



Facultad de Ciencias
Instituto de Estadística
Ingeniería en Estadística

**Tamaño muestral mínimo de un diseño
experimental cruzado aleatorizado para estudios
de bioequivalencia *in vivo* mediante simulación**

Trabajo de titulación para optar al:
Grado académico: Licenciado en Estadística
Título profesional: Ingeniero en estadística
Minor: Bioestadística

Diego Iván Pérez Fuentes

Profesor guía:

Carlos Henríquez Roldán, Ph.D.

Profesor co-guía:

Alexis Aceituno Álvarez, Ph.D.

Valparaíso, Chile, 28 de Diciembre de 2021

Agradecimientos

A lo largo de este camino, quiero agradecer profundamente a mis padres, Julio y Maria, quienes me inculcaron valores para ser una persona de bien. A mis familiares y amigos que siempre me apoyaron de forma incondicional durante todos estos años.

A mi profesor guía, Dr. Carlos Henríquez, quien me ayudó a cumplir mis sueños, quien me apoyó desde un principio, doy gracias por sus consejos y no solo académicos, sino de la vida. También por las enseñanzas, las críticas y la paciencia.

A mi profesor Co-guía Dr. Alexis Aceituno, quien confió en mí y en mis capacidades, siempre tuvo muy buena disposición en ayudarme, en cualquier duda que surgiera en el camino.

También quiero agradecer a todos los profesores, que tuve el gusto de conocer, quiero distinguir a algunos profesores que dejaron una huella en mi paso universitario, La profesora Daira Velandia, Claudia Navarro, el profesor German Ibacache, Harvey Rosas, entre otros ...

A lo largo de estos años, tuve momentos muy difíciles a nivel personal, afortunadamente siempre fui capaz de superar, todo esto fue gracias a una gran promesa que hice un día, hacia mi padre, que ya trascendió:

Te prometo que algún día seré un profesional.

Resumen

Los estudios de biodisponibilidad (BA) y bioequivalencia (BE) permiten demostrar si un producto genérico o de prueba tiene el mismo desempeño terapéutico que un producto de referencia ya establecido en el mercado. La importancia de la bioequivalencia es permitir que una mayor cantidad de personas tengan acceso a medicamentos, de forma alternativa al original y con un costo inferior. Una gran problemática para los estudios de bioequivalencia es el cálculo del tamaño muestra, consiste en determinar una cantidad de voluntarios necesarios para garantizar si existe verdaderamente una equivalencia terapéutica. En Chile, el Instituto de Salud Pública (ISP) recomienda utilizar 12 voluntarios como mínimo para establecer los estudios de bioequivalencia para fármacos de baja variabilidad a partir de un diseño cruzado aleatorizado.

En el presente trabajo de titulación se estudiará dos conjuntos de datos reales encriptados por motivos de estudio y confiabilidad del laboratorio. Estos conjuntos de datos fueron estudiados una agencia regulatoria nacional (ARN), quienes determinaron que los fármacos son de baja variabilidad. El primer conjunto, denominado como Conjunto A, contiene 28 voluntarios y un total de 952 observaciones, el segundo conjunto, denominado Conjunto B, contiene 20 voluntarios y un total de 880 observaciones. Ambos conjuntos de datos provienen de un diseño experimental cruzado aleatorizado, donde miden la concentración de los medicamentos administrados en distintos intervalos de tiempo. El análisis estadístico proviene a partir de los parámetros farmacocinéticos que son obtenidos en el estudio de biodisponibilidad. Se considera la utilización de un modelo lineal mixto, que permite incluir el efecto aleatorio producido por cada uno de los voluntarios. Mediante el análisis de varianza, se determinará si existen problemas tanto en el nivel de concentración del medicamento y si hay un efecto *carryover* o residual presente en el modelo. Para determinar si existe bioequivalencia los parámetros farmacocinéticos AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} deben estar dentro de los límites preestablecidos recomendados por el ISP. Se utilizará los métodos de inclusión de intervalos y la prueba *TOST*.

La determinación del tamaño de muestra a partir de los coeficientes de variación intra-sujeto del parámetro $\ln(C_{max})$. Se utilizará el método propuesto por Chow (2017), para diseños cruzados aleatorizado con una interacción aleatoria, se basa en disminuir la probabilidad de cometer error tipo II; es decir, rechazar bioequivalencia cuando en fármaco de prueba no es bioequivalente.

En la etapa de simulación se considera un población de 5000 voluntarios a partir del $\ln(AUC_{0-t})$ del conjunto A. Se simularán 100 muestras para distintos tamaños muestrales y se contarán la cantidad de veces en que es aprobada la bioequivalencia. Finalmente, para establecer bioequivalencia mediante simulación, el investigador debe asignar un promedio de aceptación de bioequivalencia, suficientemente grande para evitar cometer el error tipo II.

Abreviaciones

ABE	Bioequivalencia promedio
ARN	Agencia regulatoria nacional
AUC	Área bajo la curva de la concentración- tiempo
BA	Biodisponibilidad
BE	Bioequivalencia
CIIP	Principio de inclusión de intervalos
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración plasmática máxima
CV_{wr}	Coefficiente de variación del tratamiento de referencia
EMA	<i>European medicine agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
IC	Intervalos de confianza
IMC	Índice de masa corporal
M.L.M	Modelo lineal mixto
M.L.M.G	Modelo lineal mixto generalizado
OPS	Organización Panamericana de la Salