultados con estos métodos de ampliación de límites nos permitieron confirmar la ABE, a excepción de los límites de escalado mixto basados sobre la varianza residual, considerando la variabilidad $\sigma_0=0.20$. La introducción de este parámetro adicional (σ_0), ha recibido algunas críticas importantes porque introduce al análisis algunas arbitrariedades suplementarias. Además, todos los otros métodos han dado el mismo resultado, es decir de no ABE, en forma similar que si se hubiese aplicado el criterio de ABE para la GMR de estar entre los límites de 80/125.

Este resultado nos está indicando que para $C_{m\acute{a}x}$, la decisión no depende del tipo de intervalo de confianza. Se aprecia que todos los intervalos de confianza comparten un límite inferior muy similar y la aceptación de la ABE está condicionada principalmente por este límite cercano pero inferior al propuesto por Shah *et al.*, 1996.

Se repitió el análisis con un nuevo parámetro farmacocinético, $C_{m\acute{a}x}/ABC_{0-\infty}$. Con la excepción de los métodos de escalamiento BELscM, basado en la función de Michaelis-Menten y el límite de escalado mixto considerando el parámetro $\sigma_0 = 0.294$, según se puede ver en la Tabla 10. Todos los métodos restantes nos muestran como resultado final el establecimiento de la ABE independientes del intervalo de confianza aplicado, para esta nueva métrica farmacocinética.

Tabla 10: Evaluación de la ABE para $C_{m\acute{a}x}/ABC_{0-\infty}$ de acuerdo a diferentes límites de BE y tipos de intervalo de confianza

Límites Bioequivalencia	Intervalo de Confianza			
	Shortest I [78.7, 107.7]	Westlake's I_W [78.6, 127.3]	Hsu <i>et al.</i> Symmetric I_s [78.7, 127.1]	Hsu <i>et al.</i> Specific I_* [78.7, 107.7]
Arlington Workshop [Shah 1996] [70.0, 143.0]	^a BE	BE	BE	BE
EMA [CPMP 2001] [75.0, 133.0]	BE	BE	BE	BE
Límites de Escalado Mixto basados en la varianza residual [Midha et al. 2005, Tothfalusi 2003b]				
$\sigma_0=0.20$ [75.5, 132.5]	BE	BE	BE	BE
$\sigma_0=0.223$ [77.7,128.7]	BE	BE	BE	BE
$\sigma_0=0.294$ [80, 125] (no escalado como $\hat{\sigma}_{sc} = 0.252 < \sigma_0$)	^b No BE	No BE	No BE	No BE
Límites Escalados basados en la GMR y variabilidad [Karalis 2004]				
BELscG [73.8, 135.5]	BE	BE	BE	BE
BELscG2 [75.1, 133.2]	BE	BE	BE	BE
Límites Escalados basados en la GMR con propiedades de corte [Karalis 2005]				
BELscM (Michaelis-Menten) [79.8, 125.3]	No BE	No BE	No BE	No BE
BELscE (Simple Exponencial) [77.9, 128.3]	BE	BE	BE	BE
BELscW (Weibull) [77.9, 128.3]	BE	BE	BE	BE
Límites Escalados con propiedades de corte [Kytariolos 2006]				
BE_{ef}W (límite de la función de expansión de Weibull) [76.9, 130.0]	BE	BE	BE	BE

^aBE= Bioequivalente, ^bNo BE = No hay evidencia de Bioequivalencia

Finalmente en el tercer análisis se aplicó los métodos de escalado de acuerdo a la distribución t no-central y en la linealización del criterio regulatorio. Los resultados los podemos ver en el Tabla 11.

Tabla 11: Decisión de ABE de acuerdo a métodos basados en el escalado de la medida del efecto formulación [Midha et al. 2005]

Distribución No-central t		Límites del Intervalo de Confianza	
Límites de Bioequivalencia de acuerdo a σ_0		$\ln C_{\text{máx}}$ [-3.24, 0.39]	$\ln C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}$ [-2.85, 0.73]
$\sigma_0 = 0.20$ [FDA 2001]	[-3.16, 3.16]	^b No BE	^a BE
$\sigma_0 = 0.223$ [Boddy et al. 1995]	[-2.83, 2.83]	No BE	No BE
$\sigma_0 = 0.294$ [Tothfalusi et al. 2003 ^a)]	[-2.15, 2.15]	No BE	No BE
Linealización del Criterio Regulatorio		Límite de confianza superior 95% para $\mu_T - \mu_R - k\sigma_{SC}^2$ Bioequivalencia se establece si CL no es positivo	
$\sigma_0 = 0.200, k = 1.116$		^c CL=0.0839, No BE	CL=0.0162, No BE
$\sigma_0 = 0.223, k = 1.000$		CL=0.0856, No BE	CL=0.0307, No BE
$\sigma_0 = 0.294, k = 0.759$		CL=0.0912, No BE	CL=0.0326, No BE

^aBE= Bioequivalencia, ^bNo BE = No hay evidencia de Bioequivalencia, ^cCL: límite de confianza superior

Todos los resultados para $C_{\text{máx}}$ conducen a la misma conclusión, es decir bioinequivalencia, mientras que en el caso de la métrica $\ln C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}$, el único método que permitió declarar ABE fue el basado en la distribución no-central t considerando a $\sigma_0 = 0.20$.

Percibimos que el principal problema de las drogas de alta variabilidad es la baja potencia de los métodos estándares. Calculamos el tamaño de muestra que se hubiese requerido para que $C_{\text{máx}}$, tuviese un 80% de potencia para un rango de aceptación de 0.8 hasta 1.25, $n=392$ que constituye un valor absolutamente inviable para este tipo de estudios.

Ya destacamos el hecho que el tipo de intervalo de confianza no influencia el resultado final de la ABE y la mejor alternativa es el intervalo de confianza más corto (“shortest confidence interval”, SCI), el más simple. Si consideramos la estimación del efecto de la formulación, una muy buena alternativa es el intervalo I_* , el que es similar en longitud y presenta una confianza mayor (95% en vez de 90%) al SCI.

La decisión final de ABE es ligeramente más dependiente del método usado para ampliar o escalar los límites de BE. Sin embargo, con una excepción muy marginal, los resultados parecen apuntar a que la métrica $C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}$, apunta hacia un resultado de ABE a diferencia de la métrica inicial $C_{\text{máx}}$, que apunta hacia el lado contrario. El resultado final muestra que los datos de la Furosemida dependen más de la métrica que del método para determinar ABE. Si considerásemos la métrica $C_{\text{máx}}/ABC_{0-\infty}$, propuesta por Endrenyi *et al.*, 1993, la ABE sería clara.

A este resultado se agrega el hecho en que hay otros argumentos de tipo fisiológico, fármaco-cinético y fármaco-dinámico que son importantes de considerar en el análisis final. El efecto diurético de la Furosemida está estrechamente relacionado con la velocidad de excreción urinaria más que con la concentración plasmática. Además se ha establecido que existe una

velocidad de excreción urinaria asociada a una eficiencia máxima que depende de una cierta concentración, y que cualquier valor superior a esta concentración en particular no mejora el efecto diurético de la droga, mientras la excreción urinaria se mantenga constante.

En el caso específico de los datos observados en la Furosemida de referencia y de prueba ambas formulaciones exceden largamente los valores requeridos para alcanzar esta eficiencia.

Aparte de la alta variabilidad de los datos anteriores, es posible que pueda estar presente algún efecto carryover que contribuya a distorsionar todavía más los resultados del análisis. De hecho para los parámetros farmacocinéticos $ABC_{0-\infty}$, ABC_{0-t} y C_{max} , la prueba de “negligibilidad” o “insignificancia” del carryover por Wellek (2003) para un umbral de 0.10 que se discute con mas detalle en el artículo publicado en la revista SORT) proporciona unos p-valores de 0.3282, 0.3309 y 0.3837 respectivamente, lo cual no permite descartar la presencia de carryover, en términos absolutos. La misma prueba para carryover escalado (dividido por la variabilidad) proporciona unos p-valores de 0.1386, 0.0399 y 0.0384 para cada uno de los parámetros farmacocinéticos anteriores, de manera que tampoco sería posible descartar la presencia de carryover. Más adelante retomamos el estudio de este posible efecto distorsionador en combinación con la alta variabilidad, en el artículo enviado a la revista *Pharmaceutical Statistics*.

Todos estos resultados nos hacen pensar que todos los métodos estadísticos asociados a la ABE no constituyen por si sola, la decisión final si es ABE o no, sino mas bien nos permiten reflexionar que la mejor decisión es aquella que nos permite complementar tanto los resultados estadísticos en conjunto con el conocimiento de otros aspectos clínicos y fisiológicos, que en su conjunto pueden permitir tomar la mejor decisión.

Para profundizar más en el tema de la bioequivalencia se fundamentó y detalló los métodos inferenciales utilizados: TOST, Intervalos de confianza, ampliación de límites, etc., con el fin de buscar respuestas a los resultados anteriores, lo que se revisan en el artículo de la revista SORT.

Un elemento inicial de las pruebas de equivalencia es que representan la perspectiva natural de muchos problemas estadísticos. El problema de fondo es demostrar la ausencia de diferencias importantes entre dos o más condiciones experimentales diferentes bajo un mismo diseño.

En el análisis estadístico, un error conocido (pero aún frecuente en la práctica) es poner a prueba una hipótesis nula que afirme igualdad (por ejemplo, igualdad de medias) frente a una hipótesis alternativa que indica la existencia de diferencias. Si suponemos que la prueba se aplicó adecuadamente, y el valor p fue mayor que el nivel de significación indicado anteriormente (por ejemplo, un valor de p de 0,12, cuando el nivel de significación era de 0,05, la hipótesis nula no se rechazará. El no rechazo de la hipótesis nula no es "prueba" de su validez, pero, no siempre se toma en cuenta este importante detalle en la práctica.

También se puede dar una situación contraria en la que el valor de p de lugar a resultados significativos, debido posiblemente a un tamaño de muestra muy grande. La hipótesis nula de no-existencia de efecto, por lo tanto, se rechaza, incluso si ese efecto era insignificante. Es decir, el efecto es estadísticamente pero no clínica o biológicamente significativo.

Si el objetivo final es "demostrar" la inexistencia del efecto (o de diferencias), un procedimiento más confiable sería establecer una hipótesis alternativa de "igualdad cercana" (no de igualdad en el sentido estricto), frente a una hipótesis nula de "diferencia lo suficientemente grande". Este enfoque, donde la hipótesis alternativa define el efecto de no-existencia como la equivalencia de los parámetros en lugar de una igualdad estricta, se toma como base en las pruebas de equivalencia.

Esta forma de realizar el planteamiento, lo podemos ver aplicado a la problemática de la Bioequivalencia de medicamentos y en otras áreas referenciadas en el artículo de la revista SORT.

La BE de medicamentos se establece en términos de una prueba de equivalencia para el efecto de la formulación ϕ , de la forma:

$$H_0 : \phi \leq \theta_1 \quad \text{y} \quad \phi \geq \theta_2$$

$$H_1 : \theta_1 < \phi < \theta_2$$

donde, $-\theta_1 = \theta_2 = \theta = 0.223$ y si no se especifica nada más, se asumen límites de equivalencia simétricos $\pm \theta = \pm 0.223$ para los datos transformados a escala logarítmica. En particular, se resuelve a través de la llamada Prueba de Schuirmann (1987) denominada también "Two One-Sided Test" (TOST) en donde las hipótesis nulas se descomponen en dos hipótesis de una cola:

$$H_{01} : \phi \leq \theta_1 \quad \text{y} \quad H_{02} : \phi \geq \theta_2$$

$$H_{02} : \phi > \theta_1 \quad \text{y} \quad H_{12} : \phi < \theta_2$$

y solamente se puede concluir bioequivalencia entre las dos formulaciones comparadas sí y sólo sí ambas hipótesis nulas: H_{01} y H_{02} , se rechazan al nivel nominal α normalmente (0.05). Estas dos pruebas de una cola, se pueden implementar gracias al estadístico T que sigue una distribución central de Student con $N-2$ grados de libertad, donde N corresponde al número de sujetos que participan en el estudio, \bar{D} , es la diferencia entre las medias de la formulación de prueba y referencia por periodo y secuencia,

$se_{\bar{D}}$ es el error estándar de \bar{D} y el efecto de formulación $\phi = F_T - F_R$, que corresponde a la diferencia entre tratamientos por período de acuerdo a la ecuación:

$$T = \frac{\bar{D} - \phi}{se_{\bar{D}}}$$

Este procedimiento es equivalente al principio de inclusión del intervalo de confianza usualmente llamado "1-2 α shortest confidence interval":

$$\bar{D} \pm t_{(\alpha, N-2)} \cdot se_{\bar{D}}$$

donde, $t_{(\alpha, N-2)}$ es el cuantil 1- α de la distribución t de Student con $N-2$ grados de libertad. Se declara ABE si este intervalo está incluido en los límites de BE θ_1, θ_2 .

La prueba TOST para el caso de comparaciones en drogas de alta variabilidad está altamente sesgada, y tiene baja potencia considerando los tamaños de muestra utilizados generalmente en estos estudios de BE.

Una aplicación de estudio de bioequivalencia los podemos ver con los datos obtenidos de Al-Mohizea *et al.*, (2007), donde se aprecian los siguientes resultados en la Tabla 12.

Tabla 12: Resumen del estudio de Bioequivalencia con diferentes métodos*

Parámetro Fármaco- cinético	Media Geométrica		GMRs (P a R)	Westlake's CI	TOST valor p		SCI [T/R]	BE?
	Referencia	Prueba			Cola superior	Cola inferior		
lnABC _{0-t}	5.718	5.553	97.12	[87.1, 114.8]	<1×10 ⁻⁴	<1×10 ⁻⁴	[87.5, 107.8]	Si
lnABC _{0-∞}	5.995	5.873	97.97	[88.2, 113.4]	<1×10 ⁻⁴	<1×10 ⁻⁴	[88.7, 108.2]	Si
lnC _{máx}	1.157	1.182	102.22	[87.6, 114.2]	<1×10 ⁻⁴	<1×10 ⁻⁴	[92.1, 113.5]	Si

*Todos los valores se muestran en la escala original.

GMR (Razón de medias geométricas), Intervalo de Confianza de Westlake, 5% two one-sided tests (TOST), 90% Shortest Confidence Interval (SCI).

Los valores para la diferencia y error estándar de este estudio se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Valores para \bar{D} and $se_{\bar{D}}$ del estudio de BE

Parámetro Fármaco-cinético	\bar{D}	$se_{\bar{D}}$
lnABC _{0-t}	-0.0292	0.0609
lnABC _{0-∞}	-0.0205	0.0578
lnC _{máx}	0.0220	0.0608

Los resultados indican que los tres parámetros farmacocinéticos comparados entre las formulaciones de referencia y de prueba, cumplen con todos métodos diferentes para evaluar la bioequivalencia promedio, por lo tanto podemos decir en consecuencia que ambos fármacos son bioequivalentes.

La prueba de equivalencia constituye una de las formas más adecuadas para resolver situaciones donde el objetivo primario es probar similitud. Las pruebas de bioequivalencia no están exentas de dificultades o de algún punto de controversia, pero en cualquier caso, parecen ser el enfoque más fiable para este tipo de problemas.

Muchas de las dificultades con el criterio de la equivalencia, en esencia, tienen un carácter técnico y, probablemente, se encuentre una solución, como también podría ocurrir que en el peor de los casos que no exista una solución tan directa. En la práctica, hay otras preguntas que tienen un carácter más problemático, como la determinación adecuada de los límites equivalencia. Wellek (2003, págs. 11-13) da algunas sugerencias razonables desde el punto de vista de los parámetros estadísticos y el problema estadístico bajo consideración (que es específico de cada área de aplicación).

Una última consideración, referida a que los problemas de equivalencia es que podrían ser resueltas bajo la óptica de dos aproximaciones: el enfoque “frecuentista” y el bayesiano, sin embargo, las soluciones frecuentistas suelen ser más comunes tanto en la literatura como en la práctica, a pesar de las muchas y buenas propiedades del enfoque Bayesiano.

Esto posiblemente se debe en parte al peso e influencia que tienen las agencias reguladoras del medicamento, en donde las pruebas de bioequivalencia, constituyen la más importante área de aplicación. Posiblemente, hay un sesgo del experto dentro de la

reglamentación hacia el enfoque mas frecuente, pero también se puede deber probablemente a la facilidad de uso y claridad los criterios relativos a los usuarios potenciales de los métodos.

Las principales metodologías para el escalamiento de límites se pueden consultar en el Anexo N°1 donde se resumen los intervalos de confianza en Bioequivalencia y los métodos de escalamiento de límites.

Otra característica que se estudió a fondo fue el efecto de la variabilidad residual y efecto carryover a partir de simulaciones realizadas bajo un diseño de crossover 2x2. La evaluación se realizó considerando tres características: el porcentaje de aprobación de ABE (potencia del estudio), recubrimiento y precisión del intervalo.

Ya sabíamos por la literatura que niveles altos de variabilidad distorsionan algunos procedimientos para el cálculo de la ABE, en particular el poder controlar el error del tipo I, es decir, que en presencia de alta variabilidad, es muy difícil poder declarar bioequivalencia cuando efectivamente existe, lo que nos remite al estudio considerado anteriormente.

El carryover está modulado por la variabilidad y también tiene una influencia en el control del error del tipo I. En presencia de este efecto carryover, el riesgo de declarar BE puede llegar a ser alto, en especial para bajas variabilidades y tamaños de muestra elevados.

Examinamos parte de la controversia con algunas reflexiones en torno a la realización de pruebas preliminares para el carryover, antes de efectuar el análisis de la ABE.

Para efectuar las simulaciones, consideramos el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + P_j + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + S_{i(k)} + e_{ijk}$$

Donde,

- Y_{ijk} es el logaritmo de la métrica farmacocinética (ABC o C_{max}) estudiada. El índice i representa al sujeto, $i = 1, \dots, n_k$. El índice j da cuenta del periodo de administración, $j = 1, 2$, y k denota la secuencia, $k = 1, 2$ (RP y PR, respectivamente).
- P_j es el efecto fijo del periodo de administración j . Se consideró que $\sum_{j=1}^2 P_j = 0$, donde se cumple que $P_1 = -P_2 = P$.
- $F_{(j,k)}$ es el efecto fijo que describe el efecto directo de la formulación administrada en la secuencia k y periodo j . Se cumple que:

$$F_{(j,k)} = \begin{cases} F_R & \text{si } j = k \\ F_T & \text{si } j \neq k \end{cases} \text{ donde, } F_R = -F_T = F.$$
- $C_{(j-1,k)}$ es el efecto fijo "carryover" desde el periodo $(j-1)$ a j en la k -ésima secuencia. El carryover puede ocurrir solamente en el segundo periodo. El efecto de la formulación de referencia desde el primer periodo al segundo en la secuencia 1 se expresa por C_R , mientras que el efecto equivalente de la formulación de prueba en la secuencia 2 se denota por C_T . Por lo tanto, se cumple:

$$C_{(j-1,k)} = \begin{cases} C_R & \text{si } j=2 \text{ y } k=1 \\ C_T & \text{si } j=2 \text{ y } k=2 \\ 0 & \text{de otro modo} \end{cases} \quad \text{con } C_R = -C_T = C.$$

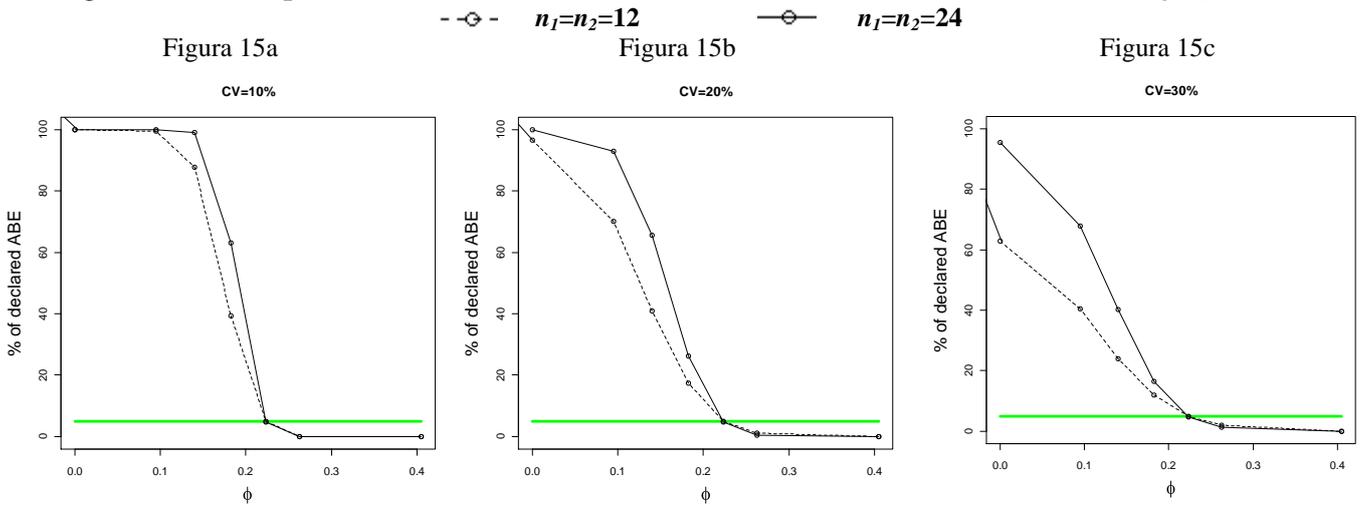
- $S_{i(k)} \sim N(0, \sigma_S^2)$ representa el efecto aleatorio en el i -ésimo sujeto anidado en la k -ésima secuencia y $e_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$ es el error aleatorio o residual. La varianza residual, σ^2 , combina la variabilidad intra-sujeto en el proceso *ADME* (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) con los componentes de la variabilidad analítica: variabilidad sujeto-formulación y la variabilidad no explicada de los efectos aleatorios. Se asume independencia entre todos los $S_{i(k)}$, todos los e_{ijk} e independencia mutua entre $\{S_{i(k)}\}$ y $\{e_{ijk}\}$.

En la simulación, cada uno de los efectos bajo consideración, representa a factores potenciales que pueden influenciar el resultado final del estudio de BE. Las simulaciones, se desarrollaron bajo varios grados de efecto formulación, ϕ , tamaños de muestra, $n = n_1 = n_2$, efecto carryover relativo, $\kappa/\phi = (C_T - C_R)/\phi$ y varianza residual, σ^2 . Se consideró el concepto de carryover relativo que tiene mayor significancia que el carryover absoluto, κ , que expresa la fracción residual de la droga previamente administrada restante en el sitio de acción. Los demás parámetros que permanecieron constantes dentro del modelo fueron: $\mu = 1.25$, $P = 0$ (sin efecto periodo), y $\sigma_S = 0.1$.

En primer lugar, si examinamos el efecto formulación sin efecto carryover, considerando variabilidades y tamaños de muestra diferentes, se aprecian los siguientes resultados, Ver Figuras 15 a la 17:

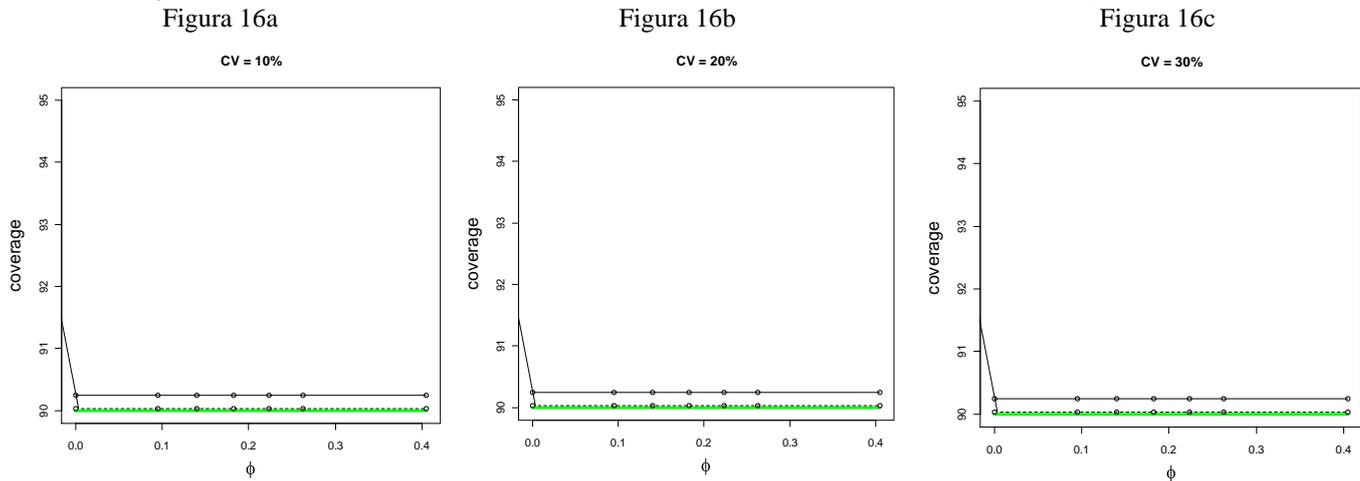
- En la Figura 15, un incremento del tamaño de muestra de $n = 12$ a $n = 24$ aumenta el porcentaje de declaración de ABE bajo todos los coeficientes de variación. El incremento de la variabilidad (para un mismo n y ϕ) tiene un fuerte impacto sobre la potencia, con una marcada disminución del porcentaje de declaración de ABE. Con $n = 12$, cuando $CV = 30\%$ es poco probable declarar ABE aun para pequeñas diferencias entre las formulaciones (por ejemplo, cuando $\phi = 0.1$).
- En la Figura 16, el recubrimiento permanece casi constante y cercano al valor nominal del 90%, independiente de ϕ , tamaño de muestra y variabilidad.
- La Figura 17, muestra que la longitud del intervalo permanece constante a medida que aumenta el efecto de la formulación ϕ , de la misma forma que crece el CV. Además, la diferencia entre las longitudes medias asociadas a cada tamaño de la muestra, también aumenta con el aumento de la variabilidad.

Figura 15: % de Aprobación de ABE vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$



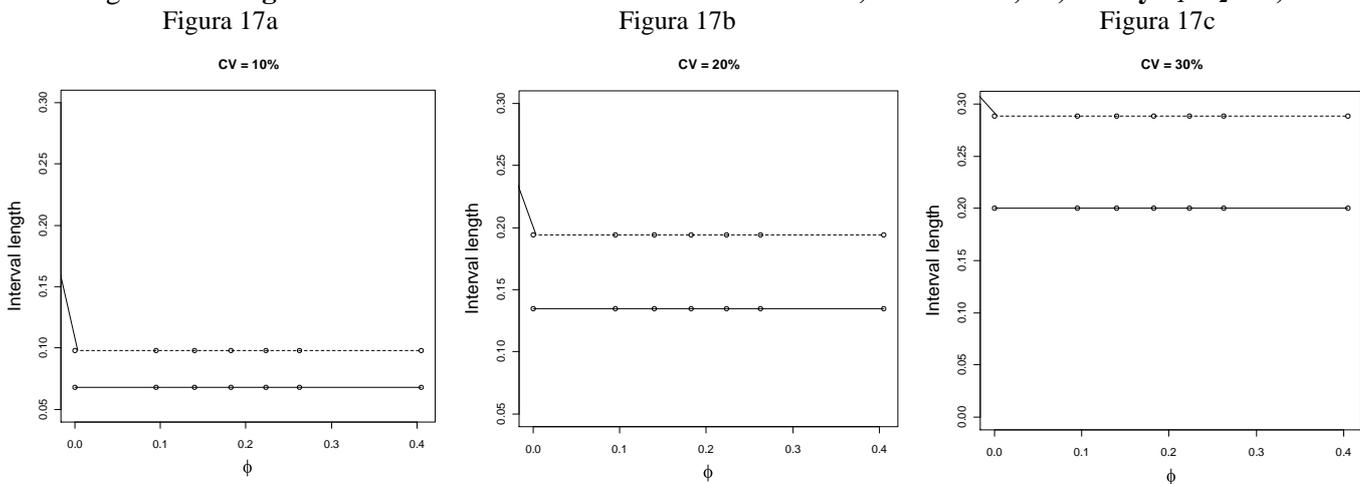
La línea verde representa el valor nominal del 5% del tamaño de la prueba

Figura 16: Recubrimiento vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$



La línea verde representa el valor nominal del 90% del recubrimiento

Figura 17: Longitud del intervalo vs. Efecto de la Formulación, con CV=10, 20, 30% y $n_1=n_2=12, 24$

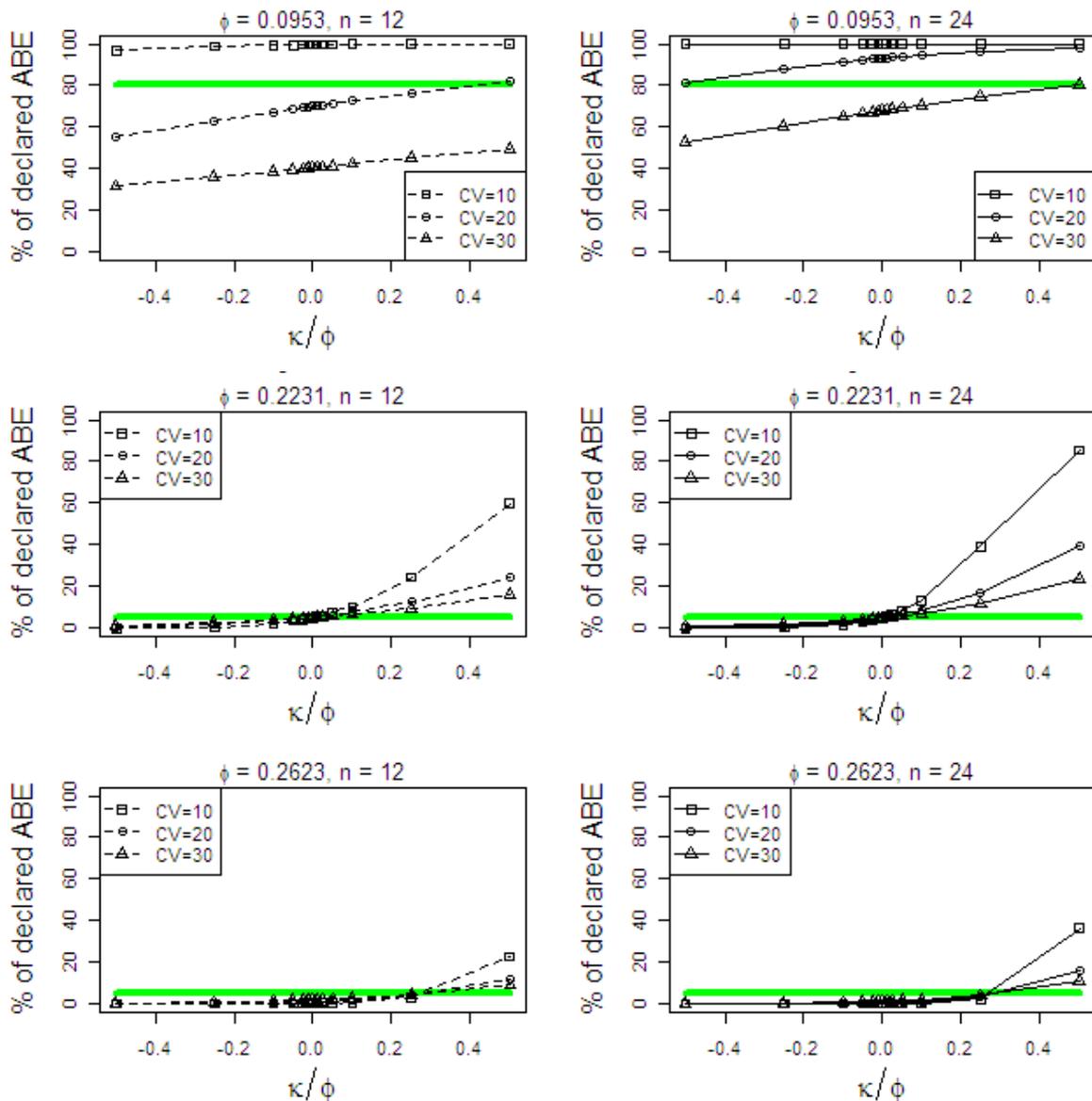


En segundo lugar, en la Figura 18 se pueden revisar las mismas simulaciones, pero esta vez, con un efecto carryover no nulo, expresado en la fracción κ/ϕ definida anteriormente. Los

valores negativos de esta razón, corresponden a un carryover y efecto formulación de signo diferente, mientras que los valores positivos corresponden al caso en que ambos efectos tienen el mismo efecto.

Esta Figura es un arreglo de gráficos, donde cada línea corresponde a un efecto formulación determinado, y cada columna (etiquetada como “1” y “2”) corresponden al tamaño de muestra, 12 o 24. Dentro de cada gráfica, cada línea representa un valor de variabilidad (de acuerdo al mismo patrón de CV = 10%, 20% y 30%).

Figura 18: % de Declaración de ABE en función de κ/ϕ de acuerdo a CV, para algunos ϕ y tamaños de muestras



La línea verde horizontal representa el % de referencia de la aprobación de ABE: Un 80% de potencia cuando la hipótesis nula podría ser rechazada y un valor nominal del 5% del tamaño de la prueba en el otro caso.

La primera fila de la Figura 18, ilustra el caso de una situación en la que realmente hay bioequivalencia. Idealmente el porcentaje de aprobación de ABE debería mantenerse constante cerca del 100%, independiente de cualquier efecto distorsionador como el carryover o una alta

variabilidad. Esto ocurre para variabilidades pequeñas, $CV = 10\%$, y $n = 24$, donde la potencia permanece virtualmente paralela al eje de abscisas. En el caso de la misma variabilidad pequeña, para $n = 12$ hay una leve caída de la potencia al ir incrementando valores negativos de carryover relativo. El aumento de las variabilidades, hace que el efecto carryover sea evidente. La curva adquiere una pendiente positiva, que se va transformando en una caída progresiva de potencia para las razones negativas de κ/ϕ y un aumento de la potencia para razones positivas. Se aprecia en cualquier caso que el efecto de la variabilidad parece ser muy decisivo, más que el efecto del carryover.

La segunda fila de la misma Figura 18, muestra un caso de efecto formulación en el límite de la BE. Teóricamente, el porcentaje de aprobación de ABE debería posicionarse en un valor del 5%. Pero, este no es el caso. Razones negativas de κ/ϕ inducen pruebas más conservadoras, mientras de las razones positivas inducen procedimientos de prueba no-validos, con un tamaño real de la prueba que excede el valor nominal del 5%. El crecimiento del tamaño de la prueba es perceptiblemente alto para carryovers relativos que exceden 0.1. En correspondencia con el bajo nivel de potencia, cuando la variabilidad es alta y el tamaño de muestra es pequeño, ahora la naturaleza excesiva de la prueba está potenciada por bajas variabilidades y tamaños de muestras grandes (la probabilidad de declarar ABE excede demasiado a 0.05) y se atenúa por variabilidades altas y tamaños de muestra pequeños.

La tercera fila de la misma Figura 18, ilustra el caso en que manifiestamente no hay bioequivalencia. El porcentaje de aprobación de BE, se observa una tendencia indeseable de ser superior al 5% de la línea de referencia y esta tendencia se observa para carryover relativos positivos (mas de 0.25) y notablemente mas bajo para variabilidades pequeñas y grandes tamaños de muestra.

Este efecto paradójico sobre el error del tipo I a tamaños de muestra grandes y variabilidades pequeñas, en el sentido de incrementar su probabilidad en presencia de carryover, se repite para recubrimiento y longitud.

Todos los resultados validan lo que se conoce de los métodos de BE, es decir, que la variabilidad tiene un fuerte impacto en el resultado final de un estudio de BE. El aumento del tamaño de muestra puede compensar el efecto de la variabilidad aunque a veces estos pueden ser demasiado grandes en la realidad como para ser efectivamente aplicados al estudio.

Los resultados principales cuantifican las posibles consecuencias de la presencia de carryover. El carryover incide de alguna forma en los errores de tipo I y II, y dependerá principalmente de la variabilidad experimental y del signo del carryover relativo, expresado como la razón κ/ϕ . Las razones negativas, inducen un decaimiento en la potencia, las razones positivas, provocan un crecimiento aparente de la potencia en correspondencia con un aumento de la probabilidad de error del tipo I que invalida los procedimientos de prueba de BE, ya no respecta el valor nominal de la prueba. Esta perturbación aumenta con el tamaño de la muestra y con la disminución de la variabilidad.

Estos efectos que aparentemente se ven paradójicos, son una consecuencia directa del tipo de sesgo inducido por el carryover. Más precisamente, a valores de ϕ con el mismo signo que κ , (es decir, cuando la relación es positiva), tienden a un efecto de formulación cero

artificial, y hacer más fácil la declaración de BE, mientras que valores κ de signo contrario a ϕ inducen el efecto “artefacto” opuesto. Estos sesgos dependen directamente de la magnitud del carryover y no del tamaño de la muestra ni variabilidad.

En el caso donde se declara BE como producto del error del tipo I, (efecto formulación fuera y lejos de los límites de BE), el crecimiento positivo del carryover relativo, induce una proporción creciente de declaraciones de BE erróneas, más frecuentes en tamaños de muestras grandes o variabilidades pequeñas, es decir, para los intervalos de confianza más estrechos. Del mismo modo, en un caso de BE verdadera, (efecto formulación en el límite de BE), la razón negativa κ/ϕ hará más difícil declarar BE.

En cualquier caso, el carryover tiene un impacto muy evidente sobre los procedimientos para probar BE modulados por la variabilidad y otros factores. Algunos autores han propuesto realizar una prueba de hipótesis nula de no-existencia de carryover a niveles de significación de $\alpha = 0.1$ o 0.15 , para tener una potencia suficiente. Si no se rechaza, se recomienda un realizar el estudio de BE bajo el supuesto de que no hay carryover. De otro modo, el análisis se debería efectuar con los datos provenientes sólo del primer período, como los datos obtenidos en un estudio paralelo completamente aleatorizado. Esta estrategia se usa con frecuencia a pesar de las muchas críticas.

Según los detractores del enfoque en dos etapas descrito en el párrafo anterior, la estrategia principal es no realizar una prueba para carryover y proceder como si estuviera ausente. Consideran que, como el periodo de depuración o lavado fue el adecuado y muy probablemente el carryover se eliminó D'Angelo *et al.*, 2003 lo confirma a través del estudio de p-valores obtenidos de estudios de BE bajo la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS).

Estos resultados son rebatidos en Putt (2005, 2006) con simulaciones que sugieren la falta de potencia de las pruebas asociadas a la distribución KS. Senn *et al.*, 2005, refuta los argumentos de Putt, con el argumento de la irrelevancia de los cálculos de potencia para poder interpretar sus datos. Estos análisis no son una prueba de la presencia ocasional del carryover, ni una prueba de su no-existencia.

Wellek, 2003, define un procedimiento para prueba de equivalencia para un carryover escalado y absoluto. Nuestras simulaciones sugieren que un diagnóstico interesante podría ser probar la insignificancia de un carryover relativo (complementario al estudio de ABE), es decir, realizar una prueba bajo la hipótesis nula de un efecto carryover que produzca una distorsión en contraste con la hipótesis de efecto carryover insignificante. Los resultados de la simulación muestran que una posible elección de los límites de equivalencia podrían estar cercanos al valor 0.1, aunque la búsqueda de los límites adecuado para establecer el procedimiento de prueba, requieren de una mayor investigación.

Tal como se ha explicado en la introducción, las regulaciones contemplan en ciertas circunstancias la sustitución de las pruebas de BE *in vivo* por pruebas realizadas *in vitro*, lo cual incluso podría ser una vía para evitar los evidentes problemas que puede tener el estudio de la BE *in vivo*.

La FDA ha adoptado el cálculo del factor de similitud f_2 como un método simple de comparación entre dos perfiles de disolución. Ya en la guía FDA, 1997a, se establecía como

metodología para procesos de escalamiento de formulaciones, cambios posteriores a su aprobación, aplicados a formulaciones de liberación inmediata orales solidas empleando al menos 12 formas de dosificación individual. En la guía FDA (2000) aparece como criterio para la bioexención de productos de alta solubilidad y permeabilidad.

Para la comunidad europea, EMEA (1999, 2001) juntamente con la Farmacopea Europea establecen varias directrices para perfiles de disolución sugieren que su comparación se puede efectuar a través del factor de similitud. Estas regulaciones en conjunto con su cálculo sencillo han permitido que en la actualidad esté ampliamente difundida su utilización. Aunque raramente se indique ningún intervalo de confianza como indicador de su precisión.

El factor de similitud, presenta una serie de problemas ya descritos en la literatura, uno de ellos es que no se conoce bien el verdadero sesgo de su estimación ni se acompaña de medidas de precisión como intervalos de confianza que den una perspectiva e información mayor de su cálculo. Por ello decidimos estudiarlo mas a fondo y buscar alguna aportación en este aspecto, es decir, proponer algunos métodos de corrección del sesgo e intervalos de confianza, con el artículo publicado en la revista *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* a partir de datos experimentales de Metoclopramida, fármaco antiemético ampliamente utilizado en la actualidad.

Los resultados de las simulaciones realizadas bajo diferentes metodologías no muestran claramente cual de los factores de similitud puede ser más relevante para ser utilizado, se descartan eso si aquellas alternativas corregidas por el sesgo. En particular cuando los valores calculados están alrededor del limite ($f_2=50$), sería muy apropiado que las propias regulaciones, incorporasen algunas recomendaciones en este sentido, es decir, permitir por ejemplo, la toma de decisión en base a intervalos de confianza.

Los resultados obtenidos bajo los diferentes estimadores utilizados están resumidos en la Tabla 14. Para los datos del perfil de Metoclopramida sin tensioactivo en relación a los de con tensioactivo, todos los estimadores alcanzaron valores muy similares, es decir, alrededor de 52. Todos estos valores nos permitirían declarar similitud entre los perfiles comparados. Pero se produce una contradicción en el hecho que los dos intervalos de confianza bootstrap unilaterales no están incluidos en el intervalo [50, 100]. El límite inferior del intervalo de confianza en el percentil 95% es de 49.20 y el valor correspondiente para el intervalo al 90% es de 49.4. El mismo valor para el intervalo BCa es de 49.30 y 49.87 respectivamente, por lo tanto estos valores cercanos a 52 no proporcionan una evidencia total de similitud y podemos observar por tanto que un criterio tan simple como $\hat{f}_2 > 50$, puede llevar a tomar una decisión equivocada acerca de la similitud. Las estimaciones del error estándar son concordantes para todos los métodos. El valor mas bajo de los estimadores del error estándar correspondió al intervalo bootstrap, de valor 1.46 y el más alto fue para el método Jackknife 1.59.

Si se asume una normalidad aproximada para \hat{f}_2 (supuesto inexacto), una medida rápida de la precisión de este estimador es $\hat{f}_2 \pm 1.96se_{\Delta} = 51.7091 \pm 1.96 \times 1.5508 = 51.7091 \pm 3.0396$ (y de forma similar para los otros estimadores del error estándar). Bajo condiciones semejantes esperadas, todos los estimadores de f_2 exceden el valor 80. La similitud se confirma por los intervalos bootstrap (límite inferior excede el valor 50 y el error estándar toma valores cercanos al 7 indicando una precisión muy baja).

Este incremento en la variabilidad es atribuible a las propiedades intrínsecas del factor de similitud muestral. Estos resultados también apuntan a un problema inherente de heterocedasticidad en diseños experimentales donde se estudió f_2 como una variable respuesta bajo diferentes condiciones experimentales.

Tabla 14: Valores del estadístico f_2 aplicados a los datos de Metoclopramida

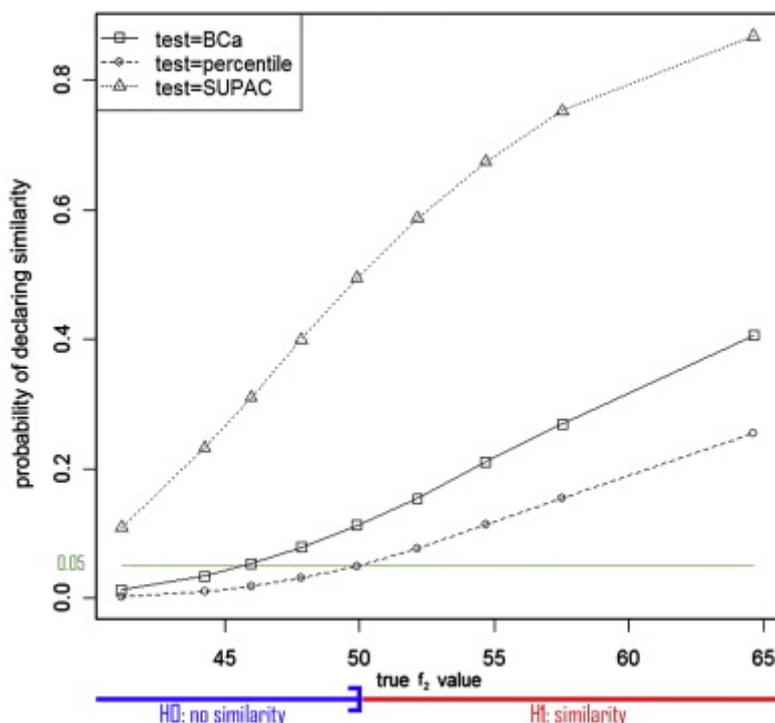
Nombre del factor calculado	Símbolo	Valor	
		^s /Tensioactivo vs. ^c /Tensioactivo	Series similares (estudio de robustez)
Factor de similitud muestral	\hat{f}_2	51.7091	80.6119
Factor de similitud corregido por el sesgo	\hat{f}_2^*	51.9023	82.8102
Factor de similitud alternativo corregido por el sesgo	$\hat{f}_{2,bc}$	51.6283	81.0988
Factor de similitud corregido por método Jackknife	$\hat{f}_{2,Jbc}$	51.7927	80.1016
Factor de similitud corregido por método Bootstrap	$\hat{f}_{2,Bbc}$	51.7894	80.4595
Factor de similitud corregido por método del estimador Delta para el error estándar de \hat{f}_2	se_Δ	1.5508	7.3338
Estimador Jackknife para el error estándar de \hat{f}_2	se_J	1.5938	7.5533
Estimador Bootstrap para el error estándar de \hat{f}_2	se_B	1.4549	6.5181
Límite inferior del percentil 95% bootstrap para el intervalo de confianza de una cola	L_p^α	49.2071 No es posible concluir similitud	70.6938 Se concluye similitud
Límite inferior del percentil 95% bootstrap BCa para el intervalo de confianza de una cola	L_{BCa}^α	49.2780 No es posible concluir similitud	71.0641 Se concluye similitud

La definición y las fórmulas calculadas y aplicadas dentro del estudio para el cálculo de los estimadores de los errores estándares de f_2 se pueden consultar en extenso y detalle dentro del mismo artículo.

Uno de los resultados más significativos de este estudio se refleja en la Figura 19, donde se grafica la probabilidad de declarar similitud o equivalencia entre perfiles de disolución (corresponde a la potencia de declarar similitud), por tres procedimientos: SUPAC, percentil Bootstrap y percentil Bootstrap BCa, en función del verdadero valor de f_2 , a nivel del significación del 5%.

El procedimiento SUPAC no controla de ninguna manera el error de tipo I, esto es, independiente del nivel nominal de significancia. Esto lo podemos ver en el siguiente ejemplo, cuando la similitud entre ambas formulaciones es 48, y la similitud no se puede llegar a concluir, la probabilidad de declararla es del 40%. Para el caso de la decisión de acuerdo al procedimiento percentil Bootstrap BCa, esta se desarrolla en forma mas adecuada, pero aun sigue siendo muy optimista en declarar similitud, por ejemplo, cuando el valor de f_2 es igual a 50 la probabilidad es 11% y no debería ser mayor del 5%. El procedimiento basado en el intervalo percentil Bootstrap es el único que se desarrolla en forma mas adecuada, en el sentido de ir conforme según el nivel de nominal de significancia.

Figura 19: **Curvas de potencia para los perfiles de disolución según SUPAC; BCa y percentil**



En otras palabras, el procedimiento de SUPAC en términos del riesgo para el consumidor (lo que corresponde al error del tipo I), de declarar falsamente la similitud y el riesgo del productor (en este caso el error del tipo II) de no declarar la similitud en una forma farmacéutica que realmente lo es, no controla el riesgo del consumidor y artificialmente disminuye el riesgo del productor. Los procedimientos de percentil y BCA son más elegibles para un criterio de decisión justa. El BCA no controla por completo el riesgo de los consumidores (es más alto que el nivel de significación nominal indicado, por ejemplo, 5%), pero proporciona un riesgo para el productor más aceptable que el método del percentil. Este último procedimiento es el más conservador, que controla estrictamente el riesgo para el consumidor, pero a expensas de un riesgo elevado del productor, por ejemplo, 60% para una similitud indudable con un valor verdadero de f_2 de 65.

Los resultados de las simulaciones son preliminares y deberían ser complementadas tomando en cuenta otras situaciones que ocurren en la realidad dentro de los estudios de perfiles de disolución.

Nuestras principales conclusiones apuntan hacia las siguientes reflexiones:

- Es necesario profundizar sobre las posibles mejoras que se puedan realizar al factor de similitud que hagan más eficiente su utilización.
- El uso del factor de similitud puede ser adecuado como variable de respuesta en estudios experimentales, aun a pesar de que su sesgo pueda distorsionar la optimización de sus conclusiones.
- No es recomendable tomar decisiones sobre la base del valor calculado de este índice, de acuerdo al valor límite de 50, en vez de ello, se podría considerar utilizar en forma adecuada intervalos de confianza del tipo percentil bootstrap basados en el principio de inclusión, a expensas de un riesgo del consumidor alto.

Estudiados estas dos formas de bioequivalencia *in vivo* e *in vitro*, y sus limitaciones se decidió integrar el factor farmacogenético buscando así alguna covariante como el genotipo para aumentar la potencia en particular con la técnica de la bioequivalencia *in vivo*. Así, comenzamos por estudiar los estudios farmacogenéticos e intentamos sistematizar y filtrar una gran cantidad de información creando una base de datos para su posterior análisis.

El número de estudios farmacogenético se ha ido incrementando especialmente en los últimos años y seguirá aumentando mucho más en el futuro. A causa de la creciente importancia que va tomando la investigación farmacogenética, debido a su baja replicabilidad y a que los reportes de resultados son inadecuados o pobres, hemos realizado una revisión sistemática para evaluar estos aspectos metodológicos.

Algunos autores han propuesto algunas explicaciones potenciales a la baja replicabilidad, como estratificación de la población, mala clasificación de la respuesta, heterogeneidad alélica. Otros indican directamente un diseño pobre, multiplicidad, y una mala interpretación de los resultados negativos.

Este estudio está centrado en el estudio de aspectos del diseño, análisis estadístico y el reporte de los resultados de 48 artículos preseleccionados de acuerdo a ciertos criterios de inclusión. Para ello se creó una base de datos con información de estos tres aspectos: diseño, análisis estadístico y reporte de resultados.

Respecto del diseño, en 34 de 48 artículos no se caracterizó el diseño del estudio, del resto el diseño mas frecuente fue el de “Caso-control prospectivo” (8), “Caso-control retrospectivo” (1) “Caso-control prospectivo aleatorizado”(1), “Caso-control anidado”(1), “Cohorte doble ciego”(1), Cohorte prospectiva” (1) y “Ensayo clínico controlado” (1).

Respecto del tamaño de muestra, ninguno de ellos reportó como se hizo el cálculo ni su planificación .El numero de pacientes tratados osciló en un rango de 54 a 946. La muestra efectiva fluctuó entre 36 a 884 sujetos (mediana =155), siendo de 200 o más en 17 de los 46 estudios y 300 o mas en sólo 6 de los 46 estudios.

La metodología estadística sólo se especificó en 4 de los 48 artículos revisados. Además, la prueba Chi-cuadrado de Pearson, fue la metodología más utilizada (con frecuencias genotípicas o alélicas), solo un articulo mencionó la Corrección de continuidad de Yates,

seguido del test de Fisher exacto. El reporte de las medidas de asociación como OR (Odds Ratio) o RR (Riesgo Relativo) fue muy poco frecuente, al igual que la Regresión logística y referido a la mención de la estadística de prueba apenas la encontramos en dos artículos (prueba de Wald).

El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó en solo 19 de 30 artículos, para dar validez a los análisis posteriores de alelos. En 34 artículos se calculó pero algunos de ellos no analizaban frecuencias alélicas. Los resultados de la prueba de HWE solo se reportaron en forma correcta en 3 de 30 artículos a través de los análisis alélicos correspondientes.

La multiplicidad fue uno de los problemas mas frecuentes, se encontró en 32 artículos. La Tabla 15, lista las fuentes de multiplicidad que se identificaron y sus frecuencias.

Tabla 15: Fuentes de Multiplicidad

Fuentes de multiplicidad	Nº de artículos
Análisis de múltiples asociaciones	32
Análisis de frecuencias genotípicas y alélicas	32
<i>Cualquiera de las fuentes de multiplicidad previas</i>	46
Métodos múltiples de análisis para frecuencias genotípicas.	17
Métodos múltiples de análisis para frecuencias alélicas	9
<i>Cualquiera de las fuentes de multiplicidad previas</i>	47

Debido a la relevancia clínica de este tipo de estudios, y los resultados de la revisión realizada, se ha puesto de relieve, la necesidad de elevar el nivel de la investigación farmacológica. Existen ya recomendaciones generales (Bromley *et al.*, 2009; Need *et al.*, 2005). Nuestro estudio confirma y da validez a muchas de las cuestiones estudiadas en Bromley *et al.*, 2009, sobre la calidad de los estudios. Hay normas más específicas en el estilo de la CONSORT STROBE, STREGA (que corresponde a una extensión de la declaración STROBE) (Moher *et al.*, 2001; Vanderbroucke *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2009) que sería sin duda muy valioso de recuperarlas y en conjunto revisar algunos tópicos de la red EQUATOR, de creación relativamente reciente cuyo objetivo principal es trabajar en la calidad de los estudios (Altman *et al.*, 2008).

5.- Resum en català

1.- Introducció

La incorporació en el mercat farmacèutic dels anomenats medicaments genèrics, ha generat una problemàtica complexa que afecta un gran rang d'entitats començant per l'àmbit de la salut pública fins arribar a la pròpia indústria farmacèutica.

Quan el període de patent d'un fàrmac està a prop d'expirar, el laboratori farmacèutic que va desenvolupar la marca registrada d'aquest producte comunament designat com "innovador" o de "referència" (R) pot intentar desenvolupar una nova formulació o forma farmacèutica, amb el mateix principi actiu per estendre la seva marca d'exclusivitat. Paral·lelament, altres laboratoris poden intentar desenvolupar marques genèriques que contenen el mateix principi actiu que el producte innovador, formulació de prova (P).

Un tractament efectuat amb un genèric té un cost indubtablement inferior a un medicament de marca (el mateix principi actiu i forma farmacèutica), i aquesta diferència la causa principalment que el medicament de marca reflecteix el cost de la gran inversió d'I+D (estudis clínics d'eficàcia i seguretat) que en el medicament genèric no cal. Per poder realitzar una comparació d'aquests dos tipus de medicaments i investigar si són intercanviables es recorre a la "biodisponibilitat" (BD) i a la "bioequivalència mitjana" (BE). (Zapater *et al.*, 1999).

La biodisponibilitat (BA) i bioequivalència (BE) es defineixen com:

- Per a la FDA, (2003), la BD es defineix com "la velocitat i extensió a la qual l'ingredient actiu o entitat s'absorbeix des d'una formulació i arriba a estar disponible al lloc d'acció. Per formulacions que no s'absorbissin en el flux sanguini, la biodisponibilitat es podria avaluar mitjançant mesures que reflectissin la velocitat i l'extensió en la qual l'ingredient actiu o entitat està disponible al lloc d'acció". L'EMEA, (2001) considera un element addicional i específic "que s'entén que l'extensió i la velocitat d'una substància activa o la seva entitat és alliberada des d'una forma farmacèutica i arriba a estar disponible a la circulació".
- La bioequivalència (BE) és un terme utilitzat per la comparació de dues o més formulacions basades en la velocitat i magnitud de l'absorció. Per a la FDA (2003) i l'EMEA (2001), "dos productes medicinals són bioequivalents si són equivalents farmacèutics o alternatives farmacèutiques i la seva biodisponibilitat després de l'administració en la mateixa dosi molar és similar en els seus efectes pel que fa a l'eficiència i seguretat, les quals han de ser les mateixes".

1.1.- El rol de l'Farmacocinètica i paràmetres farmacocinètics en bioequivalència

La farmacocinètica juga un rol molt important en la biodisponibilitat. Estudia els processos als quals un fàrmac és sotmès a través del seu pas per l'organisme. El seu objectiu principal és comprendre que ocorre amb un medicament des del moment en el que és administrat fins la seva total eliminació de l'organisme. Per això, utilitza models matemàtics per caracteritzar i estimar paràmetres clínics rellevants associats a l'absorció, distribució, metabolisme i eliminació de la droga.

Amb les dades ajustades al model adequat es procedeix al càlcul dels paràmetres farmacocinètics, els que s'utilitzaran en l'estudi de la bioequivalència. Hi ha dos paràmetres, fonamentals per a l'anàlisi de la BE: l'àrea sota la corba i la concentració màxima. L'àrea sota la corba és un molt bon indicador de la quantitat de droga absorbida (FDA, 2003; Shah *et al.*,

1996) i la concentració màxima que és un indicador de la velocitat d'absorció amb què la droga arriba al lloc de acció.

Hi ha altres paràmetres farmacocinètics que ens lliuren diversa informació, tots ells importants per a la caracterització cinètica de la droga a partir de la primera etapa del metabolisme, que es caracteritza per l'alliberament, l'absorció, la distribució, el metabolisme (biotransformació) i l'eliminació (procés anomenat LADME).

Un problema important està en el paràmetre indicador de la velocitat d'absorció. Tradicionalment $T_{m\grave{a}x}$ i $C_{m\grave{a}x}$ representen en part aquest fenomen, però, $T_{m\grave{a}x}$ té el gran desavantatge de la seva alta dependència de la freqüència de mostreig i $C_{m\grave{a}x}$ és una mesura mixta que no només representa a la velocitat d'absorció sinó també l'extensió o quantitat de droga absorbida. Malgrat aquest inconvenient, en conjunt proporcionen informació clínica molt important en termes de la velocitat d'absorció (Tothfalusi *et al.*, 2001).

Finalment, aquests paràmetres accentuen els seus problemes en drogues d'alta variabilitat. En aquest cas hi ha una sèrie de recomanacions de mesures alternatives que permeten avaluar de forma més adient la velocitat, però encara són objecte d'opinions controvertides que examinarem amb deteniment per veure'n el comportament amb dades reals, pel cas d'una droga de molt alta variabilitat, la Furosemida.

La importància de la Farmacocinètica, la Farmacodinàmia i en especial d'alguns paràmetres farmacocinètics fou abordada en l'article de la revista International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, on es mostra un estudi comparatiu de bioequivalència mitjana.

1.2.- Proves de bioequivalència, establint el problema

La BE és un concepte complex i multidimensional. La hipòtesi fonamental que hi ha darrere els estudis d'ABE és que, la droga o principi actiu està en la mateixa quantitat en les dues formulacions que estan sota comparació i que el seu efecte terapèutic depèn principalment de la seva concentració en el lloc d'acció i que hauria de ser similar en totes les formulacions comparades.

La manera de plantejar les hipòtesis en els estudis clínics clàssics no és la més adequada per a la bioequivalència (Zapater *et al.*, 1999). Si es plantegés de la forma tradicional, i s'utilitzés un valor arbitrari de l'error de tipus I (probabilitat de rebutjar H_0 quan és certa), usualment prefixat en $\alpha = 0.05$ com a criteri de rebuig o no rebuig i considerant un valor de potència també prefixat en forma arbitrària a 0.80 (valor utilitzat per al càlcul de la mida mostral), la prova no permetria detectar diferències en almenys 20 de cada 100 comparacions. Per això es planteja una estratègia diferent, és a dir, es busca rebutjar la hipòtesi de No bioequivalència al nivell nominal del 5% a favor de la hipòtesi alternativa de bioequivalència.

En la presa de decisió es poden plantejar dos errors possibles:

- Error del Tipus I, que implica declarar bioequivalència quan efectivament les formulacions comparades no ho són.
- Error del Tipus 2, que implica no poder declarar bioequivalència quan en realitat si ho són.

D'aquests dos tipus d'errors el menys acceptable és el del Tipus I o “Risc Sanitari” o “del consumidor”, és a dir, declarar bioequivalència quan realment no n'hi ha. S'admet una probabilitat no major al 5% per a l'ocurrència d'aquest error. D'aquí que la prova d'hipòtesis es construeixi sota la hipòtesi nul·la de no BE. L'error del tipus II o risc de l'espònsor (productor o patrocinador), és no poder declarar BE quan en realitat sí que n'hi ha.

El plantejament d'hipòtesis en termes d'equivalència, permet realitzar nombroses aplicacions en diferents àmbits de recerca, que són examinats en detall en l'article de la revista SORT. Aquest article, revisa a fons el concepte d'equivalència associat a alguns exemples d'aplicació destacant el de bioequivalència aplicat a una droga de variabilitat alta.

1.3.- Límits o Criteris de bioequivalència

En l'actualitat, les principals agències del medicament, incloses lògicament la FDA i l'EMA, estableixen que per avaluar l'ABE (bioequivalència mitjana), s'ha de realitzar la comparació entre una formulació estàndard o de referència i una altra formulació de prova. Si la ratio de mitjanes geomètriques (GMR) de les mesures de biodisponibilitat de les dues formulacions (Prova/Referència) comparades cau dins d'uns límits preestablerts - 80/125% - la formulació de prova pot ser considerada com bioequivalent respecte a la formulació de referència.

Per al cas de drogues d'alta variabilitat, les agències reguladores permeten l'ampliació dels límits. La literatura, dona compte d'altres mètodes per escalar aquests límits.

La importància de l'ampliació de límits i de criteris per establir la ABE, es considera en detall en l'article de la revista *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, on es mostra un estudi comparatiu de ABE aplicats a dades reals (vegeu l'apartat 7 de Publicacions). Es discuteixen algunes propostes de les agències del medicament i altres innovadores (fins ara no avaluades amb dades reals) per al cas de medicaments o productes d'alta variabilitat.

1.4.- Carryover en bioequivalència

El disseny requerit per la majoria d'agències regulatòries per realitzar un estudi de bioequivalència correspon a un disseny creuat de 2x2 (dos períodes, dues seqüències). Cada voluntari se'n assigna a l'atzar a la seqüència 1 o 2. Els voluntaris de la seqüència 1, reben primer la formulació de referència i en el segon període la formulació de prova. En la seqüència 2, els voluntaris en el primer període reben la formulació de prova i en el segon període reben la formulació de referència.

Els dos períodes estan separats per un temps de depuració suficient que en teoria permet la total eliminació del fàrmac o metabòlits administrats durant el primer període. Aquest disseny té alguns avantatges com:

- Cada individu serveix com el seu propi control, és a dir, permet la comparació de les dues formulacions en el mateix individu.
- Quan es comparen ambdues formulacions, la variabilitat interindividual és mínima.
- Es requereixen menys individus que en un estudi en paral·lel per obtenir la mateixa potència.

Aquest disseny, però, presenta alguns inconvenients que convé tenir en compte:

a. - Efecte Carryover en estudis de BE, possible persistència en el període següent del fàrmac administrat anteriorment (Senn, 2002). Produït principalment per un temps de depuració inadequat, pot estar també associat a altres factors. Aquest efecte és molt import en els altres efectes i en l'impacte que té en el resultat final d'un estudi de BE, si és que està present.

b. - Efecte Formulació: Es refereix a l'efecte (Zapater *et al.*, 1999) trobat després d'efectuar la mesura d'un paràmetre fàrmacocinètic a cada voluntari immediatament de l'administració de la formulació de prova i la formulació de referència. No té el sentit de comparar en si mateix a les dues formulacions.

c. - Efecte Seqüència: Es refereix a les diferències trobades segons l'ordre d'administració de les formulacions que es comparen. Si aquest efecte és significatiu (Zanen, 2009), es podria suposar que hi ha un efecte carryover present o un efecte de la interacció entre tractament i període. Aquests dos efectes es confonen i és difícil reconèixer-los amb certesa. En certes circumstàncies l'efecte seqüència significatiu es pot ignorar si: (i) L'estudi es realitza sota el règim de dosi única, (ii) L'estudi s'executa en voluntaris sans, (iii) No s'hagi realitzat la comparació en substàncies endògenes, (iv) L'estudi compta amb un període de depuració adequat, (v) S'utilitzi un disseny i una anàlisi apropiada.

d. - Efecte Període, és l'efecte present entre els resultats obtinguts en el primer període i segon període d'estudi en el disseny. Si està present (Zapater *et al.*, 1999), pot indicar algun problema en el desenvolupament de l'estudi: problemes de maneig, anàlisi i emmagatzematge de la mostra, diferències climàtiques, dietètiques, activitat física o altres.

Per Zanen (2009), si hi ha diferències significatives, podria ser degut al fet que en un dels dos períodes, els nivells plasmàtics ($C_{m\grave{a}x}$ i ABC) són majors o menors que en l'altre. Hi ha altres causes, una de freqüent pot ser el consum per part dels voluntaris de suc d'aranja en comptes d'aigua (que inhibeix el metabolisme d'algunes drogues, i incrementa els nivells en ambdues seqüències). Aquest no és un problema del carryover, a més l'efecte és igual a les dues seqüències i no és detectable utilitzant les proves per carryover.

Hi ha encara discrepàncies sobre el significat de la presència d'un efecte període i la seva causa. Alguns argumenten que si tots dos tractaments són afectats en la mateixa manera, no hi ha canvis (diferències iguals) i la comparació continua sent vàlida entre els tractaments. En tot cas, el supòsit bàsic que ambdós tractaments són igualment afectats s'ha de provar, la qual cosa pot arribar a ser difícil.

De tots aquests efectes que han de ser avaluats a l'inici de l'estudi de BE, el més important és l'efecte carryover. Si es detecta en l'estudi:

- Invalida l'anàlisi, ja que condiciona el càlcul de l'efecte formulació i període.
- Bloqueja l'ús de la conclusió d'un estudi de BE.

En l'actualitat l'efecte carryover no està exempt de controvèrsies, alguns investigadors indiquen que la probabilitat que es presenti en un estudi de BE ben planificat és molt baixa, altres però, indiquen que aquesta probabilitat no és tan baixa i es discuteixen diferents formes de plantejar l'avaluació de la seva presència.

En l'article enviat a la revista *Pharmaceutical Statistics* (vegeu l'apartat 7 de Publicacions), s'estudia l'efecte de la variabilitat i carryover en estudis de ABE, a través de simulacions realitzades sota el disseny creuat 2x2. Es va analitzar combinacions d'efecte carryover, variabilitat, efecte formulació i mida de mostra, aplicats a diversos tipus d'interval de confiança descrits a la literatura: l'interval clàssic "shortest", Westlake, Hsu *et al.* simètric i Hsu *et al.* no simètric (específic), a través del % d'aprovació de la declaració de ABE, recobriment i precisió de l'interval.

1.5.- Drogues d'alta variabilitat

Les drogues d'alta variabilitat es caracteritzen per una gran variació intrasubjecte (Tothfalusi *et al.*, 2001) i fan difícil l'avaluació de la bioequivalència.

Totes aquelles drogues o productes els paràmetres farmacocinètics de les quals exhibeixen una variabilitat intrasubjecte superior a un coeficient de variació-ANOVA del 30% s'anomenen "drogues d'alta variabilitat" (Blume *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1996; Midha *et al.* 1997-2006).

Convé distingir dues situacions (Midha *et al.*, 2005):

- Les drogues d'alta variabilitat presenten una variabilitat intrasubjecte igual o superior al 30% ja sigui de les àrees sota la corba i/o concentració màxima.
- Els productes d'alta variabilitat, són aquelles formulacions d'escassa qualitat que presenten una variabilitat intra-formulació alta (per exemple, variabilitat alta entre unitats de dosificació) i que constitueixen també un problema d'alta variabilitat, que igualment ha de ser resolt.

Aquesta problemàtica s'examina en l'article enviat a la revista *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, on es consideren les diferents opcions descrites a la literatura per abordar la problemàtica de les drogues d'alta variabilitat i s'apliquen a dades reals d'una droga d'alta variabilitat. S'analitzen altres metodologies recentment publicades, s'agreguen a l'anàlisi d'algunes característiques farmacocinètiques i farmacodinàmiques que enriqueixen la discussió. També es pot revisar l'article de la revista SORT que complementa la base teòrica d'aquestes anàlisis..

1.6.- Mida de la mostra en bioequivalència

La mida de mostra que recullen les dues principals agències del medicament: FDA, 2001 i EMEA, 2001, és d'un mínim de 12 voluntaris, per un estudi de BE.

En l'actualitat, una gran majoria d'estudis de BE fluctuen entre els 24 a 36 voluntaris sans, molt pocs si els comparem en relació als milers de pacients que es podrien arribar a necessitar per dur a terme els estudis clínics en pacients.

En l'article de la revista SORT es revisen algunes consideracions d'ordre conceptual i en l'article de la revista *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, s'analitza l'impacte de la grandària de mostra en un estudi de ABE, a través de simulacions considerant l'absència i presència de l'efecte carryover en les propietats dels intervals de confiança que es construeixen per a l'avaluació de la BE.

1.7.- Perfils de dissolució *in vitro*, factor de similitud i bioequivalència

L'absorció d'un principi actiu (FDA, 1997) depèn de l'alliberament des de la forma farmacèutica que s'ha administrat, la dissolució o solubilització de la droga/principi actiu sota condicions fisiològiques i de permeabilitat a través de la membrana gastrointestinal. Aquestes característiques permeten que la dissolució *in vitro* sigui molt rellevant per predir com serà el comportament *in vivo*.

Aquestes consideracions permeten que les proves de dissolució *in vitro* per a formulacions orals d'alliberació immediata siguin fonamentals per a: (i) avaluar la qualitat lot a lot, (ii) com a eina de desenvolupament de noves formulacions i, (iii) per assegurar la qualitat del producte després de certs canvis: de formulació (component i composició), de procés de manufactura (equipament i procés), de lloc de la manufactura i el escalament del procés de manufactura.

El perfil de dissolució *in vitro* s'obté de dades de lots que han estat utilitzats en estudis clínics, de biodisponibilitat o realitzats durant el període de desenvolupament del producte o formulació. Permeten generar una gràfica del percentatge dissolt vs. el temps.

La comparació de perfils de dissolució (Shah *et al.*, 1998), s'ha enfocat en la literatura mitjançant diferents mètodes. En l'actualitat s'utilitza majoritàriament el mètode proposat per Moore *et al.*, 1996, que defineix dos índexs matemàtics independents de tot model, anomenats Factor d' semblança o f_2 i Factor de disimilaridad o f_1 . Dels dos factors, el factor de semblança, f_2 , és el mètode escollit habitualment per la comparació de perfils de dissolució.

Una altra relació d'importància en l'àmbit d'aplicació dels perfils de dissolució, és l'anomenat Sistema de Classificació Biofarmacèutica (BCS), proposat com una forma de correlacionar la dissolució *in vitro* d'una droga amb la biodisponibilitat *in vivo*, a través del reconeixement de que la dissolució d'una droga juntament amb la permeabilitat gastrointestinal són paràmetres fonamentals que controlen la velocitat i l'extensió de l'absorció d'una droga (coneixement vital per un estudi de bioequivalència). Aquest sistema utilitza un model humà de transport i permeabilitat per a l'estimació de l'absorció *in vivo* de la droga, que té en compte la importància primària de la solubilitat i la permeabilitat en l'absorció oral d'una droga.

D'acord a aquest sistema BCS, les drogues es podrien classificar d'acord a la seva solubilitat aquosa i permeabilitat intestinal en quatre classes:

- I Alta solubilitat i Alta permeabilitat.
- II Baixa solubilitat i Alta permeabilitat.
- III Alta solubilitat i Baixa permeabilitat.
- IV Baixa Solubilitat i Baixa permeabilitat.

La correlació IVIV és un model matemàtic predictiu (FDA, 1997b) que descriu la relació entre un propietat *in vitro* d'una dosi oral (habitualment la velocitat o extensió de la dissolució de la droga o alliberament) i una resposta *in vivo* important (per exemple, la concentració plasmàtica o quantitat de droga absorbida).

Una aplicació es troba en formes farmacèutiques d'alliberació modificada. Si es canvia un excipient que controla l'alliberament en la formulació, hauria d'estar dins del rang establert per la correlació. Si s'ha establert una correlació *in vitro/in vivo* es podria desenvolupar només una prova de dissolució a efectes de comparació. A més, amb aquesta correlació ja establerta, es

pot aplicar també als quatre nivells de post-canvi o escalat que estan considerats en la guia de FDA, (1997a).

Els factors analitzats en forma conjunta que permetrien decidir o no la bioexenció d'un estudi de BE *in vivo*, corresponen al sistema de classificació Biofarmacèutica de la droga estudiada, el perfil de dissolució, perfil de concentració plasmàtica i la presència o no de correlació *in vitro/in vivo*.

En l'article acceptat a Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, es desenvolupen diversos índexs amb el seu corresponent interval de confiança associats a f_2 . Es busca estudiar el comportament de tots aquests índexs i quin d'ells pot resoldre millor les limitacions de l'índex original. Es va realitzar a partir de dades reals de perfils de dissolució de metoclopramida i de simulacions. S'han analitzat algunes consideracions de la bioequivalència amb el factor de similitud associats al sistema de classificació Biofarmacèutica.

2.- El rol de la Farmacogenètica en la bioequivalència.

La farmacogenètica (Nussbaum *et al.*, 2008) és rellevant per conèixer la variació interindividual en la resposta a medicaments a través de dos processos: la farmacocinètica (estudia la velocitat amb què l'organisme absorbeix, transporta, metabolitza o elimina els fàrmacs) i la farmacodinàmia (estudia els efectes bioquímics i fisiològics dels fàrmacs, els seus mecanismes d'acció i la relació entre la concentració del fàrmac i el seu efecte sobre un organisme (és a dir, en receptors, enzims o vies metabòliques).

Aquests dos processos compleixen un rol fonamental per conèixer el pas d'un medicament per l'organisme. De vegades, hi ha algunes característiques pròpies del subjecte que fan que aquest pas estigui alterat, la qual cosa genera en ell respostes molt diferents a les esperades. És aquí on la farmacogenètica juga un rol primordial que permet complementar el coneixement d'aquest pas per l'organisme incloent les característiques genètiques a l'anàlisi d'aquestes respostes diferents.

La farmacogenètica (Evans *et al.*, 2003; Brockmøller *et al.*, 2008; Roses, 2000; Weinshilboum, 2003), es relaciona amb l'estudi del paper de l'herència, diferències o factors genètics, que influencien la variabilitat individual de la resposta als fàrmacs. Un altre terme mal utilitzat s'utilitza per referir-se a la mateixa problemàtica, la farmacogenòmica, però, aquesta disciplina (Ruiz-Canela, 2005) fa referència a l'estudi sistemàtic de tot el genoma i els seus productes en relació amb els procediments de disseny, descobriment i desenvolupament de medicaments. També es relaciona amb la identificació de noves dianes terapèutiques mitjançant eines genòmiques.

La farmacogenòmica i la farmacogenètica estan molt lligades i el seu desenvolupament ha permès impulsar l'anomenada medicina individualitzada, l'objectiu de la qual és que cada pacient rebi un tractament farmacològic més segur i eficaç d'acord amb el seu perfil genètic.

Els principals beneficis de la farmacogenètica (Nuffield Council, 2003) són:

a. Millorar la seguretat: Alguns fàrmacs tenen efectes adversos que poden arribar fins i tot a la mort. Si es troba una variant al·lèlica que estigui associada amb un efecte advers per a un cert fàrmac, els metges haurien d'evitar prescriure'l a aquells pacients amb aquesta variant genètica.

- b. Ajustar la dosi: La informació genètica es pot utilitzar per a ajustar la dosi d'un fàrmac, reduint l'assaig/error usat per determinar la dosi adequada.
- c. Augmentar l'eficàcia: Molts fàrmacs no són efectius per una certa malaltia en certs individus. Alguns polimorfismes de nucleòtid únic, s'han associat a canvis substancials tant en el metabolisme com en l'efecte dels fàrmacs. En aquest sentit, avui en dia estan sent utilitzats per predir la resposta clínica.

A continuació es revisaran alguns polimorfismes genètics que influeixen en la disponibilitat de les drogues.

2.1.- Metabolisme de les drogues

Hi ha més de 30 famílies d'enzims metabolitzats en humans, essencialment totes elles amb variants genètiques. Dins d'elles, un dels grups més importants està representat per la família del citocrom P 450 (CYP). Alguns medicaments interactuen només amb un dels enzims del citocrom P 450, mentre que d'altres ho fan amb dos o més isoenzims. Entre d'altres enzims, n'hi ha que activen o desactiven medicaments, com la Tio Purina Metil transferasa (TpMT).

2.1.1 - Enzims metabolizadoras de drogues

Un dels enzims més importants per al metabolisme dels fàrmacs (Shastry, 2006), és el citocrom P 450. Els enzims del CYP, s'agrupen (Nussbaum *et al.*, 2008), en 20 famílies, d'acord a la seqüència dels aminoàcids. Tres d'aquestes famílies: CYP1, CYP2 i CYP3, són les més "promíscues" respecte dels substrats on actuen i perquè participen en una àmplia gamma de substàncies que no pertanyen a l'organisme (els anomenats xenobiòtics), incloent-hi els medicaments.

2.1.2.- Transportadors de drogues

Els transportadors de drogues tenen un paper molt important en la regulació de l'absorció, distribució i excreció de molts fàrmacs (Evans *et al.*, 2003; Marzolini *et al.*, 2004; Fromm, 2002). Entre els transportadors de drogues més extensament estudiats hi ha: i) els membres de la família de Transportadors ABC (d'adenosina trifosfata (ATP) binding cassette) i ii) la glicoproteïna P, codificada pel gen humà ABCB1 anomenat també MDR1 (multi-resistència a drogues).

La proteïna MDR-1 serveix com transportador per extreure nombrosos medicaments de la cèl·lula: i) una sobreexpressió del MDR-1 es pot associar amb una major resistència a algun fàrmac, ii) nivells baixos de MDR-1 alteren la distribució dels medicaments que resulta en una major incidència de toxicitat.

La principal funció de la glicoproteïna P, és el flux cel·lular (dependent de l'energia) de substrats com la bilirubina, algunes drogues anti-cancerígenes, Glucòsid cardíacs, immunosupressors, glucocorticoides, inhibidors de la proteasa tipus 1 del virus de la immunodeficiència adquirida, etc . La seva expressió en molts teixits suggereix que té un rol en l'excreció de xenobiòtics i metabòlits en l'orina, bilis i lumen intestinal. La seva localització juntament amb l'enzim CYP 3A4, en l'intestí prim i el fetge, apunta que aquest transportador juga un rol significatiu en la disponibilitat oral, distribució i excreció de fàrmacs.

2.2 .- Polimorfismes Genètics dels blancs dels fàrmacs (drug target)

Variacions genètiques en els blancs dels fàrmacs, per exemple, els receptors, tenen un efecte profund en l'eficàcia dels fàrmacs. Hi ha algunes diferències genètiques (Evans *et al.*, 2003) que tenen efectes indirectes sobre la resposta a drogues i que no estan relacionades ni amb el metabolisme de les drogues ni amb el transport. Un exemple, és l'eficiència disminuïda de la reparació de l'ADN.

2.3 .- Polimorfismes genètics amb efectes indirectes en la resposta de fàrmacs

Hi ha polimorfismes en proteïnes (Evans *et al.*, 2003) codificats per gens no directament relacionats amb el blanc dels fàrmacs ni amb la seva disponibilitat que alteren la resposta al tractament en certes situacions. Altres polimorfismes d'aquest tipus són les variacions genètiques en transportadors cel·lulars iònics amb un rol indirecte en la predisposició de pacients als efectes tòxics de fàrmacs.

2.4 .- Algunes consideracions estadístiques

Els estudis de farmacogenètica tenen de base inicial els dissenys epidemiològics clàssics, però, hi ha algunes particularitats que fan que no tots els dissenys siguin adequats. Un punt de partida és conèixer les metodologies clàssiques dels estudis d'associació genètics examinats en profunditat en Cordell *et al.*, 2005. La definició pròpia de la farmacogenètica fa que aquests estudis siguin una mica diferents:

- La reacció individual a una droga pot estar influenciada per trets genètics que afecten l'absorció, la biodistribució, l'excreció, i els efectes fisiològics.
- La prova genètica per polimorfismes específics involucrats en el metabolisme de la droga ofereix grans possibilitats d'evitar efectes adversos i d'adaptar els tractaments a les necessitats individuals.
- S'espera que les proves de farmacogenètica s'utilitzin cada vegada més com un component habitual en la presa de decisions mèdiques.

Diversos temes examinats en la revisió d'articles toquen tres aspectes fonamentals en el desenvolupament de qualsevol estudi clínic relacionats amb la qualitat:

- El disseny.
- Els mètodes estadístics aplicats.
- L'informe dels resultats.

La qualitat de la recerca en l'àrea dels estudis clínics ha generat moltes revisions, on es conclou que la informació que es proporciona és insuficient, inadequada i en forma recurrent amb errors metodològics. Com a conseqüència a aquesta situació, s'han publicat alguns referents per millorar la qualitat del disseny, anàlisi i informe dels estudis clínics, en especial una extensió de la declaració STROBE, recentment publicada anomenada STREGA (Little *et al.*, 2009).

Dins l'àmbit específic de la farmacogenètica, hi ha una sèrie de consideracions (Schork *et al.*, 2001) que cal tenir en compte per al maneig eficient dels estudis en aquesta àrea. Entre les principals podem esmentar:

a.- Eficàcia i resposta augmentada versus efectes adversos: L'eficàcia i la resposta augmentada és molt més probable que s'avalui sobre escales o mètriques quantitatives mentre que les reaccions adverses freqüentment s'avaluen qualitativament. Hi ha algunes reaccions adverses que són molt rares i poden reflectir etiologies idiopàtiques o heterogènies difícils de dilucidar. L'anàlisi genètic de reaccions adverses ha d'anar acompanyat d'altres mesures covariants per fer la millor interpretació dels resultats obtinguts.

b.- Respostes quantitatives versus respostes qualitatives: Hi ha respostes a medicaments valuades en forma quantitativa (per exemple, la reducció de tensió o colesterol) o de vegades en forma qualitativa (morbidity o mort), que corresponen al punt final avaluat d'interès. Aquí l'elecció del fenotip serà crucial per planificar les anàlisis més adequades.

c. - Avaluació fenotípica i definició: Abans d'iniciar un estudi referit a un determinat fenotip, s'ha de considerar prèviament l'avaluació de l'evidència del factor genètic que influeix en el fenotip en qüestió. Això es fa sovint per la via de l'anàlisi de segregació i herència en la qual participen individus relacionats. La majoria dels assaigs clínics no consideren dins la mostra a individus relacionats, per poder generalitzar els resultats a la població en general. Per tal d'obtenir conclusions sobre la probabilitat dels factors genètics que influeixen en els resultats d'un assaig clínic, es podria considerar les propietats de la distribució dels resultats. Aquest resultat podria informar de la potència i del requeriment de les mides de mostra.

d.- Mostreig secundari òptim per estudis farmacogenètica: Seria adequat aplicar estratègies òptimes per determinar el genotip dels individus en grans assaigs clínics per a l'anàlisi de la farmacogenètica. Aquestes estratègies probablement s'aplicaran després que els assaigs es facin, de manera que els resultats poden ser recopilades i proporcionar més informació sobre els efectes genètics.

Una forma tradicional de maximitzar l'eficiència estadística de l'estudi és identificar individus que puguin contribuir amb informació rellevant a la hipòtesi de l'estudi. La identificació d'individus amb un fenotip "extrem" ha estat una aproximació d'elecció durant algun temps per estadístics genètics i epidemiòlegs genètics. Utilitzar aquesta estratègia en l'anàlisi d'un locus individual és senzill si es coneix l'efecte genètic del locus estudiat.

e.- Equilibri de Hardy Weinberg: Aquesta relació matemàtica permet el càlcul de les freqüències genotípiques a partir de dades de freqüència al·lèlica, basant-se en: (i) la relació senzilla entre freqüències genotípiques i fenotípiques en una població i, (ii) que la freqüència al·lèlica no canvia de generació en generació. És molt important considerar: (i) la seva comprovació prèvia a l'aplicació dels mètodes estadístics propis de l'estudi i (ii) reportar adequadament el resultat (informar de poblacions a les quals es va aplicar, resultats i valor de la probabilitat associada).

2.5.- Algunes consideracions ètiques

L'aspecte ètic de la farmacogenètica (Khoury, 2006; Comissió Europea. EUR 21120: 25; 11; Nuffield Council, 2003), és un altre tema de gran importància, considerant que encara no hi ha una normativa específica que reguli els estudis farmacogenètica. El que s'ha fet és tenir de base la normativa sobre investigació biomèdica en éssers humans (la declaració de Hèlsinki i el conveni d'Oviedo, el reial decret 223/2004 i les normes de la bona pràctica clínica) en les que es poden resumir els quatre principis ètics més àmpliament acceptats:

- Respecte a les persones (autonomia i protecció del qual no la posseeix, obtenció del consentiment informat).
- Beneficiar, és a dir, augmentar al màxim els beneficis i reduir al mínim els riscos.
- No "maleficència" a les persones, és a dir, no fer mal.
- Justícia, és a dir, distribuir amb equitat els beneficis i riscos de la recerca a través de la definició acurada dels criteris d'inclusió i exclusió.

La mostra biològica humana que conté material genètic presenta una característica que la fa molt diferent d'altres tipus de mostra (Nuffield Council, 2003) de les quals les més rellevants són:

- El material genètic és únic per a cada individu i no canvia amb el temps, això es tradueix en que el pacient pot ser potencialment identificable.
- Com l'ADN és estable, pot ser susceptible de múltiples investigacions futures, algunes no necessàriament relacionades amb l'objectiu per als quals es va obtenir.
- En aquestes mostres per a estudis farmacogenètica es poden obtenir dades, buscades o no buscades, que serveixin per predir malalties que el pacient no vulgui conèixer.
- Part del material genètic és comú per a pares i germans, les troballes poden tenir implicacions per als familiars del subjecte o pacient, amb els quals es podrien sobrepassar els problemes ètics individuals.

Pels estudis de farmacogenètica les mostres obtingudes poden ser:

- obtingudes en la pràctica mèdica habitual o en processos diagnòstics (biòpsies, sang), terapèutics (òrgans i teixits extirpats), conservats en bancs de mostres en els serveis d'Anatomia Patològica o Anàlisi Clínics.
- obtingudes específicament per a projectes de recerca, (assaigs clínics o estudis epidemiològics observacionals), que habitualment es mantenen emmagatzemades després d'acabar el projecte per al qual es van obtenir.

En base a l'anterior, es percep que els problemes ètics de les mostres que contenen ADN són majors que la d'una mostra biològica i per això hi ha dos tipus de procediments importants per solucionar aquests problemes:

- El projecte ha d'estar valorat sempre per un Comitè Ètic d'Investigació Clínica abans de dur-lo a terme.
- Sempre s'ha de demanar el consentiment informat per a l'obtenció de les mostres biològiques humanes i / o per a la recerca de les mateixes.

2.6 .- Els reptes per al futur

Dins els desafiaments futurs és possible delinear alguns camps en els quals encara queda força per fer:

En el coneixement científic:

- Aprofitar efectivament el coneixement científic, per saber com els gens afecten la resposta als fàrmacs.
- Desenvolupar els beneficis potencials de la farmacogenètica destacant els de millorar la seguretat, ajustar la millor dosi i augmentar l'eficàcia dels fàrmacs.

En la recerca i desenvolupament de nous fàrmacs:

- Potenciació del desenvolupament de nous fàrmacs i la millora d'alguns ja existents, per millorar el coneixement efectiu dels fàrmacs ja existents.
- Un ús adequat i ètic de la informació farmacogenètica.

En temes de regulació i de polítiques de salut pública: FDA. (2001):

- Les proves farmacogenètica hauran d'estar sempre regulades per l'entitat corresponent a cada regió o país.
- La informació farmacogenètica s'ha d'utilitzar en forma adient, i sense alterar la provisió de salut per part dels organismes privats destinats a això com per exemple les asseguradores privades de salut.
- Incloure dins dels estudis, categoritzacions de pacients d'acord a les seves característiques genètiques (malaltia, ADN heretat, etc.), de tal forma que tots estiguin representats sense exclusió, incloent els grups racials.

En el tractament i pràctica clínica:

- La informació ha de ser segura i ser de fàcil obtenció de fonts independents per part de metges i pacients.
- Els professionals de la salut han de ser entrenats per a comunicar la informació sobre la farmacogenètica.
- Es requereixen de majors recursos per implementar les proves farmacogenètica, els metges necessiten més temps per als seus pacients.
- Es necessiten instal·lacions adequades per resultats ràpids i eficients.

És important estudiar la farmacogenètica aplicada al desenvolupament i anàlisi de medicaments per a proporcionar la millor teràpia, en termes de l'eficàcia i seguretat, considerant també en la bioequivalència.

3.- Objectius

Els objectius plantejats en aquesta tesi doctoral són els següents:

- a. - Conèixer, descriure i analitzar alguns factors que afecten l'avaluació de la bioequivalència promig en drogues d'alta variabilitat.
- b. - Descriure i aplicar les metodologies clàssiques i les més actuals utilitzades en la determinació de la bioequivalència mitjana relacionades amb les drogues d'alta variabilitat.
- c. - Conèixer, descriure i analitzar com el carryover associat a dissenys crossover 2×2 , impacta l'anàlisi de la bioequivalència mitjana a través de simulacions.
- d. - Conèixer i analitzar com la grandària de mostra d'un disseny creuat 2×2 i la variabilitat de la droga avaluada afecten l'avaluació de la bioequivalència mitjana, tant en absència i presència de carryover per mitjà de simulacions.
- e. - Descriure la problemàtica associada al càlcul del factor de similitud en la comparació de dos perfils de dissolució en la seva aplicació pràctica de la bioequivalència in vitro.
- f. - Descriure els conceptes principals associats a la farmacogenètica per comprendre millor la complexitat d'aquest tipus d'estudis.
- g. - Crear una base de dades amb informació d'estudis farmacogenètica efectuats amb polimorfismes de nucleòtid únic (SNP) i variables dicotòmiques.
- h. - Revisar i analitzar de la base de dades en termes del disseny, aspectes metodològics i resultats, que poden influir en el resultat final d'un estudi de farmacogenètica.

En relació als objectius anteriors s'han desenvolupat les següents investigacions, plasmades en els articles enumerats a continuació:

[1] Jordi Ocaña, Ma Pilar Sánchez O, Alex Sánchez, Josep L. Carrasco J. "On Equivalence and Bioequivalence Testing". 2008. SORT. **32**(2):151-176. Amb aquest article s'han complert els objectius a i b.

[2] Ma Pilar Sánchez O, Carolina Gómez G, Josep L. Carrasco J, Jordi Ocaña, Carles Von Plessing R, C. Gloria Godoy M, Rolando Reinbach H, Ricardo Godoy R. "Evaluating Average Bioequivalence using methods for high variability drugs: A case study". International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008, **46**(10):527-537, complint així amb els objectius a i b.

[3] Enviat a Pharmaceutical Statistics, Març. 2009: "The Effect of Variability and Carryover on Average Bioequivalence Assessment: A Simulation Study. Ma Pilar Sánchez O, Jordi Ocaña, Josep Lluís Carrasco. Amb aquest article s'han complert els objectius c i d.

[4] Enviat a Pharmacogenetics and Genomics, Novembre de 2009: "A systematic review on the methods used in pharmacogenetic studies with binary assessment of treatment response". Albert Cobos, Ma. Pilar Sánchez O, Jaume Aguado, Josep L. Carrasco. Per verificar els objectius f, g i h.

[5] Jordi Ocaña, Gloria Frutos, Ma Pilar Sánchez O.. Using the similarity factor f_2 in practice. A critical revision and suggestions for its standard error estimation. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2009, **99**(1):49–56, complint d'aquesta forma amb l'objectiu e de la present tesi.

4.- Resultats

L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser estudiar alguns problemes que es presenten en l'avaluació de medicaments. El primer estudi va ser determinar si els diferents mètodes de ABE en drogues d'alta variabilitat coincideixen o no en les seves conclusions, quan s'aplica la mateixa base de dades. S'avaluà l'ABE sobre els resultats d'un assaig de BE a Furosemida, fàrmac diürètic principalment utilitzat en hipertensió i algunes patologies cardiovasculars.

Els mètodes aplicats van considerar les següents condicions:

- Ús de límits reglamentaris recollits en les regulacions de les agències del medicament.
- Ampliació dels límits d'ABE d'acord a les recomanacions de les agències reguladores del medicament.
- Escalaments dels límits de BE, basats en GMR, variabilitat i propietats de tall (leveling-off properties) a través de diferents distribucions.
- Escalament de la mesura de bioequivalència, basats en dues aproximacions: distribució t no central i linealització del criteri regulatori.
- Avaluació amb paràmetres farmacocinètics alternatius de la velocitat d'absorció.
- Aplicació de mètodes alternatius associats amb la construcció d'interval de confiança.

Percebem que el principal problema de les drogues d'alta variabilitat és la baixa potència dels mètodes estàndards. Calculem la mida de mostra que caldria perquè $C_{m\acute{a}x}$, tingués

un 80% de potència per a un rang d'acceptació de [0.8, 1.25], que constitueix un valor absolutament inviable per aquest tipus d'estudis.

Destaquem el fet que el tipus d'interval de confiança no influencia el resultat final de l'ABE i la millor alternativa és l' interval més curt (simple shortest confidence interval), el de computació més senzilla.

La decisió final d'ABE és lleugerament més dependent del mètode utilitzat per ampliar o escalar els límits de BE. No obstant això, amb una excepció molt marginal, els resultats semblen apuntar que la mètrica $C_{\text{màx}}/ABC_{0-\infty}$, afavoreix més un resultat d'ABE a diferència de la mètrica inicial $C_{\text{màx}}$, segons la qual la conclusió hauria de ser la contrària. El resultat final mostra que les dades de la Furosemida depenen més de la mètrica que del mètode per determinar ABE. Si consideréssim la mètrica $C_{\text{màx}}/ABC_{0-\infty}$, proposada per Endrenyi *et al.*, 1993, l'ABE seria clara.

A aquest resultat s'hi afegeix el fet que hi ha altres arguments de tipus fisiològic, farmacocinètics i farmacodinàmics que s'haurien de considerar en l'anàlisi. L'efecte diürètic de la Furosemida està estretament relacionat amb la velocitat d'excreció urinària més que amb la concentració plasmàtica. A més s'ha establert que existeix una velocitat d'excreció urinària associada a una eficiència màxima que depèn d'una certa concentració, i que qualsevol valor superior a aquesta concentració en particular no millora l'efecte diürètic de la droga, mentre l'excreció urinària es mantingui constant.

En el cas específic de les dades observades en la Furosemida de referència i de prova ambdues formulacions excedeixen llargament els valors requerits per assolir aquesta eficiència.

Tots aquests resultats ens fan pensar que la decisió final de si hi ha ABE o no, no s'ha de basar en els mètodes estadístics d'ABE solament. Els resultats, més aviat ens fan reflexionar que la millor decisió és aquella basada tant els resultats estadístics com en el coneixement d'altres aspectes clínics i fisiològics, que en conjunt poden permetre prendre la millor decisió.

Les anàlisis plasmades a l'article anterior, il·lustren sobre un cas d'estudi concret les dificultats metodològiques en la determinació de la BE. Fan pensar en el possible efecte distorsionador de factors com una alta variabilitat o la possible presència de carryover.

L'article de la revista SORT revisa i formalitza els mètodes d'ABE utilitzats en l'article anterior, i en general tota la problemàtica de les proves d'equivalència. Els models i mètodes proposats serveixen de marc de referència pels altres articles.

Com hem dit, l'efecte de la variabilitat residual i l'efecte carryover es sospita que poden afectar fortament una anàlisi de bioequivalència. Això s'intentà quantificar, mitjançant simulacions sota un disseny de crossover 2x2, a l'article a *Pharmaceutical Statistics*. L'avaluació es va realitzar considerant tres característiques essencials dels mètodes estadístics: el percentatge d'aprovació de ABE (potència de l'estudi), el recobriment dels intervals de confiança i la seva precisió.

Sabem per la literatura que nivells alts de variabilitat distorsionen alguns procediments per a la determinació d'ABE, en particular, el control de l'error del tipus II. És a dir, que en presència d'alta variabilitat, és molt difícil poder declarar BE quan efectivament existeix.

Tots els resultats validen el que es coneix dels mètodes de BE, és a dir, que la variabilitat té un impacte fort en el resultat final d'un estudi de BE. L'augment de la mida de mostra pot compensar l'efecte de la variabilitat encara que de vegades aquests poden ser massa grans en la realitat com per ser efectivament aplicats a l'estudi.

Els resultats principals i més originals quantifiquen les possibles conseqüències de la presència de carryover, que observem que depèn principalment de la variabilitat experimental i del signe del carryover relatiu, expressat com la raó entre efecte carryover i efecte formulació, κ/ϕ . Les raons negatives, indueixen un decaïment en la potència, les raons positives, provoquen un creixement aparent de la potència en correspondència amb un augment de la probabilitat d'error del tipus I que invalida els procediments de prova de BE, ja no compleixen el valor nominal de la prova. Aquesta pertorbació augmenta amb la grandària de la mostra i amb la disminució de la variabilitat.

Aquests efectes aparentment paradoxals, són conseqüència directa del tipus de biaix induït pel carryover. Més precisament, a valors de ϕ amb el mateix signe que κ , (és a dir, quan la relació és positiva), tendeixen artificialment cap un efecte de formulació zero, i fan més fàcil la declaració de BE, mentre que valors κ de signe contrari a ϕ indueixen l'efecte "artefacte" oposat. Aquests biaixos depenen directament de la magnitud del carryover i no de la grandària de la mostra ni variabilitat.

En cas que es declari BE, com a producte de l'error del tipus I, (efecte formulació fora i lluny dels límits de BE), el creixement positiu del carryover relatiu, indueix una proporció creixent de declaracions d'ABE errònies, més freqüents en mides de mostres grans o variabilitat petites, és a dir, per als intervals de confiança més estrets. De la mateixa manera, en un cas de veritable BE, (efecte formulació en el límit de BE), la raó negativa κ/ϕ farà més difícil declarar BE.

En qualsevol cas, el carryover té un impacte molt evident sobre els procediments per provar BE, modulats per la variabilitat i altres factors. Segons alguns investigadors, l'estratègia principal és no realitzar una prova per carryover i procedir com si estigués absent. Consideren que a la majoria d'estudis cal suposar que el període de depuració o rentat normalment ja és l'adequat i molt probablement el carryover ja s'elimina. D'Angelo *et al.*, 2003 ho confirma a través de l'estudi de p-valors sobre la significació del carryover, obtinguts d'estudis previs de BE. La prova de Kolmogorov-Smirnov (KS) no detecta diferències en la distribució d'aquests valors respecte de la distribució uniforme, la que s'esperaria sota la hipòtesi nul·la d'absència de carryover. Aquests resultats són rebutjats a Putt (2005, 2006) amb simulacions que suggereixen la manca de potència de les proves de KS. Senn *et al.*, 2005, refuta els arguments de Putt, amb l'argument de la irrellevància dels càlculs de potència per poder interpretar les seves dades. Aquestes anàlisis no són una prova de la presència ocasional de carryover, ni una prova de la seva no-existència.

Wellek, 2003, defineix un procediment per a provar que el carryover és negligible (és a dir, des d'un punt de vista de prova d'equivalència), tant pel carryover escalat respecte de la variabilitat com pel carryover absolut. Les nostres simulacions suggereixen que un diagnòstic interessant podria ser provar la insignificança del carryover relatiu κ/ϕ , és a dir, realitzar una prova sota la hipòtesi nul·la d'un efecte carryover que produeixi una distorsió en contrast amb la hipòtesi d'efecte carryover insignificant. Els resultats de la simulació mostren que una possible

elecció dels límits d'equivalència podrien estar propers al valor 0,1, encara que la recerca dels límits adequats per establir el procediment de prova, requereixen d'una major recerca.

Tant l'article sobre Furosemda com l'article de simulació, fan pensar que la bioequivalència realitzada a partir de proves *in vivo* té bastantes dificultats, per la qual cosa s'ha explorat una altra via que podria representar una solució a aquests inconvenients com les proves realitzades *in vitro* a través de la comparació de perfils de dissolució. Per això, investiguem el factor de similitud davant la inquietud que aquest mètode està estadísticament mal fonamentat i que es podrien fer algunes aportacions per solucionar aquest problema. Els resultats d'aquesta investigació estan plasmatats a l'article publicat a *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*.

Per l'agència europea del medicament, EMEA, el factor de semblança té com un dels seus objectius prioritaris permetre la substitució de proves de BE *in vivo*, per a algunes drogues sota certes condicions.

En aquesta regulació, s'estableixen algunes condicions (Blume *et al.*, 1999) sobre les quals es podria evitar realitzar un estudi de BE *in vivo* i per la qual la droga hauria de complir amb alguns criteris relacionats amb les seves propietats i patrons de qualitat.

Respecte de les seves propietats, cal que:

- La droga no sigui de marge terapèutic estret.
- Exhibeixi una farmacocinètica lineal i un efecte primer pas menor del 70%.
- Sigui altament soluble en aigua, en condicions de rangs de pH de 1 a 8 a 37 ° C.
- Sigui altament permeable a l'intestí, és a dir, la extensió de la seva absorció és major del 80%.

Respecte dels seus patrons de qualitat:

- Els excipients no tinguin un impacte significatiu en la substància(es) actiu(ves).
- L'alliberament de la substància activa sigui ràpida en solució amortidora durant tot el rang de pH fisiològic (1 a 8) a 37 ° C.

Si es compleixen tots aquests criteris, les dades provinents dels perfils de dissolució a través del factor de semblança, f_2 , permetrien determinar la BE sense realitzar un veritable estudi de bioequivalència *in vivo*.

Per l'agència americana, FDA (2000), en canvi, hi ha algunes exigències més específiques. Està orientada principalment a formulacions orals d'alliberació immediata per a ús sistèmic. En aquesta regulació, totes aquelles drogues que són de baixa permeabilitat i solubilitat pobre i/o formulades en formes farmacèutiques de dissolució lenta, podrien ser considerades com drogues amb problemes potencials de BE. Per tant, els estudis de BE *in vivo* es requereixen precisament per aquest tipus de drogues.

En altres paraules, l'exempció de la BE *in vivo* podria ser sol·licitada si:

- La droga és altament soluble i altament permeable.
- La droga (producte) es dissol ràpidament, és a dir, més del 85% en els 30 minuts en tots els rangs de pH fisiològic: 1.3; 4.6 i 6.8.
- La droga no sigui de marge terapèutic estret.

- Cal considerar a més l'estabilitat de la droga en el tracte gastrointestinal, ha d'estar assegurada en més del 95% a les 3 hores, atès que només així es podrà assegurar una interpretació adequada a partir dels estudis de solubilitat i permeabilitat.

En l'actualitat les drogues que estan classificades com del grup I, podrien ser objecte de l'exempció dels estudis de BE, per la seva alta solubilitat, alta permeabilitat i perquè el seu acompliment no depèn de la seva biodisponibilitat. Per al cas de drogues classificades en el grup III, que també es caracteritzen per una alta solubilitat, hi ha alguna situació una mica més complexa. Per a productes d'alliberament immediat, es podrien assumir els mateixos supòsits de exempció, sempre que la seva dissolució sigui ràpida sota totes les condicions de pH gàstric. Tanmateix, hi ha altres arguments en els quals podrien ser considerats fins i tot millors candidats que les de classe I.

En aquest tipus de compostos, la permeabilitat a través de la membrana intestinal serà la velocitat que limita el procés de l'absorció. En aquestes condicions la velocitat i extensió de la biodisponibilitat no és massa dependent de les propietats de la formulació, però, només en el patró de la permeabilitat *in vivo*.

Les proves de dissolució i el corresponent càlcul del factor de semblança en conjunt amb el sistema BCS, s'utilitzen per justificar l'exempció dels estudis *in vivo* de BE. A més, proporcionen una base científica per descobrir i identificar la possibilitat d'establir una correlació IVIV. L'establiment d'aquesta correlació permet tenir una base important per prendre una decisió respecte d'evitar un estudi de BE que realment pot ser innecessari.

Donada la importància que té la substitució d'estudis de BE *in vivo* per estudis *in vitro*, el càlcul del factor de semblança ha de ser acurat, respectant en forma estricta el protocol que implica el seu càlcul, a la vegada de millorar la seva estimació a partir de metodologies que permetin un càlcul millorat i així discriminar en forma més eficient les comparacions realitzades a partir dels perfils de dissolució.

En el present treball es construeixen diverses versions presumiblement millorades de l'índex f_2 mostral, orientades a corregir-ne el biaix. Les simulacions realitzades no mostren clarament quin d'aquests factors de semblança pot ser més adequat per a ser utilitzat a la pràctica. Cap dels índexs (inclòs f_2 mostral bàsic) és uniformement òptim, de manera que, principalment per la simplicitat del seu càlcul, es considera que la versió bàsica de f_2 mostral és la més recomanable. També es construeixen diversos estimadors de l'error estàndard de f_2 mostral. Les simulacions indiquen que l'estimador basat en el mètode delta és el més recomanable.

Tots aquests estimadors es provaren sobre dades reals de perfils de dissolució de Metoclopramida, comparant la situació sense tensioactiu amb la corresponent a tensioactiu. Tots els f_2 mostrals van assolir valors molt similars, al voltant de 52. Tots aquests valors permetrien declarar similitud entre els perfils comparats, segons el criteri SUPAC (f_2 mostral més gran que 50). Però es produeix una contradicció en el fet que diversos intervals de confiança unilaterals per f_2 no estan inclosos en l'interval [50, 100], de manera que segons el principi d'inclusió d'intervals no es podria declarar similitud (equivalència) de perfils. El límit inferior de l'interval de confiança al 95% construït segons el mètode percentil bootstrap és de 49.20. El mateix valor per a l'interval bootstrap BCa és de 49.30, per tant aquests valors propers a 52 no proporcionen una evidència total de similitud. Podem observar per tant que un criteri tan simple

com $\hat{f}_2 > 50$, pot induir una decisió errada sobre la similitud. Les estimacions de l'error estàndard són concordants per a tots els mètodes. El valor més baix dels estimadors de l'error estàndard correspondre a l'interval arrencada, de valor 1.46 i el més alt va ser per al mètode Jackknife 1.59.

Si s'assumeix normalitat aproximada per \hat{f}_2 (supòsit inexacte), una mesura ràpida de la precisió d'aquest estimador és $\hat{f}_2 \pm 1.96 se_{\Delta} = 51.7091 \pm 1.96 \times 1.5508 = 51.7091 \pm 3.0396$ (i similarmet pels altres estimadors de l'error estàndard).

Per perfils de dissolució obtinguts sota condicions idèntiques, tots els estimadors de f_2 excedeixen el valor 80. La semblança es confirma pels intervals de confiança (límit inferior excedeix el valor 50). L'error estàndard pren valors propers al 7 indicant una precisió molt baixa. Aquest increment en la variabilitat és atribuïble a les propietats intrínseques del factor de similitud mostral. Aquests resultats apunten a un problema inherent d'heteroscedasticitat en dissenys experimentals on es fa servir f_2 com una variable de resposta sota diferents condicions experimentals.

Un dels resultats més significatius d'aquest estudi es reflecteix a la Figura 19 (pàgina 62), on es dibuixa la probabilitat de declarar semblança o equivalència entre perfils de dissolució (correspon a la potència per declarar semblança), per tres procediments: SUPAC, percentil Bootstrap i percentil bootstrap BCa, en funció del veritable valor de f_2 , a un nivell de significació nominal del 5%. El procediment SUPAC no controla de cap manera l'error de tipus I, independentment del nivell nominal de significació. Per exemple, quan la similitud real entre ambdues formulacions és 48 (i per tant seria un error de tipus I concloure similitud), la probabilitat de declarar similitud és del 40%. Pel cas de la decisió d'acord amb el procediment percentil Bootstrap BCa, el control de l'error de tipus I és més adequat, però el mètode segueix sent molt optimista quant a declarar semblança; per exemple, quan el valor real de f_2 és igual a 50 la probabilitat és del 11% i no hauria de ser major del 5%. El procediment basat en l'interval percentil Bootstrap és l'únic que respecta el nivell de nominal de significació. Les probabilitats d'error de tipus II mostren la tendència oposada: el mètode més conservador és el basat en el mètode percentil bootstrap.

En altres paraules, el procediment de SUPAC en termes del risc per al consumidor (el que correspon a l'error del tipus I), de declarar falsament similitud, i el risc del productor (en aquest cas l'error del tipus II) de no declarar similitud en una forma farmacèutica que realment ho és, no controla el risc del consumidor i artificialment disminueix el risc del productor. Els procediments percentil i BCa són més elegibles com a un criteri just de decisió. El BCa no controla per complet el risc dels consumidors (és més alt que el nivell de significació nominal indicat, per exemple, 5%), però proporciona un risc per al productor més acceptable que el mètode del percentil.

Aquest últim procediment és el més conservador controla estrictament el risc per al consumidor, però a costa d'un risc elevat del productor, que per exemple és del 60% per una clara similitud sota un valor veritable de f_2 de 65 quan la mida mostral és de 12 tablettes per mostra.

Els resultats de les simulacions són preliminars i haurien de ser complementades tenint en compte altres situacions que ocorren en la realitat dins dels estudis de perfils de dissolució.

Les nostres principals conclusions apunten cap a les següents reflexions:

- Cal aprofundir sobre les possibles millores que es puguin realitzar al factor de semblança que facin més eficient la seva utilització.
- L'ús del factor de semblança pot ser adequat com a variable de resposta en estudis experimentals, tot i tot i que el seu biaix pugui distorsionar l'optimització de les seves conclusions.
- No és recomanable prendre decisions sobre la base del valor calculat d'aquest índex, d'acord al valor límit de 50. En comptes d'això, es podria considerar utilitzar en forma adequada intervals de confiança i criteris de decisió basats en el principi d'inclusió.

Estudiades aquestes dues formes de bioequivalència *in vivo* i *in vitro*, i les seves limitacions, es va decidir integrar el factor farmacogenètic i trobar així alguna covariant com el genotip per augmentar la potència, especialment en la bioequivalència *in vivo*. Així, vam començar per estudiar els estudis farmacogenètics i intentarem sistematitzar i filtrar una gran quantitat d'informació creant una base de dades per a la seva posterior anàlisi.

El nombre d'estudis de farmacogenètica s'ha anat incrementant especialment en els darrers anys i seguirà augmentant molt més en el futur. A causa de la creixent importància que va prenent la recerca farmacogenètica, degut a la seva baixa replicabilitat ja que els informes de resultats són inadequats o pobres, hem realitzat una revisió sistemàtica per avaluar els seus aspectes metodològics.

Alguns autors han proposat algunes explicacions potencials de la baixa replicabilitat, com estratificació de la població, mala classificació de la resposta, heterogeneïtat al·lèlica. Altres indiquen directament un disseny pobre, multiplicitat i una mala interpretació dels resultats negatius.

Aquest estudi es centra en els aspectes del disseny, d'anàlisi estadística i de comunicació dels resultats de 48 articles preseleccionats d'acord a certs criteris d'inclusió. Per això es va crear una base de dades amb informació d'aquests tres aspectes.

Respecte del disseny, a 34 de 48 articles no es va caracteritzar el disseny de l'estudi, de la resta el disseny més freqüent va ser el de "Cas-control prospectiu" (8), "Cas-control retrospectiu" (1), "Cas-control prospectiu aleatoritzat" (1), "Cas-control niuat" (1), "Cohort doble cec" (1), "Cohort prospectiva" (1) i "Assaig clínic controlat" (1).

Respecte de la grandària de mostra, cap d'ells va reportar com es va fer el càlcul ni la seva planificació. El nombre de pacients tractats va oscil·lar en un rang de 54 a 946. La mostra efectiva va fluctuar entre 36 a 884 subjectes (mitjana = 155), sent de 200 o més en 17 dels 46 estudis i 300 o més en només 6 dels 46 estudis.

La metodologia estadística només es va especificar en 4 dels 48 articles revisats. A més, la prova Khi-quadrat de Pearson, va ser la metodologia més utilitzada (amb freqüències genotípiques o al·lèliques). Només un article va esmentar la Correcció de continuïtat de Yates, seguit del test exacte de Fisher. L'informe de les mesures d'associació com OR (Odds Ratio) o

RR (Risc Relatiu) va ser molt poc freqüent, igual que la regressió logística i referit a la menció de l'estadística de prova amb prou feines la trobem en dos articles (prova de Wald).

L'equilibri de Hardy-Weinberg (HWE) es va estudiar en només 19 de 30 articles, per donar validesa a les anàlisis posteriors. En 34 articles es va calcular però alguns d'ells no analitzaven freqüències al·lèliques. Els resultats de la prova de HWE només es van reportar en forma correcta en 3 de 30 articles a través de les anàlisis al·lèliques corresponents. La multiplicitat va ser un dels problemes més freqüents, es va trobar a 32 articles.

Degut a la rellevància clínica d'aquest tipus d'estudis, i els resultats de la revisió realitzada, s'ha posat de relleu la necessitat d'elevar el nivell de la investigació farmacològica. Existeixen ja recomanacions generals (Bromley *et al.*, 2009; Need *et al.*, 2005). El nostre estudi confirma i dona validesa a moltes de les qüestions estudiades a Bromley *et al.*, 2009, sobre la qualitat dels estudis. Hi ha normes més específiques en l'estil de la Consort STROBE, STREGA (que correspon a una extensió de STROBE) (Moher *et al.*, 2001; Vanderbroucke *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2009) que seria sens dubte molt valuós de recuperar i en conjunt revisar alguns tèmics de la xarxa Equator, de creació relativament recent l'objectiu principal és treballar en la qualitat dels estudis (Altman *et al.*, 2008). Fins que no es produeixi un increment notable de la qualitat dels estudis farmacogenètics, difícilment aquestes dades es podran utilitzar com a covariable en estudis de bioequivalència.

6.- Bibliografía

- Abad F, Novalbos J. (2005). Evaluación ética de los estudios de Farmacogenética. *ICB digital* 30:1-8 <http://www.icf.uab.es/icbdigital/archivos/asp/anterior.asp?icbd=1&seccio=art>. [Acceso 14 Junio 2009]. Institut Català de Farmacologia.
- Al-Mohizea AM, Kadi AA, Al-Bekairi AM, Al-Balla SA, Al-Yamani MJ, Al-Khamis KI, Niazy EM, El-Sayed YM. (2007). Bioequivalence evaluation of 320 mg gemifloxacin tablets in healthy volunteers. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **45**: 617-622.
- Altman DG, Hoey J, Moher D, Schulz KF. (2008). Equator network. <<http://www.equator-network.org/>>. [Acceso 12 August 2008].
- Amiddon G, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. (1995). Report. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of *in Vitro* Drug Product Dissolution and *in Vivo* Bioavailability. *Pharm. Res.* **12**:413-420.
- Blume H, Chung BS. (1999). The biopharmaceutics classification system (BCS): Class III drugs — better candidates for BA/BE waiver. *Eur. J. Pharm. Sci.* **9**:117-121.
- Blume H, Midha KK. (1993). Bio-International 92, Conference on Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Sci.* **82**:1186-1189.
- Boddy AW, Snikeris FC, Kringle RO, Wei GCG, Oppermann JA, Midha KK. (1995). An Approach for Widening the Bioequivalence Acceptance Limits in the Case of Highly Variable Drugs. *Pharm. Res.* **12**:1865-1868.
- Brockmüller J, Tzvetkov M. (2008). Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **64**:133–157.
- Bromley C, Close S, Cohen N, Favis R, Fijal B, Gheyas F, Liu W, Lopez-Correa C, Prokop A, Singer J.. (2009). Designing pharmacogenetic project in industry: practical design perspectives from the Industry Pharmacogenomics Working Group. *Pharmacogenom. J.* **9**:14-22.
- Comisión Europea. EUR 21120: 25. (2004). Recomendaciones sobre las repercusiones éticas, jurídicas y sociales de los test genéticos. Luxemburgo. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. http://ec.europa.eu/research/conferences/2004/genetic/pdf/recommendations_es.pdf. [Acceso 14 de Junio 2009].
- Cordell HJ, Clayton DG. (2005). Genetic association studies. *Lancet*, **366**:1121-31.
- Chow SC, Ki FYC. (1997). Statistical comparison between dissolution profiles of drugs products. *J. Biopharm. Stat.*, **7**:241-258.
- Chow SC, Liu JP. (2000). Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Chow SC, Shao J, Wang H. (2003). In vitro bioequivalence testing. *Stat Med.*, **22**:55-68.
- D'Angelo G, Potvin D, Turgeon J. (2001). Carryover effects in Bioequivalence Studies. *J. Biopharm. Stat.*, **11**:35-43.
- EMA European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (1999). Note for Guidance on the Quality of modified Release Products: A:Oral dosages forms, B:Transdermal dosage forms. Section I (Quality). Committee for Proprietary Medicinal Products. CPMP. London. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/060496en.pdf> [Acceso 26 Julio, 2009].
- EMA European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (2001). Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. Committee for Proprietary Medicinal Products. CPMP. London. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198enfin.pdf> [Acceso 12 Junio, 2009].
- Endrenyi L, Yan W. (1993). Variation of Cmax and Cmax/AUC in investigations of Bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol. Ther.*, **31**:184–189.
- Evans WE, McLeod HL. (2003). Pharmacogenomics – Drug Disposition, Drug Targets and Side effects. *New Engl. J. Med.*, **348**:538-549.
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (1997a). Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. (CDER). Department of Health and Human Services. Rockville, MD. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070237.pdf>. [Acceso 12 Junio, 2009].

- FDA U.S. Food and Drug Administration. (1997b). Guidance for Industry: SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms. (CDER). Department of Health and Human Services. Rockville, MD. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070640.pdf>. [Acceso 12 Junio, 2009].
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (2000). Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and Bioequivalence studies for immediate-released solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification System. (CDER). Department of Health and Human Services. Rockville, MD. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>. [Acceso 17 Junio, 2009].
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (2001). Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. (CDER). Department of Health and Human Services. Rockville, MD. On the Web as: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070244.pdf> [Acceso 12 Junio, 2009].
- FDA U.S. Food and Drug Administration. (2003). Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. (CDER). Department of Health and Human Services. Rockville, MD. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070124.pdf> [Acceso 12 Junio, 2009].
- Fromm MF. (2002). The influence of MDR1 polymorphism on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**:1295-1310.
- Hsu JC, Hwang G, Liu HK, Ruberg S. (1994). Confidence intervals associated with tests for bioequivalence. *Biometrika*, **81**:103-114.
- Karalis V, Symillides M, Macheras P. (2004). Novel scaled Average Bioequivalence. *Pharm. Res.*, **21**:1933-1942.
- Karalis V, Macheras P, Symillides M. (2005). Geometric mean ratio-dependent scaled bioequivalence limits with leveling-off properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **26**:54-61.
- Khoury MJ. (2006). Hoja informativa. Oficina de Genómica y Prevención de Enfermedades, Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. “El Proyecto del Genoma Humano: el descubrimiento y secuenciación de los genes es sólo el principio”. <http://www.cdc.gov/genomics/spanish/factsheet/afterhgpsp.htm> [Acceso 14 Junio de 2009].
- Kytariolos J, Karalis V, Macheras P, Symillides M. (2006). Novel Scaled Bioequivalence Limits with Leveling-off Properties. *Pharm. Res.*, **23**:2657-2664.
- Kwon Y. 2001. Handbook of essential Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Metabolism for Industrial Scientist. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Little J, Higgins PT, Ioannidis J, Moher D, Gagnon F, Elm E, Khoury MJ, Cohen B, Davey-Smith G, Grimshaw J, Scheet P, Gwinn M, Williamson RE, Zou G, Hutchings K, Johnson C, Tait V, Wiens M, Golding J, van Duijn C, McLaughlin J, Paterson A, Wells G, Fortier I, Freedman M, Zecevic M, King R, Infante-Rivard C, Stewart A, Birkett N. (2009). Strengthening the Reporting of Genetic Association Studies (STREGA) - an extension of the STROBE statement (p n/a). Published Online: Mar 10 2009. *Genet Epidemiol*. Early view.
- Liu JP, Ma MC, Chow SC. (1997). Statistical evaluation of similarity factor f_2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. *Drug Inf. J.*, **31**: 1255-1271.
- Ma MC, Wang BBC, Liu JP, Tsong Y. (2000). Assessment of similarity between dissolution profiles. *J. Biopharm. Stat.*, **10**:229-249.
- Marzolini C, Pâus E, Buclin T, Kim RB. (2004). Polymorphism in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75**:13-33.
- Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. (1997). Individual and Average Bioequivalence of Highly Variable Drugs and Drug Products. *J. Pharm. Sci.*, **86**:1193-1196.
- Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. (2005). The bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **43**:485-498.

- Midha KK, Shah V, Singhand GJP, Patnaik R. (2006). Commentary, Conference Report: Bio-International 2005. *J. Pharm. Sci.*, **96**:747-754.
- Moher D, Schulz KF, Altman DG. (2001). The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trials. *Ann. Intern. Med.*, **134**:657-62.
- Moore JW, Flanner HH. (1996). Mathematical comparison of curves with an emphasis on in-vitro dissolution profiles. *Pharm Tech.*, **20**:64-74.
- Need AC, Motulsky AG, Goldstein DB. (2005). Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat. Genet.*, **37**:671-81.
- Nuffield Council on Bioethics. (2003). Pharmacogenetics: Ethical issues, a guide to the report. <http://www.nuffieldbioethics.org/go/ourwork/pharmacogenetics/introduction>. [Acceso 14 Junio 2009].
- Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington FW. (2008). Thompson & Thompson. *Genética en Medicina*. 7a edición. MASSON. S.A.
- Proyecto Genoma Humano. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml.
- Putt M. (2005). Comment on "Carryover in cross-over trials in bioequivalence: theoretical concerns and empirical evidence". *Pharm. Stat.*, 2005; **4**:215-216.
- Putt M. (2006). Power to detect clinically relevant carryover in a series of cross-over studies. *Stat. Med.*, **25**:2567-2586.
- Rodda B. Chapter 2: Bioavailability: designs and analysis. In *Statistical Methodology in the pharmaceutical Sciences*. Berry D. 1990. Marcel Dekker, INC. New York.
- Roses AD. (2000). Pharmacogenetics and the Practice of Medicine. *Nature*, **405**:857-865.
- Ruiz-Canela M. (2005). De la investigación farmacogenómica a la medicina individualizada: un espacio para la reflexión ética. *Rev. Méd. Univ. Navarra*, **49**:32-33.
- Shah V, Yacobi A, Barr WH, Benet LZ, Breimer D, Dobrinska MR, Endrenyi L, Fairweather W, Gillespie W, Gonzalez MA, Hooper J, Jackson A, Lesko LJ, Midha KK, Noonan PK, Patnaik R, Williams RL. (1996). Evaluation of Orally Administered Highly Variable Drugs and Drug Formulations. *Pharm. Res.*, **13**:1590-1594.
- Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. (1998). In vitro dissolution profile comparison-Statistics and analysis of the similarity factor, f_2 . *Pharm. Res.*, **15**: 889-896, 1998.
- Shastry BS. (2006). Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogen. J.* **6**:16-21.
- Sathe P, Tsong Y, Shah VP. (1996). In vitro dissolution profile comparison: statistics and analysis, model dependent approach. *Pharm. Res.*, **13**:1799-1803.
- Schork NJ, Fallin D, Schork MA. (2001) en *Handbook of Statistical Genetics*, Part 6: Chapter 27: Pharmacogenetica, 741-764. Editado por Balding DJ, Bishop M, Cannings. John Wiley & Sons, LTD. Chichester.
- Senn S. (2002). *Cross-over Trials in Clinical Research*, John Wiley & Sons, England.
- Senn S, D'Angelo G, Potvin D. (2004). Carryover in cross-over trials in bioequivalence: theoretical concerns and empirical evidence. *Pharm. Stat.*, **3**:133-142. DOI:10.1002/pst.111.
- Senn S, D'Angelo G, Potvin D. (2005). Rejoinder "Carryover in cross-over trials in bioequivalence: theoretical concerns and empirical evidence". *Pharm. Stat.*, **4**:216-219. DOI: 10.1002/pst.174.
- Shah VP, Yamamoto LA, Schuirmann D, Elkins J, Skelly P. (1987). Analysis of *In vitro* dissolution of whole versus half controlled release theopylline tablets. *Pharm. Res.*, **4**:416-419.
- Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCulloch B, Noorizadeh AC, Skelly J. (1989). In vitro Dissolution Profile of Water-Insoluble Drug Dosage Forms in the Presence of Surfactants. *Pharm. Res.*, **6**(7):612-618
- Shah VP, Yacobi A, Barr WH, Benet LZ, Breimer D, Dobrinska MR, Endrenyi L, Fairweather W, Gillespie W, Gonzalez MA, Hooper J, Jackson A, Lesko L, Midha KK, Noonan PK, Patnaik R, Williams RL. (1996). Evaluation of Orally Administered Highly Variable Drugs and Drug Formulations. *Pharm. Res.*, **13**:1590-1594.
- Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. (1998). *In vitro* Dissolution Profile Comparison-Statistics and Analysis of the Similarity Factor: f_2 . *Pharm. Res.*, **15**:889-896.

- Tong Y, Hammerstrom T, Sathe P, Shah VP. (1996). Statistical assesment of mean difference between two dissolution data sets. *Drug Inf. J.*, **30**:1105-1112.
- Tothfalusi L, Endrenyi L, Midha KK, Rawson MJ, Hubbard JW. (2001).Evaluation of the Bioequivalence of Highly-Variable Drugs and Drugs Products. *Pharm. Res.*, **18**:728-733.
- Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gotzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M. (2007). Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Ann. Intern. Med.*, **147**:W163-94.
- Weiner D , Yuh L. Chapter 12: Bioavaibility studies. In *Statistics in the Pharmaceutical Industry*. Buncher R. (1994). 2on edition. Marcel Dekker, INC. New York.
- Weinshilboum R. (2003). Inheritance and Drug Response. *N. Engl. J. Med.*, **348**:529-537.
- WHO QAS/04.093/Rev4. 2005. Working Document. Multisource (Generic) Pharmaceutical Products: Guidelines on Registration Requeriments to Establish Interchangeability. Draf Revision.
- Zanen P. Bioequivalence and generic medicines: <http://198.170.119.137/pol-reg-prodev.htm>. (1995). Bioequivalence and Generic Medicines Dept. Pulmonary Diseases, Univ. of Utrecht. A technical review of the scientific approach to bioequivalence studies taken by the generics industry. [Acceso 8 de Abril, 2009].
- Zapater P, Horga JF. (1999). Bioequivalencia y Genéricos. Los estudios de Bioequivalencia. I. Una aproximación a sus bases teóricas, diseño y realización. *Rev. Neurol.*, **29**:1235-1246.

7.- Publicaciones

[1] Jordi Ocaña, Ma. Pilar Sánchez O, Alex Sánchez, Josep L. Carrasco J. “On Equivalence and Bioequivalence Testing”. 2008. *SORT*. **32**(2):151-176. Con este artículo se han cumplido los objetivos *a* y *b*.

[2] Ma. Pilar Sánchez O, Carolina Gómez G, Josep L. Carrasco J, Jordi Ocaña, Carlos Von Plessing R, C. Gloria Godoy M, Rolando Reinbach H, Ricardo Godoy R. “Evaluating Average Bioequivalence using methods for high variability drugs: A case study”. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2008, **46**(10):527-537, cumpliendo así con los objetivos propuestos *a* y *b*.

[3] Ma. Pilar Sánchez O, Jordi Ocaña, Josep Lluís Carrasco. “The Effect of Variability and Carryover on Average Bioequivalence Assessment: A Simulation Study”. Aceptada *Pharmaceutical Statistics*, Marzo 2010. Con este artículo se han cumplido los objetivos definidos en *c* y *d*.

[4] Albert Cobos, Ma. Pilar Sánchez, Jaume Aguado, Josep L Carrasco. “A systematic review on the methods used in pharmacogenetic studies with binary assessment of treatment response.” Enviado a *Pharmacogenetics and Genomics*, Noviembre de 2009, para verificar los objetivos *f*, *g* y *h*.

[5] Jordi Ocaña, Gloria Frutos, Ma. Pilar Sánchez O. “Using the similarity factor f_2 in practice. A critical revision and suggestions for its standard error estimation”. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2009, **99**(1):49–56, cumpliendo de esta forma con el objetivo *e* de la presente tesis.

Anexo N°1: Intervalos de confianza en Bioequivalencia y Métodos de escalamiento de límites

1.- Intervalos de confianza en Bioequivalencia

En la práctica, el procedimiento más utilizado está basado en el principio de inclusión del intervalo de confianza, es decir, que se puede declarar la condición de BE si el intervalo de confianza $1 - 2\alpha$ para el efecto de la formulación ϕ ,

$$I = \bar{D} \pm t_{(\alpha, N-2)} se_{\bar{D}}$$

está dentro de los límites de bioequivalencia $\pm\phi_0 = \pm 0.223$, donde $t_{(\alpha, N-2)}$ es el $1 - \alpha$ cuantil de una distribución t de Student con $N - 2$ grados de libertad, \bar{D} corresponde al estimador del efecto formulación basado en las diferencias intrasujeto ($\bar{D} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$) de las medias de las formulaciones de prueba y referencia, $se_{\bar{D}}$ es el estimador para el error estándar y $N = n_1 + n_2$ para el tamaño de muestra total en un diseño cruzado de 2 periodos y dos secuencias (2x2), y se define una prueba de tamaño α .

a.- Intervalo de confianza de Westlake, (1976)

Westlake en 1976, publicó un trabajo acerca de la construcción de un intervalo de confianza que era simétrico en torno al cero. Este intervalo tenía la siguiente expresión:

$$I_w = \left[\bar{D} - t_2 se_{\bar{D}}, \bar{D} - t_1 se_{\bar{D}} \right]$$

donde t_1 y t_2 debían satisfacer las siguientes ecuaciones:

$$\Pr\{t_1 < T < t_2\} = 1 - \alpha$$

$$(t_1 + t_2) se_{\bar{D}} = 2\bar{D}$$

T representa una variable t de Student aleatoria con $N - 2$ grados de libertad. Este intervalo, define un intervalo simétrico en torno al cero, con un 100% de recubrimiento si el verdadero efecto formulación en la escala logarítmica es nulo, es decir, $\phi = 0$, y el recubrimiento tiende a $1 - \alpha$ como ϕ tiende al infinito.

b.- Intervalos de Hsu *et al.*, 1994.

Hsu, propuso dos intervalos con un nivel de confianza de $1 - \alpha$:

i.- El intervalo simétrico dado por la expresión:

$$I_s = \pm \left(|\bar{D}| + t_{(\alpha, N-2)} se_{\bar{D}} \right)$$

ii.- El intervalo específico de BE está representado por la ecuación:

$$I_* = \left[\min \left(0, \bar{D} - t_{(\alpha, N_2-2)} se_{\bar{D}} \right), \max \left(0, \bar{D} + t_{(\alpha, N_2-2)} se_{\bar{D}} \right) \right].$$

Ambos intervalos de confianza presentan un nivel de confianza $1 - \alpha$, asintótico, y un 100% de recubrimiento si $\phi = 0$. El intervalo de Westlake incluye al intervalo simétrico de Hsu y este a su vez incluye al intervalo específico de Hsu. Esta característica puede resultar en una mejora de la potencia.

2.- Métodos para el escalamiento de los límites de Bioequivalencia

La forma principal de escalamiento está dada en (Tothfalusi *et al.*, 2003), donde se combina un método de escalamiento lineal con el modelo tradicional de establecer ABE basado en límites fijos de bioequivalencia (BEL):

$$-\theta < \phi < \theta,$$

con el modelo de escalamiento se transforma en:

$$-k\sigma_{SC} < \phi < k\sigma_{SC}$$

donde σ_{SC}^2 es la varianza que se utiliza como factor de escalamiento.

En el diseño cruzado de 2 periodos y dos secuencias, este factor corresponde a la varianza residual, $\sigma_{SC}^2 = \sigma^2$. De acuerdo a los límites considerados en las regulaciones, σ_0^2 , la ABE se evalúa utilizando los límites fijos de bioequivalencia si su varianza no es mayor que σ_0^2 , de otra forma, su utiliza el límite de BE escalado. Es decir, los límites escalados (BEL_{SC}) en la escala original de los datos esta representado por:

$$BEL_{SC} = \begin{cases} \mp\theta & \text{si } \sigma_{SC}^2 \leq \sigma_0^2 \\ \mp k\sigma_{SC} & \text{si } \sigma_{SC}^2 > \sigma_0^2. \end{cases}$$

Con el fin de evitar que se produzca una discontinuidad en los límites de ABE, cuando se toman como una función de σ_{SC}^2 , la variabilidad del límite regulatorio σ y la constante de proporcionalidad k , que tiene la forma $k = \theta/\sigma_0$, debe ser seleccionada adecuadamente. Una posible selección es $\sigma_0 = 0.2$, recomendada por la FDA para el caso de la BE individual en su guía FDA(2001). Si la constante de proporcionalidad se convierte en $k = \ln(1.25)/0.2 = 1.116$.

Otras posibilidades son:

- a.- $\sigma_0 = 0.22314$, recomendada por Boddy *et al.*, (1995) considerando a $k = 1$,
- b.- $\sigma_0 = 0.294$ (Shah *et al.*, 1996) con un valor considerado de $k = 0.759$. Esta última posibilidad corresponde al caso que el ANOVA-CV está cercano al 30%, condición definida para las drogas de alta variabilidad.

Además, de la elección arbitraria de la variabilidad de “intercambio” σ_0 , se debe estimar la varianza de escalado. Como consecuencia, los límites de bioequivalencia serán diferentes y deberán calcularse para cada estudio en particular.

La decisión acerca de que si se utilizan los límites constantes o escalados se toma en base a la estimación de la variabilidad (aleatoria). En el caso que las varianzas estimadas sean grandes, la bioequivalencia se puede declarar para los valores de \bar{D} ($\bar{D} = \bar{Y}_T - \bar{Y}_R$) lejanos a los límites habituales de BE (crítica similar realizada al método de Berger *et al.*, (1996).

a.- **Método Karalis *et al.*, 2004.**

Para atenuar la arbitrariedad de estos criterios, Karalis *et al.*, (2004) desarrolló límites variabilidad a escala con la incorporación de la variabilidad y la limitación de que el efecto de la formulación no debería exceder de ± 0.22314 . La forma general de estos límites es la siguiente:

$$\mp(k_1 \hat{\sigma}_{sc} + k_2 \log(1.25))$$

donde, k_1 es un factor de proporcionalidad y k_2 es un factor de “límite” y que toma en cuenta el punto máximo de estimación que permite la declaración de ABE. Hay diferentes opciones para valores de k_1 y k_2 que definen los diferentes métodos para la especificación de los límites incluyendo los límites fijos y el escalamiento como se definió en los límites discutidos inicialmente *BELsc*.

Entre las posibles opciones para k_1 y k_2 , hay dos posibilidades de definir los métodos que se han rotulado como *BELscG1* en *BELscG2c* en Karalis *et al.*, (2004) y son los siguientes:

Método	k_1	k_2
<i>BELscG1</i>	$(5 - 4 \exp(\bar{D})) 0.496$	1
<i>BELscG2</i>	$(3 - 2 \exp(\bar{D})) 0.496$	$(3 - 2 \exp(\bar{D}))$

En forma precisa:

$$BELscG1 = \mp \left[(5 - 4 \exp(\bar{D})) 0.496 \hat{\sigma}_{sc} \right] + \log(1.25)$$

$$BELscG2 = \mp (3 - 2 \exp(\bar{D})) \left[0.496 \hat{\sigma}_{sc} + \log(1.25) \right].$$

Estas ecuaciones se aplican cuando $\bar{D} \geq 0$, pues de otra manera, se debe considerar $-\bar{D}$ a efectos de realizar el cálculo de los límites.

b.- **Método Karalis *et al.*, 2005.**

Una metodología adicional para enfrentar el escalamiento lo propuso el mismo autor, publicado en (Karalis *et al.*, 2005). Ha formulado límites de escalamiento, considerando la variabilidad hasta un valor *plateau* dependiente de \bar{D} , que combina el valor de límite clásico (0.80 - 1.25) con el valor expandido sugerido por la FDA (0.70 – 1.43) en un solo criterio.

Los autores proponen tres funciones diferentes que se basan en expresiones relacionadas con Michaelis-Menten, Exponencial y Weibull.

$$BELscM - Sup = \pm \log \left[\alpha + (5 - 4 \exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) \left(\frac{\hat{\sigma}_{sc}}{\gamma + \hat{\sigma}_{sc}} \right) \right]$$

$$BELscE - Sup = \pm \log \left[\alpha + (5 - 4 \exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) (1 - \exp\{-\gamma \hat{\sigma}_{sc}\}) \right]$$

$$BELscW - Sup = \pm \log \left[\alpha + (5 - 4 \exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) (1 - \exp\{-(\gamma \hat{\sigma}_{sc})^2\}) \right]$$

donde, α es el parámetro que controla el valor mínimo, β el parámetro que afecta el valor máximo y γ es el parámetro que controla la velocidad de cambio gradual del límite de BE. Se recomiendan los siguientes valores para los parámetros: $\alpha = 1.25$, $\beta = 1.33$ y $\gamma = 4$.

Una posible desventaja de este tipo de límites es precisamente la sobre-parametrización. Estos límites se basan en la necesidad de ser menos estrictos cuando \bar{D} está cercano al cero en comparación a un estudio en el que \bar{D} está cercano al límite de BE.

c.- **Método Kytariolos *et al.*, 2006.**

Kytariolos *et al.*, (2006) ha desarrollado límites de escalamiento que consideran solo la variabilidad. Ellos han considerado que la falla de los límites clásicos de BE, se deben al alto riesgo del productor cuando la variabilidad aumenta. De esta manera, los límites escalados deberían incorporar la magnitud de la variabilidad intrasujeto, modulados como una función de esta magnitud.

En la escala original, el límite superior de BE, tiene la forma general:

$$BEL_{basal} + BE_{ef}(s, u_{lim})$$

Donde, BE_{ef} , se conoce como función de expansión del límite de BE. El término BE_{ef} , es una función de la variabilidad intrasujeto $\hat{\sigma}_{sc}$, y u_{lim} es un valor máximo predefinido para el límite superior. Está afectado por la velocidad de cambio gradual de los límites. El límite basal, por ejemplo, 1.20 o 1.25.

Los autores han considerado dos modelos basados en la función Sigmoidea y Weibull, que permiten formular las siguientes expresiones para el límite superior:

$$BEL_{efscS} = \pm \log \left\{ \alpha + \frac{\beta - \alpha}{1 + \exp \left[- \left(\frac{CV - CV_0}{\gamma} \right) \right]} \right\}$$

$$BEL_{efscW} = \pm \log \left\{ \alpha + (\beta - \alpha) \left(1 - \exp \left[- (\gamma \hat{\sigma}_{sc})^2 \right] \right) \right\}$$

donde, α es el valor mínimo o basal del límite superior en la escala original (1.25 o 1.20), β es el valor máximo o un valor *plateau* del límite superior (1.43 o 1.33), y γ es una constante que controla la velocidad de cambio gradual del límite superior (puede tomar valores del rango de 1 a 8 en el Modelo Sigmoideo y de 1 a 5 en el Modelo Weibull). Los términos CV y CV_0 representan el valor del coeficiente de variación estimado y en el punto de inflexión respectivamente, ambos en la escala original.

Las varianzas se relacionan con los coeficientes de variación correspondientes en la escala logarítmica por medio de la expresión:

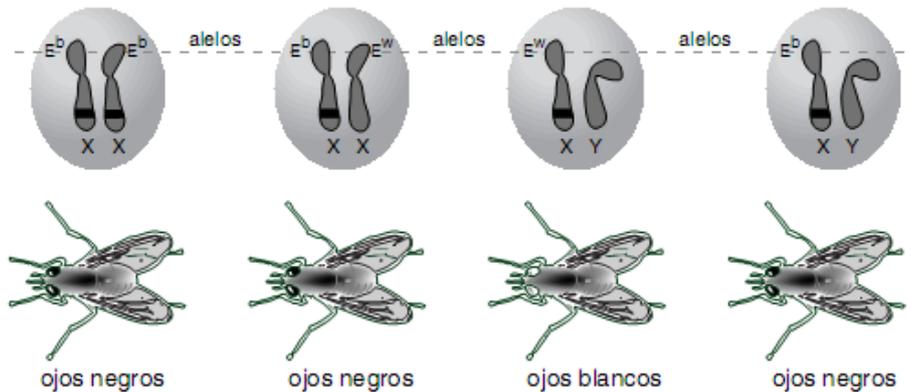
$$CV(\sigma^2) = \sqrt{\exp(\sigma^2) - 1}.$$

Referencias

- Boddy, AW., Snikeris, FC., Kringle, RO., Wei, GCG., Oppermann JA. and Midha, KK. (1996). An approach for widening the bioequivalence acceptance limits in the case of highly variable drugs. *Pharm. Res.* **12**:1865-1868.
- Hsu, J.C. Hwang, G., Liu, H.K., Ruberg, S. Confidence intervals associated with tests for bioequivalence. *Biometrika* **81**:103-114. (1994).
- Karalis, V., Symillides, M. and Macheras, P. (2004). Novel scaled Average Bioequivalence, *Pharm. Res.*, **21**: 1933–942.
- Karalis, V., Macheras, P. and Symillides M. (2005). Geometric mean ratio-dependent scaled bioequivalence limits with levelling-off properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **26**: 54–61.
- Kytariolos J, Karalis V, Macheras P and Symillides M. (2006). Novel Scaled Bioequivalence Limits with Leveling-off Properties. *Pharm. Res.*, **23**:2657-2664.
- Shah, VP., Yacobi, A., Barr, WH., Benet, LZ., Breimer, D., Dobrinska, MR., Endrenyi, L., Fairweather, W., Gillespie, W., Gonzalez, MA., Hooper, J., Jackson, A., Lesko, L., Midha, KK., Noonan, PK., Patnaik R. and Williams RL. (1996). Evaluation of Orally Administered Highly Variable Drugs and Drug Formulations. *Pharm. Res.*, **13**:1590-1594.
- Tothfalusi L, Endrenyi L. (2003). Limits for the Scaled Average Bioequivalence of Highly Variable Drugs and Drug Products. *Pharm. Res.*, **20**:382-389.
- Westlake, WJ. (1976). Symmetrical Confidence Intervals for bioequivalence Trials. *Biometrics*, **32**:741-744.

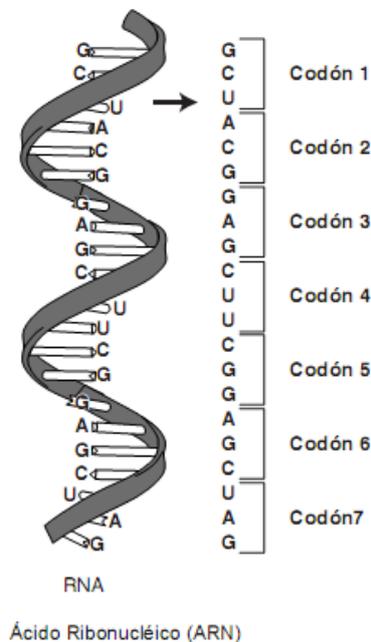
Anexo N°2: Glosario de Terminología Farmacogenética

- **Acervo genético**¹: Todos los alelos presentes en un locus o, mas ampliamente en todos los loci de la población.
- **Alelo**^{1,3,4}: Una de las versiones alternativas de un gen que puede ocupar un locus determinado. (por ejemplo, un locus para el color de ojos, el alelo podría resultar en café o azul). Una de las formas variantes de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma. Diferentes alelos de un gen producen variaciones en las características hereditarias tales como el color del cabello o el tipo de sangre.



- **Alelo Nulo**¹: Alelo que produce ausencia total del producto genético o pérdida total de función fenotípica.
- **Alelo Seudodeficiente**¹: Alelo clínicamente benigno que presenta una reducción de su actividad funcional *in vitro*, pero que tiene suficiente actividad para prevenir la haploinsuficiencia *in vivo*.
- **Alelo Silente**¹: Gen mutante sin efecto fenotípico detectable.
- **Análisis bayesiano**¹: Método matemático ampliamente utilizado en consejo genético para calcular riesgos de recurrencia. Este método combina información de varias fuentes (genéticas, información genealógica y resultados de pruebas) para determinar la probabilidad de que un individuo desarrolle o transmita un determinado trastorno.
- **Análisis de ligamiento**¹: Método estadístico en el que se estudian los genotipos y fenotipos de los progenitores y los hijos de familias para determinar si dos o más loci se separan de manera independiente o muestran ligamiento durante la meiosis.
- **Análisis de ligamiento con modelo**¹: Análisis de ligamiento basado en la asunción de un determinado modelo de herencia para inferir cuándo se han producido entrecruzamientos entre dos loci. También se le denomina *análisis de ligamiento paramétrico*.
- **Análisis de ligamiento multiloci**¹: Método para determinar el orden de tres o más loci mediante el examen de los genotipos de la descendencia de progenitores heterocigotos para esos loci y la determinación de un orden que minimice el número de recombinaciones dobles muy improbables en un intervalo corto.
- **Análisis de ligamiento sin modelo**¹: Análisis de ligamiento que no hace asunciones sobre el modelo de herencia. Esta forma de análisis se basa en determinar si la cantidad de alelos compartidos entre individuos emparentados que comparten o no la enfermedad o rasgo se desvía significativamente de lo que se esperaría por azar. Véase *método del miembro de la genealogía afectado*. También se le denomina *análisis de ligamiento no paramétrico*.

- **Análisis de parejas de hermanos**¹: Forma de análisis de ligamiento sin modelo en el que se examinan parejas de hermanos concordantes o discordantes para un fenotipo o rasgo para determinar si en alguno de una serie de loci a lo largo del genoma comparten más o menos alelos del 50% esperado.
- **Análisis de segregación**¹: Método estadístico que evalúa los fenotipos de individuos en familias para determinar el modelo de herencia más probable de una enfermedad o rasgo.
- **Codón**^{1,4}: Triplete de tres bases de una molécula de ADN o ARN que especifica un aminoácido. Tres bases en una secuencia de ADN o ARN, las cuales especifican un solo aminoácido. Codón es un término que define las palabras que utiliza el ADN para especificar el código genético. El ADN está compuesto por cuatro bases: guanina, adenosina, timina y citosina, las cuales codifican toda la información genética. Las palabras que se usan son de tres letras y están siempre compuestas por tres de esas cuatro bases y pueden traducirse en aminoácidos específicos que son las unidades que forman las proteínas. Así que un codón es la palabra de tres letras que especifica, bien sea el comienzo de una proteína, el final de una proteína o uno de los aminoácidos o unidades.



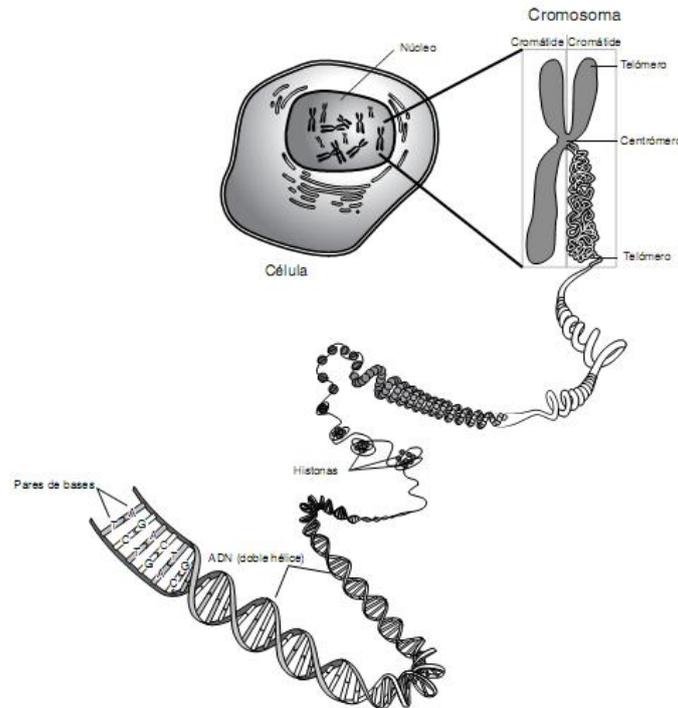
- **Cromosoma**⁴: Un cromosoma es el resultado del empaquetamiento del ADN y las proteínas previo a la división celular para su segregación posterior en las células hijas. Los cromosomas se encuentran en el núcleo de las células y diferentes especies tienen diferente número y morfología de cromosomas. Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas, 46 en total: 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales.

Cada uno de los progenitores aporta un cromosoma a cada par, de manera que los hijos reciben la mitad de los cromosomas de la madre y la mitad del padre. Todas las células vivas almacenan su información genética en estructuras llamadas cromosomas. Los cromosomas están constituidos de ADN y proteínas que están empacadas en forma compacta y al examinarlos microscópicamente parecen un hilo o una soga.

En el caso de las células nucleadas, como la mayoría de las células humanas, los cromosomas están localizados dentro del núcleo. Diferentes organismos tienen distinto número de cromosomas.

Los humanos tenemos 23 pares de cromosomas o sea 46 en total; 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales. Cada progenitor aporta un cromosoma a cada par, así que los hijos adquieren la mitad de sus cromosomas de la madre y la mitad del padre.

De esta manera se crea una nueva combinación genética, que representa la mezcla de ambos padres.



- **Dominante⁴** : Es la condición por la cual un miembro de un par alélico se manifiesta en el fenotipo de un individuo excluyendo la expresión del otro alelo
- **Diploide^{1,2,4}** : El número de cromosomas contenidos en la mayoría de células somáticas, que es el doble del número de cromosomas existente en los gametos. El número diploide de cromosomas en humanos es 46 (serie diploide=2n, con 44 autosomas y dos cromosomas sexuales o gonosomas X-Y). El número de cromosomas en los gametos es de 23 (serie haploide=n).
- **Enzimas⁴** : Son proteínas que catalizan reacciones químicas, generalmente acelerándolas.
- **Enzimas de restricción⁴** : Las enzimas de restricción son las que reconocen una secuencia específica del ADN y cortan en ese sitio.
- **Equilibrio Hardy-Weinberg²** : Cuando una población está en equilibrio Hardy-Weinberg porque cumple con la ley del mismo nombre:

$$(p^2 + 2pq + q^2) = 1$$
- **Expresividad¹** : Intensidad con la que se expresa un defecto genético. Si la expresividad es variable, el rasgo puede variar de leve a grave, pero nunca deja de expresarse en los individuos que tienen el genotipo correspondiente. Se compara con la penetrancia.
- **Farmacogenética¹** : Área de la genética bioquímica que trata las respuestas a fármacos y sus variaciones controladas genéticamente.
- **Farmacogenómica¹** : Aplicación de la información o los métodos de la genómica a los problemas de la farmacogenética.

- **Fenocopia:** individuo con la enfermedad pero sin el gen.
- **Fenotipo**^{2,4}: Es lo que se observa en los individuos. El fenotipo depende de lo que se hereda (genotipo) y de la influencia del medio ambiente, en el amplio sentido: nutrición, dieta, tóxicos, fármacos, elementos físicos, exposiciones ocupacionales, y entorno social. En el caso de características patológicas o de enfermedad, el fenotipo es el conjunto de síntomas y signos característicos.

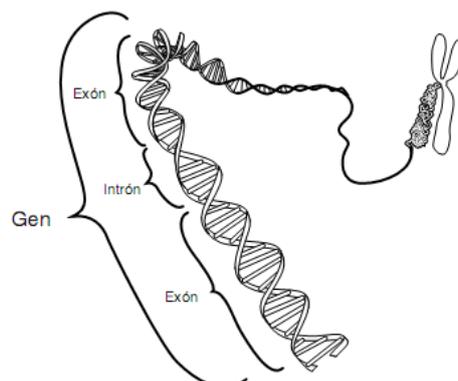
$$\text{Fenotipo}^* = \text{genotipo} + \text{ambiente}$$

**No es la mera suma sino también incluye interacciones.*

En otro sentido más estricto², son las anomalías resultantes de un determinado gen mutante.

Otra definición⁴ más sencilla se refiere a los rasgos o características visibles de un organismo, por ejemplo, el color del cabello, el peso o la presencia o ausencia de una enfermedad. Los rasgos fenotípicos no son necesariamente genéticos.

- **Fenotipo Bombay**⁵: Rasgo genético raro que afecta la expresión fenotípica de los grupos sanguíneos ABO. El gen del antígeno H, que en la forma dominante habitual de HH o Hh condiciona la síntesis del precursor necesario para la producción de los antígenos A y B, es homocigoto recesivo en los sujetos de fenotipo Bombay, de forma que se suprime la expresión de los antígenos A, B y H. Las células de estos sujetos son del grupo 0 fenotípicamente a pesar de tener un genotipo AB y su suero contiene anticuerpos antiA, antiB y antiH. En estos casos dos progenitores del grupo 0 fenotípicamente pueden tener hijos del grupo AB. Este fenómeno es un ejemplo de la interacción compleja de los genes ligados que permiten que un gen de un cromosoma controle la expresión o supresión de otro que no es su alelo. Este rasgo recibe el nombre de la ciudad donde se detectó por primera vez.
- **Gen**^{1,3,4}: Es la unidad física fundamental y funcional de la herencia. Un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos localizados en una posición particular sobre un cromosoma que codifica para un producto funcional específico (por ejemplo, una proteína o molécula de ARN). La unidad física y funcional de la herencia, que se pasa de padres a hijos. Los genes están compuestos por ADN y la mayoría de ellos contiene la información para elaborar una proteína específica. En términos generales se habla de un conjunto de información que lleva consigo una instrucción en particular que generalmente codifica una proteína. El ADN que conforma los genes, almacena la información genética en el núcleo. Existen fragmentos de ADN que no codifican una proteína. Codifican otras moléculas como el ARN estructural y a esos también los debemos denominar genes. Además, se presentan situaciones en las que un fragmento de ADN es capaz de codificar más de una proteína. Entonces, puede haber una confusión en la que no se sabe si se debe hablar de un gen o de varios. Pero en general, se puede decir que un gen es un fragmento de ADN, que puede tener 100 pares de bases o hasta dos millones de pares de bases, como en el caso del gen de la distrofia muscular, el cual codifica una proteína en particular que tiene a su vez una función particular.



- **Gen codominante**⁶: Alelos que se expresan ambos en su totalidad en el heterocigoto.
- **Gen dominante**^{6,7}: (dominant gen) El que tiene expresión fenotípica cuando está presente, tanto en la forma homocigótica como heterocigótica. También es definido como el que produce un efecto fenotípico, tanto si su alelo es idéntico como si es diferente.
- **Gen estructural**⁷: (structural gen) En genética molecular es la unidad de información genética que especifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido.
- **Gen mutante**^{6,7}: (mutant gen) Gen en que la pérdida, la ganancia o el intercambio de material ha producido un cambio transmisible permanente de la función. Dicho gen puede haberse vuelto prácticamente inactivo (amorfo), actuar antagonizando o inhibiendo la actividad normal (antimorfo) o incrementando la actividad normal (hipermorfo), o puede manifestar sólo una reducción ligera de su eficacia (gen de fuga o hipomorfo). También suele definirse como cualquier gen que ha sufrido un cambio, como la pérdida, ganancia o intercambio de material genético, que afecta la transmisión y expresión normal de un rasgo.
- **Gen recesivo**^{6,7}: (recessive gen) Aquel que tiene únicamente expresión fenotípica en el homocigoto o hemicigoto. También suele definirse como el miembro de una pareja de genes que ha perdido su capacidad para expresarse en presencia de su alelo más dominante; solamente se expresa en estado homocigótico.
- **Gen silencioso**⁶: (silent gen) Gen mutante que no tiene efecto fenotípico detectable.
- **Gen de tipo salvaje**^{6,7}: (wild type gen) Alelo normal de un gen, a veces simbolizado mediante +. A veces se denomina natural, y es la forma normal o estándar de un gen en contraste con la forma mutante.
- **Genotipo**^{1,2,4}: El genotipo es lo que hereda un individuo. Combinación de alelos que posee un individuo en un locus:

$$A_1A_1 / A_1A_2 / A_2A_2$$

- Homocigoto: $A_1A_1; A_2A_2$

- Heterocigoto: A_1A_2

También se puede usar otros códigos: $AA/AB/BB$, $AA/Aa/aa$

Otra definición¹, lo puntualiza como la constitución genética de un individuo, que puede distinguirse a partir del fenotipo. El mismo autor señala otra definición más específica, como “los alelos presentes en un locus”.

Otra definición⁴, lo refiere como la identidad genética de un individuo que no se muestra como características externas. El genotipo se refiere a la constitución genética del individuo u organismo, en otras palabras, el genotipo está dado por los alelos localizados en un locus particular de un cromosoma de un individuo.

- **Genoma**⁴: Todo el ADN contenido en un organismo o célula, que incluye tanto los cromosomas dentro del núcleo como el ADN en las mitocondrias
- **Haploide**^{1,2,4}: El número de cromosomas en un gameto normal, que tiene un solo miembro de cada par cromosómico. El número haploide en humanos es 23. También se refiere⁴ al número de cromosomas en un espermatozoide o en un óvulo, o sea la mitad del número diploide. Haploidía es un término que se refiere al número de copias del genoma en una célula determinada. En este caso un genoma haploide significaría solamente una copia del genoma. Normalmente, todas las células de nuestro cuerpo contienen dos copias del genoma, una heredada de cada padre, pero las células del sistema reproductivo, espermatozoides y los óvulos, contienen solamente una copia y a ésta se denomina haploide. Durante la concepción, el espermatozoide combinará su genoma haploide con el del óvulo

también haploide y así se completará toda la información diploide necesaria para la creación de un nuevo individuo.

- **Haploinsuficiencia**^{1,4}: Causa de enfermedad genética en la que la contribución de un alelo normal no es suficiente para prevenir la enfermedad, que es producida por una mutación de pérdida de la función en el otro alelo. Otra definición⁴ se refiere a la situación en la cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal, no es suficiente para garantizar una función normal. Haploinsuficiencia es un término que se emplea cuando el producto de un gen es la mitad del nivel normal. Esto puede presentarse debido a un número de problemas, el más común siendo el que una de las dos copias de un gen falte como producto de una deleción. En otros casos lo que se produce es una mutación en el gen, que altera su estabilidad a nivel de ARN mensajero afectando la producción del mensaje de ese gen que codifica para la proteína en las células.
- **Haplotipo**²: Es un conjunto de alelos localizados en una pequeña región del cromosoma y se caracteriza porque sus alelos se transmiten juntos a través de las generaciones. Es decir, están ligados.
- **Heterocigoto**^{1,3,4}: Individuo o genotipo con dos alelos diferentes en un locus determinado de un par de cromosomas homólogos. Se dice también⁴ que posee dos formas diferentes de un gen en particular; cada una heredada de cada uno de los progenitores. Cada persona tiene 46 cromosomas agrupados en 23 pares. En cualquier par de cromosomas, por ejemplo en el número 4, un miembro del par es heredado del padre y el otro de la madre. Los genes pueden tener variantes en la población, es decir, el mismo gen puede ser levemente diferente de un individuo a otro. Si una persona hereda dos variantes de un gen en un par de cromosomas, uno del padre y uno de la madre, esta persona se denominará heterocigota para ese gen.
- **Homocigoto**^{1,3,4}: Individuo o genotipo con alelos idénticos en un locus determinado de un par de cromosomas homólogos. Se dice⁴ también que posee dos formas idénticas de un gen específico heredadas de cada uno de los progenitores. Una explicación más completa, se refiere a que los seres humanos tenemos 46 cromosomas agrupados en 23 pares. Para cada gen hay dos copias, una de cada miembro del par en un cromosoma determinado. Los genes en la población pueden mostrar variación, es decir diferencias de secuencia de una copia del gen a otra. Si un individuo tiene dos copias idénticas de un gen localizado por ejemplo en ambas copias del cromosoma dos, entonces él es homocigoto para ese gen.
- **Interacción epistática**⁵: Tipo de interacción entre genes situados en distintos loci de un mismo cromosoma que consiste en que cada gen puede enmascarar o suprimir la expresión del otro. El efecto epistático es no-alélico y por lo tanto opuesto a la relación de dominancia, puede deberse a la presencia de factores recesivos homocigóticos en un par de genes como sucede en el fenotipo de Bombay o de un alelo dominante que se contrapone a la expresión de otro gen dominante.
- **Ley de Hardy-Weinberg**^{1,2}: Ley que relaciona la frecuencia génica (alelos) con la frecuencia genotípica (genotipo). Se utiliza en genética de poblaciones para determinar las frecuencias alélicas y de heterocigotos cuando se conoce la incidencia de un trastorno. Si se toma un alelo al azar del pool de alelos se tiene, una probabilidad p de que sea M y una probabilidad q de que sea N . Si se toma un segundo alelo se seguirá cumpliendo la misma probabilidad, luego:
 - La probabilidad de que los dos alelos sean M será p^2 .
 - La probabilidad de que los dos alelos sean N será de q^2 .
 - La probabilidad de que el primero sea M y el segundo N es pq .
 - La probabilidad de que el primero sea N y el segundo sea M es pq

- Globalmente la probabilidad de que el primero y el segundo sean distintos es $2pq$.

Tomar una persona al azar de la población es equivalente a tomar dos alelos al azar del pool génico, donde:

p^2 = es la probabilidad de que una persona sea *MM*,

$2pq$ = es la probabilidad de que sea *MN*,

q^2 = es la probabilidad de que la persona sea *NN*.

A esta relación se la conoce con el nombre de distribución de Hardy-Weinberg:

$$(p^2 + 2pq + q^2) = 1$$

Supuestos:

- Que los individuos de la población se unan en forma aleatoria,
- Que los alelos nuevos mutantes sean iguales a los alelos que desaparecen por muerte,
- Que no haya selección natural,
- Que la población sea grande,
- Que no haya migración de individuos. Es decir que no ha existido inmigración significativa de individuos de una población con frecuencias alélicas muy diferentes a las de la población endógena.

El no cumplimiento de cualquiera de estas hipótesis puede determinar que la población se aleje del equilibrio de Hardy-Weinberg.

- **Locus**^{1,3,4} (plural: *loci*): La posición que ocupa un gen en un cromosoma. El locus puede estar ocupado por diferentes formas del gen (alelos). El lugar del cromosoma donde está localizado un gen específico, es la dirección física del gen.

Nuestros cromosomas contienen entre 30 y 40 mil genes, distribuidos en los 23 pares de cromosomas. El locus es el sitio de un cromosoma donde se localiza un gen determinado. En otras palabras, es la dirección de este gen.

- **Lod score**¹: Método estadístico que utiliza los marcadores genéticos en familia para determinar si dos loci están ligados. El *lod score* es el logaritmo de la probabilidad a favor del ligamiento. Por convención se acepta que un lod score de 3 (probabilidad de 1000:1 a favor) es prueba de ligamiento y un lod score de -2 (100: 1 en contra) es prueba de que los loci no están ligados.
- **Mapa genético**⁴: Conocido también como mapa de ligamiento, es un mapa de marcadores polimórficos que define las distancias por los eventos de recombinación ocurridos en la región cromosómica que los contiene. Se refiere a los cromosomas de una especie, que muestra la posición de sus genes conocidos o de los marcadores correspondientes.

Un mapa genético, conocido también como un mapa de vínculos, describe las posiciones de los marcadores genéticos a lo largo de una cadena de ADN.

Los marcadores genéticos reflejan las secuencias de ADN que difieren entre los distintos individuos. Los marcadores genéticos se conocen también como polimorfismos, que van desde diferencias en la secuencia que produce fenotipos identificables hasta diferencias más inocentes en la secuencia, que no tienen un efecto notorio en un individuo.

Estas diferencias en la secuencia están esparcidas en nuestro ADN y sirven como base para construir mapas genéticos detallados del genoma. Estos mapas son importantes en estudios genéticos, por ejemplo para buscar genes asociados con una enfermedad o detectar variaciones entre individuos.

- **Mapeo genico**⁴: Mapa basado en las posiciones relativas de los genes en un cromosoma y de la distancia entre ellos. La elaboración de los mapas génicos consiste en determinar las posiciones relativas de los genes en un cromosoma y la distancia entre ellos.

Los mapas de genes pueden ser "mapas genéticos o de ligamiento", los cuales determinan una distancia estadística entre dos genes, o pueden ser un "mapa físico", el cual determina la distancia entre dos genes por los nucleótidos o pares de bases del ADN. Ambos son útiles y generalmente se hace primero un mapa de ligamiento y luego un mapa físico en el proceso de clonado posicional o el aislamiento génico de las enfermedades humanas hereditarias.

- **Marcador**⁴: Una mutación recesiva requiere doble dosis del gen mutado. Así que si se tiene un gen mutado, para que haya una mutación recesiva se necesita heredar una copia del padre y una copia de la madre, para que ese defecto se manifieste.

Otra forma en que esto podría suceder es que un sujeto tuviera una sola copia del gen mutado y una copia de un gen normal, pero, por ejemplo en el cáncer, a través de la división celular, podría perder todo el cromosoma que tiene la versión normal, de manera que sólo le quedaría la versión mutada del gen. Eso también se considera recesivo y es un término más específico para la pérdida de la heterocigosis.

Un marcador o marcador genético es un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear en una familia. Un marcador puede ser un gen o puede ser un fragmento de ADN sin función conocida.

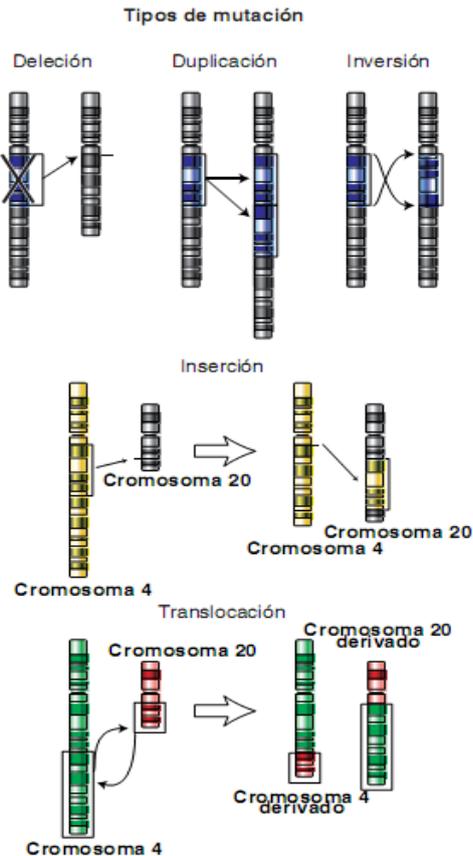
Los marcadores se usan a menudo como una forma indirecta de rastrear el patrón hereditario de un gen que no ha sido identificado todavía y cuya ubicación aproximada se desconoce. Los marcadores se usan para el mapeo genético como el primer paso para encontrar la posición e identidad de un gen.

- **Marcador genético**⁴: Un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce.
- **Mutación**^{1,2,4}: Cualquier cambio permanente heredable en la secuencia del ADN genómico. También, se considera como un proceso que genera cambios heredables en el ADN, ya sea que se trate de grandes cambios como la pérdida de todo un cromosoma entero, o bien, de pequeños cambios denominados habitualmente mutaciones puntuales.

Otra definición⁴ se refiere a una alteración estructural permanente en el ADN. En la mayoría de los casos, tales cambios en el ADN pueden no tener ningún efecto, o por el contrario causar daño, pero en ocasiones una mutación puede mejorar la probabilidad de supervivencia de un organismo y pasar el cambio positivo a sus descendientes.

El término mutación también se refiere a un cambio o alteración en el ADN. Cuando la gente oye la palabra mutación, generalmente piensa en un evento negativo, algo que es nocivo. Sin embargo, hay algunos cambios o alteraciones en el ADN que pueden ser beneficiosos.

Las mutaciones pueden no tener ningún impacto sobre la función de un órgano o sistema o pueden en cambio causar problemas.

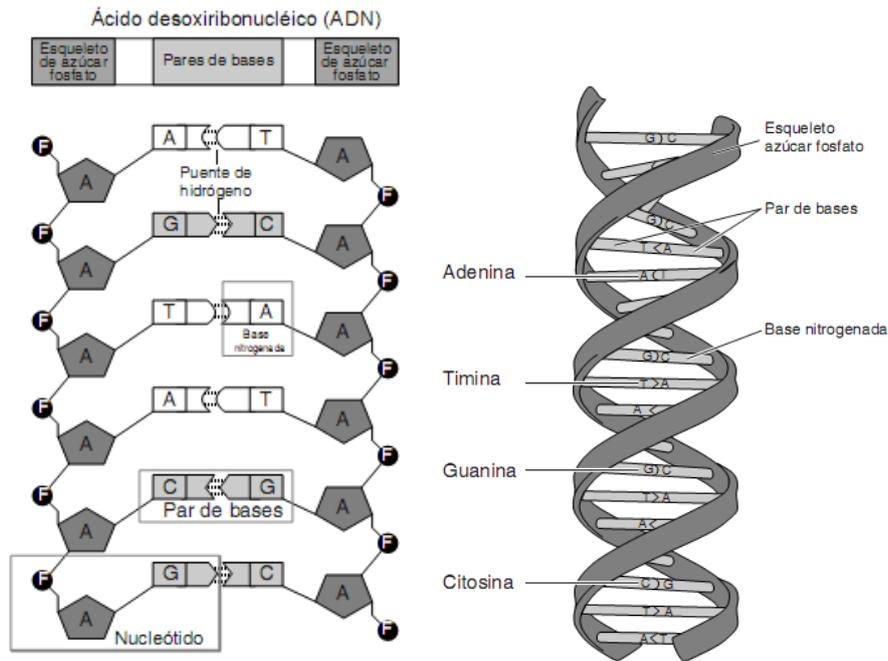


- **Odds¹:** Razón de probabilidades o riesgos. Suele calcularse como una razón entre la probabilidad de que se produzca el acontecimiento y al probabilidad de que no se produzca, para evaluar la probabilidad relativa del acontecimiento. Las odds pueden variar entre cero e infinito.
- **Par de Bases⁴:** Dos bases que forman un "peldaño de la escalera del ADN". Un nucleótido del ADN está compuesto por una molécula de azúcar, una molécula de ácido fosfórico y una base nitrogenada. Las bases son las "letras" del código genético.

En el ADN, las letras del código son A, T, G y C, que corresponden a adenina, timina, guanina y citosina respectivamente. Al formar los pares, la adenina siempre se une a timina y la guanina siempre se une a citosina. Imaginemos que el ADN consta de dos cadenas que se enrollan entre sí formando una escalera en espiral. Cada peldaño de esa escalera está compuesta por un par de bases, que son moléculas aromáticas y el ADN tiene cuatro tipos: adenina, citosina, guanina y timina.

Cada base en una de las cadenas de ADN se empareja específicamente con otra base en la cadena opuesta, para formar el peldaño de la escalera. La adenina siempre se empareja con la timina y la guanina siempre lo hace con la citosina. Los pares de bases se utilizan con frecuencia como medida de la longitud de un fragmento de ADN.

Por ejemplo, si un fragmento de ADN tiene 500 pares de bases de largo, eso significa que está compuesto por dos cadenas de ADN, cada una de las cuales tiene 500 nucleótidos que están emparejados con los 500 nucleótidos de la otra cadena, para formar 500 pares de bases.



- **Penetrancia**^{1,2,3}: Fracción de individuos con un genotipo del que se sabe que causa una enfermedad que presentan signos o síntomas de dicha enfermedad. También, se le considera como la probabilidad de que un gen o rasgo genético se haya expresado. La “penetrancia completa” significa que el gen o genes están expresados en toda la población que tiene los genes, es decir, es del 100%.

La “penetrancia incompleta” significa que el rasgo genético se expresa en sólo una parte de la población, es decir, menos del 100%. El porcentaje de penetrancia puede también cambiar con el rango de edad de la población.

También, se puede utilizar el término “penetrancia” de un genotipo (combinación de alelos en un locus concreto). Para referirse al porcentaje de individuos que, poseyendo este genotipo, expresan la enfermedad.

Es posible decir que las mutaciones con alta penetrancia (ejemplo, 90-100%) son causa de enfermedad, mientras que las mutaciones de baja penetrancia (ejemplo 1-10%), que además, suelen ser muy prevalentes en la población, sólo se comportan como factores de riesgo.

- **Polimorfismo**^{1,2,4}: Presencia en la población de dos o más genotipos alternativos, cada uno de los cuales presenta una frecuencia mayor que la que podría ser mantenida sólo por una mutación recurrente. De forma arbitraria se considera polimorfismo cualquier locus cuyo alelo menos frecuente tenga una frecuencia de la menos 0.01, de manera que la frecuencia de homocigotos sería de 0.02. Cualquier alelo menos frecuente se considera una variante rara. También se puede decir que es la existencia de dos o más alelos de un gen presentes en una población, en una frecuencia significativa.

Un polimorfismo es un sitio a lo largo de la secuencia del ADN donde distintas personas pueden tener secuencias diferentes. Puede tratarse de la sustitución de una simple letra, por ejemplo, donde en un sujeto hay una **G** y en otro hay una **T**. O también, puede ser más complicado y donde hay una secuencia repetida, un sujeto tenga veinte copias y otro 18.

En resumen, es un sitio en el ADN donde hay una variación común entre individuos. Los cambios poco frecuentes en general no se llaman polimorfismos. Tienen que presentarse en una frecuencia de al menos uno por ciento para llenar el requisito de esta definición.

- **Polimorfismo benigno**¹: Polimorfismo cuyos diferentes fenotipos son todos clínicamente normales, como por ejemplo el del grupo sanguíneo ABO.
- **Polimorfismo de nucleótido único (SNP)**^{1,4}: Polimorfismo en la secuencia de ADN que consiste en la variación de una sola base. Son variaciones comunes de una sola base que ocurren en el ADN humano con una frecuencia aproximada de 1 en cada 1000 bases. Estas variaciones se pueden emplear para rastrear patrones de herencia familiar.

Los polimorfismos de un solo nucleótido se conocen también por su sigla en inglés SNIP. Estos polimorfismos son un tipo importante de variación en el genoma humano. La mayoría de las variaciones entre individuos son de este tipo, o sea que una sola letra que podría ser una T en una persona y es una G en otra.

Se cree que hay aproximadamente 10 millones de estos polimorfismos que son comunes en la especie humana. Así que diez millones de posiciones a lo largo del genoma de tres mil millones de pares de bases tienen variaciones comunes.

Esto es significativo porque permite rastrear la herencia en familias y algunos de esos polimorfismos son funcionalmente importantes y probablemente cambian la forma en que el genoma se comporta y de hecho una pequeña fracción de ellos juega un papel en la susceptibilidad a enfermedades. De manera, que se está haciendo un gran esfuerzo para desarrollar un catálogo de SNPs, con el fin de descubrir las causas de enfermedades comunes como la diabetes, la enfermedad cardíaca o la esquizofrenia.

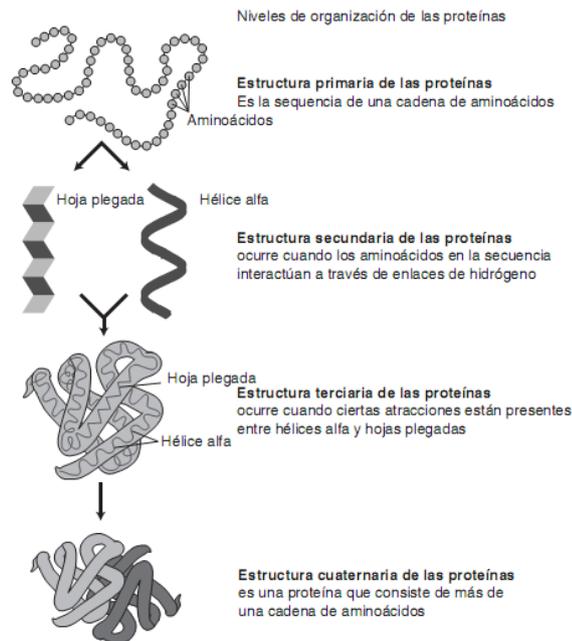
- **Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP)**¹: Diferencia polimórfica en la secuencia de ADN entre individuos que puede ser reconocida por endonucleasas de restricción.

Otros autores se refieren al **Polimorfismo de longitud de fragmentos de repetición (RFLP)**⁴ como las variaciones en las bases nitrogenadas en el sitio donde una enzima de restricción corta un segmento de ADN. Estas variaciones afectan el tamaño de los fragmentos que resultan del corte. Los RFLP se pueden utilizar como marcadores en la construcción de mapas físicos y de ligamiento. RFLP, es la sigla en inglés para Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción.

Básicamente ésta es una variación en la secuencia del ADN que afecta el que una enzima en particular corte o no el ADN en esa posición. Tiene que tratarse de un sitio polimórfico, así que algunas personas lo tienen y otras no.

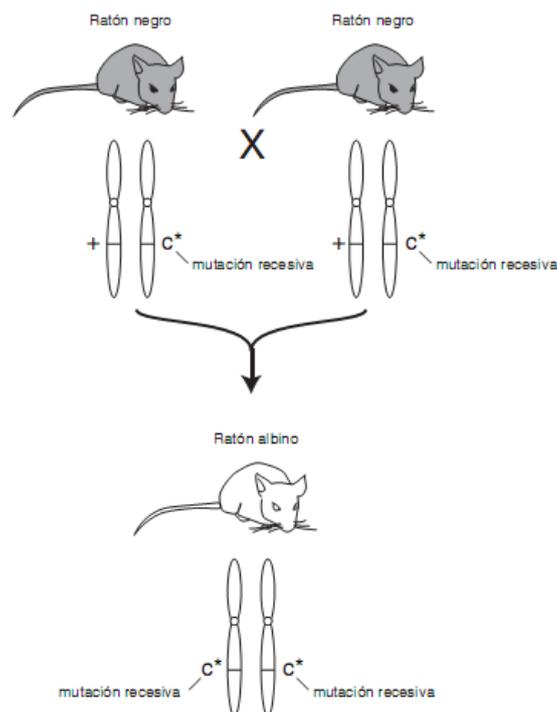
En la década del 80, cuando la forma principal de estudiar la variación humana era por medio de enzimas de restricción, los RFLP reinaban soberanos. Pero todo eso ha cambiado con el advenimiento de la PCR. La mayoría de los científicos ya no usan RFLP para estudiar la variación humana, sino que miran las secuencias en una forma más precisa, usando polimorfismos de un solo nucleótido (snips) o microsatélites.

- **Polimorfismo de tándem corto de repetición (STRP)**¹: Locus polimórfico formado de un número variable de unidades bi, tri o tetranucleotídicas repetidas en tándem como, por ejemplo, (TG)_n, (CAA)_n o (GATA)_n. Los distintos alelos están constituidos por diferentes números de unidades. También denominado *marcador microsatélite*.
- **Polimorfismo equilibrado**¹: Polimorfismo que se mantiene en la población debido a la ventaja del heterocigoto, que permite que un alelo persista con una frecuencia relativamente elevada en la población aunque sea deletéreo en estado homocigoto.
- **Proteína**⁴: Una molécula compuesta por una o más cadenas de aminoácidos. Las proteínas desempeñan una amplia gama de actividades vitales en la célula.



- **Recesivo**⁴: Es el término aplicado al miembro de un par alélico imposibilitado de manifestarse cuando el alelo dominante está presente. Para que este alelo se observe en el fenotipo debe estar presente en doble dosis, proveniente uno de la madre y otro del padre. Una mutación recesiva requiere doble dosis del gen mutado. Así es que, si un sujeto tiene un gen mutado, para que tenga una mutación recesiva necesita heredar una copia de su padre y una copia de su madre, para que ese defecto se manifieste.

Otra forma en que esto podría suceder es que un sujeto tuviera una sola copia del gen mutado y una copia de un gen normal, pero, por ejemplo en el cáncer, a través de la división celular, podría perder todo el cromosoma que tiene la versión normal, de manera que sólo le quedaría la versión mutada del gen. Eso también se considera recesivo y es un término más específico para la pérdida de la heterocigosis.



- **Razón de odds**¹: Comparación de las odds de que individuos que comparten un determinado factor (por ejemplo, un genotipo, una enfermedad ambiental o un fármaco) desarrollen una enfermedad o rasgo frente a las odds de los individuos que no presentan el factor. En individuos en los que el factor está presente, la odds de estar afectada es igual a (a/c) . En individuos en los que el factor no está presente, la odds de estar afectada es igual a (b/d) , y la razón de odds es igual a $\frac{(a/c)}{(b/d)}$

	Factor presente	Factor ausente	Total
Afectados	a	b	$a + b$
No Afectados	c	d	$c + d$
Total	$a + c$	$b + d$	$a + b + c + d$

- **Razón de riesgos relativos**¹: En trastornos complejos, el riesgo de que una enfermedad aparezca en un pariente de una persona afectada comparado con el riesgo de que aparezca en cualquier persona de la población general.
- **Riesgo**¹: Es la probabilidad de que ocurra un acontecimiento. Con frecuencia se calcula dividiendo el número de veces que ocurre un acontecimiento por el número total de oportunidades que tiene el acontecimiento de producirse. Como todas las probabilidades, el riesgo varía entre 0 y 1.
- **Riesgo Relativo**¹: Comparación del riesgo de padecer una enfermedad o presentar un rasgo en individuos que comparten un determinado factor (como el genotipo, una exposición ambiental o un fármaco) frente al riesgo en individuos sin ese factor. El riesgo de estar afectado en individuos con el factor es: $(a/(a+c))$, el riesgo de estar afectado sin el factor es $(b/(b+d))$, y el riesgo relativo es igual a $\text{riesgo relativo} = (a/(a+c)) / (b/(b+d)) = \frac{a(b+d)}{b(a+c)}$. Notar que el riesgo relativo es $\approx (ad/bc)$, la razón de odds, cuando la enfermedad es relativamente rara ($b \ll d$ y $a \ll c$).

	Factor presente	Factor ausente	Total
Afectados	a	b	$a + b$
No Afectados	c	d	$c + d$
Total	$a + c$	$b + d$	$a + b + c + d$

Referencias

1. Nussbaum R, McInnes RR, Willard H. 2008. "Thompson & Thompson. Genética en Medicina". Editorial Masson, 7a. edición. 2008.
2. Oliva R, Ballesta F, Oriola J, Clària J. 2003. "Genética Médica". Ediciones Universitat de Barcelona, 2003. N°71.
3. http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/glossary/glossary_g.shtml [Acceso 16 Junio 2009].
4. <http://www.genome.gov/sglossary.cfm> [Acceso 16 Junio 2009]
5. Diccionario de Medicina Océano Mosby. 1994. Océano Grupo Editorial S.A.
6. Dorland. 2000. Diccionario Enciclopédico ilustrado de Medicina, 29ª. Edición, Tomo I Mc. Graw Hill – Interamericana, Madrid.
7. Diccionario Mosby. 2003. Medicina, Enfermería Y Ciencias De La Salud. Volumen I. 6ª. Edición. Elsevier Science. Madrid.

Anexo N°3: Material suplementario revista SORT

Ocaña, J., Sánchez, M.P., Sánchez, A. and Carrasco, J.L. "On equivalence and bioequivalence testing", *SORT*, 32(2):151-176, 2008.

Supplementary material to Ocaña, J., Sánchez, M.P., Sánchez, A. and Carrasco, J.L. "On equivalence and bioequivalence testing", *SORT*, 32(2), 2008¹

Scaling the bioequivalence limits

In its more general form (Tothfalusi and Endrenyi, 2003), the method of linearly scaling the bioequivalence limits combines the usual model to establish ABE, based on fixed bioequivalence limits (*BEL*):

$$-\theta < \phi < \theta,$$

with a scaled model:

$$-k\sigma_{sc} < \phi < k\sigma_{sc}$$

where σ_{sc}^2 is a variance used as a scaling factor. In crossover two-period studies the scaling factor is the residual variance, $\sigma_{sc}^2 = \sigma^2$. According to a preset regulatory variability limit, σ_0^2 , ABE is evaluated using fixed bioequivalence limits if its variance is not greater than σ_0^2 and using scaled bioequivalence limits otherwise. That is, the scaled limits (*BEL_{sc}*) in the original scale are:

$$BEL_{sc} = \begin{cases} \mp\theta & \text{if } \sigma_{sc}^2 \leq \sigma_0^2 \\ \mp k\sigma_{sc} & \text{if } \sigma_{sc}^2 > \sigma_0^2. \end{cases} \quad (1)$$

In order to avoid discontinuities in the ABE limits when taken as a function of σ_{sc}^2 , the regulatory variability limit σ_0 and the proportionality constant k , which should have the form $k = \theta/\sigma_0$, must be adequately chosen. A possible choice is

$\sigma_0 = 0.2$, recommended in the case of individual BE by the FDA guidance

CDER(2001). Then the proportionality constant becomes $k = \ln(1.25)/0.2 = 1.116$.

Other possibilities are $\sigma_0 = 0.22314$, recommended by Boddy et al. (1995) with $k = 1$, or $\sigma_0 = 0.294$ (Shah et al., 1996) with $k = 0.759$. This last possibility corresponds to an ANOVA-CV threshold of 30%, that defines the condition for a high variability drug.

In addition to the arbitrary choice of the "switching" variability, σ_0 , the scaling variance must be estimated. As a consequence, different bioequivalence limits will be calculated for each individual study. The decision as to whether using constant or scaled limits is taken on the basis of a (random) variability estimate. And obviously, for a sufficiently large estimated variance, bioequivalence will be declared for \bar{D} values far from the usual bioequivalence limits, a similar criticism to that one made to Berger and Hsu (1996) method.

To alleviate the arbitrariness of these criteria, Karalis et al. (2004) developed scaled BE limits incorporating variability and the constraint that the estimated formulation effect should not greatly exceed ± 223 . The general form of these limits is:

$$\mp(k_1\sigma_{sc} + k_2 \log(1.25)) \quad (2)$$

where k_1 is a proportionality factor and k_2 is a "constraint" factor taking into account the maximum point estimate permitting ABE declaration. Different choices of k_1 and k_2

¹ All numeric references to formulae correspond to this paper

define different methods for specifying the limits, including fixed limits and scaling like the BEL_{sc} introduced previously.

Among the possible choices for k_1 and k_2 two possibilities defining the methods labelled as BEL_{scG1} and BEL_{scG2} in Karalis et al. (2004) are:

Method	k_1	k_2
BEL_{scG1}	$(5-4\exp(\bar{D})) 0.496$	1
BEL_{scG2}	$(3-2\exp(\bar{D})) 0.496$	$(3-2\exp(\bar{D}))$

More precisely:

$$\begin{aligned} BEL_{scG1} &= \mp \left[(5-4\exp(\bar{D})) 0.496 \hat{\sigma}_{sc} \right] + \log(1.25) \\ BEL_{scG2} &= \mp (3-2\exp(\bar{D})) \left[0.496 \hat{\sigma}_{sc} + \log(1.25) \right]. \end{aligned} \quad (3)$$

These equations are applied when $\bar{D} \geq 0$, otherwise $-\bar{D}$ is used to calculate the limits. Additionally, Karalis et al. (2005) proposed limits scaling with variability but only up to a \bar{D} -dependent plateau value, combining the classic (0.80-1.25) with the FDA expanded (0.70-1.43) limits into a single criterion. The authors proposed three different functions, based on Michaelis-Menten, Exponential and Weibull type expressions:

$$\begin{aligned} UpperBEL_{scM} &= \pm \log \left[\alpha + (5-4\exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) \left(\frac{\hat{\sigma}_{sc}}{\gamma + \hat{\sigma}_{sc}} \right) \right] \\ UpperBEL_{scE} &= \pm \log \left[\alpha + (5-4\exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) (1 - \exp\{-\gamma \hat{\sigma}_{sc}\}) \right] \\ UpperBEL_{scW} &= \pm \log \left[\alpha + (5-4\exp(\bar{D})) + (\beta - \alpha) (1 - \exp\{-(\gamma \hat{\sigma}_{sc})^2\}) \right] \end{aligned} \quad (4)$$

where α is the parameter controlling the minimum value, β the parameter that affects the maximum value and γ is the parameter that controls the rate of gradual change of the BE limit. A recommended choice of parameter values is $\alpha = 1.25$, $\beta = 1.33$ and $\gamma = 4$.

A possible disadvantage of these limits is precisely its over-parameterization. They are based on the need for the limits to be less strict for a study with \bar{D} around zero in comparison to a study in which \bar{D} is close to the bioequivalence limit. Kytariolos et al. (2006) developed limits based only on variability considerations. They considered that the failure of the classic unscaled limits was due to the high producer risk as variability increases. Thus, scaled BE limits should incorporate the magnitude of intrasubject variability, levelling off as a function of this magnitude. In the original scale, the upper bioequivalence limit has the general form:

$$basal\ BEL + BE_{ef}(s, u_{lim})$$

where, BE_{ef} is known as the *bioequivalence limit expansion function*. The BE_{ef} is a function of intrasubject variability $\hat{\sigma}_{sc}$, and a predefined maximum value for the upper limit, u_{lim} . It affects the rate of gradual change of the limits. The basal limit is a minimum basal value, e.g. 1.20 or 1.25. Two model functions, the Sigmoid and the Weibull, were considered by the authors, giving rise to the following expressions for the upper limits:

$$\begin{aligned}
 BEL_{\sigma^2 SC S} &= \pm \log \left\{ \alpha + \frac{\beta - \alpha}{1 + \exp \left[- \left(\frac{CV - CV_0}{\gamma} \right) \right]} \right\} \\
 BEL_{\sigma^2 SC W} &= \pm \log \left\{ \alpha + (\beta - \alpha) \left(1 - \exp \left[- (\gamma \hat{\sigma}_{SC})^2 \right] \right) \right\}
 \end{aligned} \tag{5}$$

where α is the minimum or basal value of the upper limits in the original scale (1.25 or 1.20), β is the maximum or *plateau* value of the upper limit (1.43 or 1.33), and γ is a constant controlling the *rate* of gradual change of the upper limit (1 to 8 in the Sigmoid Model and 1 to 5 in the Weibull model). The terms CV and CV_0 represent the estimated coefficient of variation and at the inflection point, respectively, both in the original scale. They are related to the corresponding variances in the logarithmic scale by means of (19) in Ocaña et al. (2008).

An example of HV drug study

Sánchez et al. (2008) illustrate the use of the preceding methods in Furosemide data (Furosemide 40 mg tablets, generic, as the test formulation vs. LASIX 40 mg, Aventis® as the reference formulation) coming from a randomized 2×2 crossover trial performed with $N = 16$ healthy individuals. The ANOVA estimated coefficient of variation for C_{max} was 36.67%, which seems to confirm that this diuretic is a HV drug with respect to this pharmacokinetic measure. The direct drug effect estimate for $\log C_{max}$ was

$\bar{D} = -0.1599$ with $\widehat{se}_{\bar{D}} = 0.1256$. According to these values, the Schuirmann's TOST

procedure lower and upper p -values were 0.0043 and 0.3112, respectively.

Bioequivalence can't be declared due to the lack of rejection of one of the one-sided null hypotheses associated to the TOST procedure. Equivalently, the shortest 90% confidence interval is [68.3, 106.3], not included in the bioequivalence limits [80, 125].

A similar conclusion is reached using the 95% confidence intervals (13), (15) or (16), with values [68.3, 106.3], [68.3, 146.5] and [68.3, 106.3], respectively. Note also that there will be a similar conclusion if the widened (up to fixed values) bioequivalence limits [70, 143] (FDA proposal) or [75, 133] (EMEA proposal) were used.

The arbitrariness in the choice of the proportionality constant k in the scaled limits (20) is illustrated by the fact that for $k = 1.116$, the resulting equivalence limits are [67.3, 148.6] and bioequivalence should be declared, no matter the confidence interval type, while the opposite conclusion should be drawn under other possibilities ($k = 1$ or 0.759).

The results with the scaled bioequivalence approach (21) are more coherent. The noncentral Student's t confidence interval (23) is [-3.24, 0.39]. For $k = 1.116$, 1 and 0.759 the corresponding bioequivalence limits are [-3.16, 3.16], [-2.83, 2.83] and [-2.15, 2.15]. Then, it is not possible to declare bioequivalence, irrespective of the choice of k .

References

- Berger, R.L. and Hsu, J.C. (1996). Bioequivalence trials, intersection-union tests and equivalence confidence sets. *Statistical Science*, 11, 283-319.
- Boddy, A.W., Snikeris, F.C., Kringle, R.O., Wei, G.C.G., Oppermann J.A. and Midha, K.K. (1995). An approach for widening the bioequivalence acceptance limits in the case of highly variable drugs. *Pharmaceutical Research*, 12, 1865-1868.

- CDER, Center for Drug Evaluation and Research (2001). *Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence*. Rockville, MD: Food and Drug Administration. www.fda.gov/cder/guidance/3616fn1.htm#P353_2704
- Karalis, V., Symillides, M. and Macheras, P. (2004). Novel scaled Average Bioequivalence. *Pharmaceutical Research*, 21, 1933–942.
- Karalis, V., Macheras, P. and Symillides M. (2005). Geometric mean ratio-dependent scaled bioequivalence limits with levelling-off properties. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 54–61.
- Kytariolos, J., Karalis, V., Macheras, P. and Symillides M. (2006). Novel scaled bioequivalence limits with leveling-off properties. *Pharmaceutical Research*, 23, 2657–2664.
- Sánchez, P., Gómez C., Carrasco J.L., Ocaña, J., Von Plessing, C., Godoy, C.G., Reinbach, R., Godoy, R. (2008). Evaluating Average Bioequivalence using methods for high variability drugs: A case study. *Submitted*.
- Shah, V.P., Yacobi, A., Barr, W.H., Benet, L.Z., Breimer, D., Dobrinska, M.R., Endrenyi, L., Fairweather, W., Gillespie, W., Gonzalez, M.A., Hooper, J., Jackson, A., Lesko, L., Midha, K.K., Noonan, P.K., Patnaik R. and Williams R.L. (1996). Evaluation of Orally Administered Highly Variable Drugs and Drug Formulations. *Pharmaceutical Research*, 13, 1590-1594.
- Tothfalusi, L. and Endrenyi, L. (2003). Limits for the scaled average bioequivalence of highly variable drugs and drug products. *Pharmaceutical Research*, 20, 382-389.

Anexo N°4: Material Suplementario revista Chemometrics and Intelligent Laboratory System

Jordi Ocaña, Gloria Frutos, Ma. Pilar Sánchez O. "Using the similarity factor f_2 in practice. A critical revision and suggestions for its standard error estimation". Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2009, **99**(1):49–56.

Statistical complements to: *Using the Similarity Factor f_2 in Practice. A Critical Revision and Some Improvements*

The response variable in dissolutions assays, x_{jk} , is the cumulative percentage dissolved from tablet or unit k ($k = 1, \dots, n$), at sampling time t_j ($j = 1, \dots, P$) of the test or reference batch, ($i = T, R$). These observations may be collected in a three-way array, $\mathbf{x} = (x_{ijk})_{i=T,R; j=1..P; k=1..n}$.

The (sample) similarity factor is defined as:

$$\hat{f}_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P (R_j - T_j)^2 \right]^{-1/2} \cdot 100 \right\} \quad (1)$$

where $R_j = (\sum_{k=1}^n x_{Rjk} / n)$ and $T_j = (\sum_{k=1}^n x_{Tjk} / n)$ correspond to the sample means for all tablets at time point j , for the reference and test batches, respectively.

The sample f_2 and all indexes considered here are functions of the average differences

$\hat{\delta} = (\hat{\delta}_1, \dots, \hat{\delta}_P)$ with $\hat{\delta}_j = R_j - T_j$. For brevity, we will express all these indexes in terms of $\hat{\delta}$ and of

$$d(\hat{\delta}) = 1 + \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P \hat{\delta}_j^2. \quad (2)$$

For example, the sample f_2 becomes $\hat{f}_2 = 50 \log \left\{ \left[d(\hat{\delta}) \right]^{-1/2} \cdot 100 \right\} = 100 - 25 \log \{ d(\hat{\delta}) \}$.

Note that the variance of the $\hat{\delta}_j$ differences can be estimated by:

$$\widehat{\text{var}}(\hat{\delta}_j) = (s_{Rj}^2 + s_{Tj}^2) / n \quad (3)$$

where s_{Rj}^2 and s_{Tj}^2 are the unbiased estimates of the variance for all data at the j -th time point, for the reference and test batches, respectively.

\hat{f}_2 is an estimate of the *true* f_2 parameter:

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{P} \sum_{j=1}^P (\mu_{Tj} - \mu_{Rj})^2 \right]^{-1/2} \cdot 100 \right\} \quad (4)$$

where μ_{Tj} and μ_{Rj} correspond to the *true* "population" means.

Methods based on Taylor series expansions

First, remember that \hat{f}_2 can be expressed in the easiest, more convenient way:

$$\begin{aligned} f_2 &= f_2(\hat{\delta}) = 100 - 25 \log [d(\hat{\delta})] \\ \hat{f}_2 &= \hat{f}_2(\hat{\delta}) = 100 - 25 \log [d(\hat{\delta})]. \end{aligned} \quad (5)$$

The general form of the Taylor series expansion of a function of P variables, like f_2 , up to second order is:

$$f_2(\hat{\delta}_1, \dots, \hat{\delta}_P) = f_2(\delta_1, \dots, \delta_P) + \sum_{j=1}^P \frac{\partial f_2}{\partial \delta_j} \Big|_{\delta_j = \delta_j} (\hat{\delta}_j - \delta_j) + \frac{1}{2} \sum_{j=1}^P \sum_{r=1}^P \frac{\partial^2 f_2}{\partial \delta_j \partial \delta_r} \Big|_{\delta_j = \delta_j, \delta_r = \delta_r} (\hat{\delta}_j - \delta_j)(\hat{\delta}_r - \delta_r) \quad (6)$$

The first order partial derivatives of d are:

$$\frac{\partial d(\hat{\boldsymbol{\delta}})}{\partial \delta_j} = \frac{2}{P} \hat{\delta}_j. \quad (7)$$

Then, the first order partial derivatives of f_2 are:

$$\frac{\partial f_2(\hat{\boldsymbol{\delta}})}{\partial \hat{\delta}_j} = -25 \log(e) \frac{1}{d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \frac{\partial d(\hat{\boldsymbol{\delta}})}{\partial \delta_j} = -\frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \hat{\delta}_j \quad (8)$$

and, deriving again (8) with respect to $\hat{\delta}_j$

$$\frac{\partial^2 f_2(\hat{\boldsymbol{\delta}})}{\partial \hat{\delta}_j^2} = -\left(\frac{100 \log(e)}{(P d(\hat{\boldsymbol{\delta}}))^2} \hat{\delta}_j^2 + \frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \right) \quad (9)$$

and respect to $\hat{\delta}_r$, for $j \neq r$,

$$\frac{\partial^2 f_2(\hat{\boldsymbol{\delta}})}{\partial \hat{\delta}_j \partial \hat{\delta}_r} = -\frac{100 \log(e)}{(P d(\hat{\boldsymbol{\delta}}))^2} \hat{\delta}_j \hat{\delta}_r. \quad (10)$$

Substituting these derivatives in (6) we obtain:

$$\begin{aligned} \hat{f}_2 = f_2 + \sum_{j=1}^P \left\{ -\frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \hat{\delta}_j (\hat{\delta}_j - \delta_j) \right\} + \\ \frac{1}{2} \left[\sum_{j=1}^P \left\{ -\left(\frac{100 \log(e)}{(P d(\hat{\boldsymbol{\delta}}))^2} \hat{\delta}_j^2 + \frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \right) (\hat{\delta}_j - \delta_j)^2 \right\} + 2 \sum_{j=1}^P \sum_{r=1}^{j-1} \left\{ -\frac{100 \log(e)}{(P d(\hat{\boldsymbol{\delta}}))^2} \hat{\delta}_j \hat{\delta}_r (\hat{\delta}_j - \delta_j) (\hat{\delta}_r - \delta_r) \right\} \right] \end{aligned} \quad (11)$$

And after some rearrangement:

$$\hat{f}_2 = f_2 - \frac{25 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \left(2 \sum_{j=1}^P \delta_j (\hat{\delta}_j - \delta_j) - \sum_{j=1}^P (\hat{\delta}_j - \delta_j)^2 + \frac{2}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P \sum_{r=1}^{j-1} \delta_j \delta_r (\hat{\delta}_j - \delta_j) (\hat{\delta}_r - \delta_r) \right) \quad (12)$$

Bias correction

As $E(\delta_j(\hat{\delta}_j - \delta_j)) = \delta_j E(\hat{\delta}_j - \delta_j) = 0$, we have

$$\begin{aligned} \text{bias}(\hat{f}_2) = E(\hat{f}_2) - f_2 = \\ \frac{25 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P E(\hat{\delta}_j - \delta_j)^2 - \frac{50}{P^2 d^2(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P \sum_{r=1}^{j-1} \delta_j \delta_r E\{(\hat{\delta}_j - \delta_j)(\hat{\delta}_r - \delta_r)\} = \\ \frac{25 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P (\sigma_{\hat{\eta}_j}^2 + \sigma_{\hat{R}_j}^2) / n - \frac{50}{P^2 d^2(\hat{\boldsymbol{\delta}})} (\boldsymbol{\delta}' \boldsymbol{\Sigma} \boldsymbol{\delta}) / n. \end{aligned} \quad (13)$$

where $\boldsymbol{\Sigma}/n$ is de covariance matrix of the sample mean differences vector,

$$\text{cov}(\hat{\boldsymbol{\delta}}) = \boldsymbol{\Sigma} = (\boldsymbol{\Sigma}_T + \boldsymbol{\Sigma}_R) / n, \text{ with } \boldsymbol{\Sigma}_T = \text{cov}(\mathbf{x}_T) \text{ and } \boldsymbol{\Sigma}_R = \text{cov}(\mathbf{x}_R) \quad (14)$$

with $\text{diag}(\boldsymbol{\Sigma}_T) = (\sigma_{T1}^2, \dots, \sigma_{Tp}^2)'$ and $\text{diag}(\boldsymbol{\Sigma}_R) = (\sigma_{R1}^2, \dots, \sigma_{Rp}^2)'$.

Substituting the unknown parameters by their estimators, we have the following (possibly) bias-corrected estimator of f_2 :

$$\begin{aligned} \hat{f}_{2,bc} &= \hat{f}_2 - \frac{25 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P (s_{Tj}^2 + s_{Rj}^2) / n + \frac{50}{P^2 d^2(\hat{\boldsymbol{\delta}})} (\hat{\boldsymbol{\delta}}' \mathbf{S} \hat{\boldsymbol{\delta}}) / n = \\ &100 - 25 \left[\log(d(\hat{\boldsymbol{\delta}})) + \frac{\log(e)}{nP d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \left\{ \sum_{j=1}^P (s_{Tj}^2 + s_{Rj}^2) - \frac{2}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} (\hat{\boldsymbol{\delta}}' \mathbf{S} \hat{\boldsymbol{\delta}}) \right\} \right] = \\ &100 - 25 \left[\log(d(\hat{\boldsymbol{\delta}})) + \frac{\log(e)}{nP d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \left\{ \text{trace}(\mathbf{S}) - \frac{2}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} (\hat{\boldsymbol{\delta}}' \mathbf{S} \hat{\boldsymbol{\delta}}) \right\} \right] \end{aligned} \quad (15)$$

where $\mathbf{S} = \mathbf{S}_T + \mathbf{S}_R$ and $\mathbf{S}_T, \mathbf{S}_R$ are the unbiased estimators of the corresponding covariance matrices.

Standard error estimation

From (12) and considering only the first order approximation, we have:

$$\begin{aligned} \text{var}(\hat{f}_2) &= \text{var} \left\{ -\frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sum_{j=1}^P \delta_j (\hat{\delta}_j - \delta_j) \right\} = \\ &\left(\frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \right)^2 \sum_{j=1}^P \sum_{j'=1}^P \delta_j \delta_{j'} \text{cov}(\hat{\delta}_j, \hat{\delta}_{j'}) = \left(\frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \right)^2 \boldsymbol{\delta}' \boldsymbol{\Sigma} \boldsymbol{\delta} \\ \text{se}(\hat{f}_2) &= \frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sqrt{\boldsymbol{\delta}' \boldsymbol{\Sigma} \boldsymbol{\delta}} \end{aligned} \quad (16)$$

and substituting the unknown parameters by their estimators we obtain the delta-method standard error estimator:

$$\widehat{\text{se}}_{\Delta} = \frac{50 \log(e)}{P d(\hat{\boldsymbol{\delta}})} \sqrt{\hat{\boldsymbol{\delta}}' \mathbf{S} \hat{\boldsymbol{\delta}}}. \quad (17)$$

Jackknife estimators¹

If $\hat{\theta}_N = \hat{\theta}(x_1, \dots, x_N)$ stands for an estimator of a parameter θ based on N independent data, and $\hat{\theta}_{-j} = \hat{\theta}(x_1, \dots, x_{j-1}, x_{j+1}, \dots, x_N)$ stands for the same estimator but computed with all data except the j -th observation, the jackknife estimators of bias, the bias-corrected $\hat{\theta}_N$ and the standard error are, respectively:

$$\begin{aligned} \widehat{\text{bias}}_J(\hat{\theta}_N) &= (N-1)(\hat{\theta}_{\cdot} - \hat{\theta}_N) \\ \hat{\theta}_J &= \hat{\theta}_N - \widehat{\text{bias}}_J(\hat{\theta}_N) = N\hat{\theta}_{\cdot} - (N-1)\hat{\theta}_N \\ \text{se}_J &= \sqrt{\frac{N-1}{N} \sum_{j=1}^N (\hat{\theta}_{-j} - \hat{\theta}_{\cdot})^2} \end{aligned} \quad (18)$$

with

$$\hat{\theta}_\bullet = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \hat{\theta}_{-j} \quad (19)$$

Bias correction

Denote $\hat{f}_{2,-Tj}$, for $j = 1 \dots n$, the value of statistic \hat{f}_2 when it is computed using all the data except the complete dissolution profile j of batch T , and denote similarly $\hat{f}_{2,-Rj}$, for $j = 1 \dots n$ in R . (This produces unbalanced batches to compare, which is not a problem.) Then, the jackknife estimator of bias and the bias corrected \hat{f}_2 are, respectively

$$\begin{aligned} \widehat{\text{bias}}_j(\hat{f}_2) &= (2n-1)(\hat{f}_{2\bullet} - \hat{f}_2) \\ \hat{f}_{2,\text{bc}} &= \hat{f}_2 - \widehat{\text{bias}}_j(\hat{f}_2) = 2n\hat{f}_{2\bullet} - (2n-1)\hat{f}_2 \end{aligned} \quad (20)$$

where

$$\hat{f}_{2\bullet} = \frac{1}{2n} \left(\sum_{j=1}^n \hat{f}_{2T-j} + \sum_{j=1}^n \hat{f}_{2R-j} \right) \quad (21)$$

is the average of all the $N = 2n$ values \hat{f}_{2-j} .

Standard error estimation

According to the above notation, we directly obtain expression the expression for $\widehat{\text{se}}_j$.

Bootstrap method

The bootstrap method² is based in approximating the true distribution $H = H(F)$,

$H(v) = \Pr_F\{\hat{f}_2 \leq v\}$, of the statistic of interest (say \hat{f}_2), that depends on the distribution of data,

F , by means of $H_n = H(F_n)$, $H_n(v) = \Pr_{F_n}\{\hat{f}_2 \leq v\}$, where F_n is a suitable estimation of the true F .

Usually, H_n itself is approximated by means of simulation, generating a *large* number B (2000 in the simulation study reported below), of (pseudo)data sets from F_n . These datasets have the same structure (sample size...) than the original sample. Over each one of the generated

datasets, \mathbf{x}^* , the statistic is evaluated (say $\hat{f}_2^* = \hat{f}_2(\mathbf{x}^*)$) producing a *large* sample

$\hat{f}_2^*(1), \hat{f}_2^*(2), \dots, \hat{f}_2^*(B)$ of statistic values. The empirical distribution H^* associated to these B

values approximates H_n , $H_n(v) = \Pr_{F_n}\{\hat{f}_2 \leq v\} = H^*(v) = \Pr\{\hat{f}_2^* \leq v\}$ or any of its characteristics,

like the expectation $E_{F_n}(\hat{f}_2) = E^*(\hat{f}_2^*) = \frac{1}{B} \sum_{b=1}^B \hat{f}_2^*(b)$. In this paper, F_n is taken as the distribution

with density assigning probability $1/n$ to each observed dissolution profile in the T batch and also $1/n$ to each observed dissolution profile in the R batch. Thus, in the simulation step, the datasets are generated taking separately n dissolution profiles from each batch of the original data, with equiprobability and replacement.

Here, the \hat{f}_2^* correspond to bootstrap replicates of \hat{f}_2 and should not be confused with the bias-corrected estimator defined in³.

Appendix references

1. Tukey JW. Bias and confidence in not quite large samples (Abstract). *Ann Math Statist* 29: 614 (1958).
2. Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Statist* 7: 1-26 (1979).
3. Liu JP, Ma, MC, Chow, SC. Statistical evaluation of similarity factor f_2 as a criterion for assessment of similarity between dissolution profiles. *Drug Information Journal* 31: 1255-1271 (1997).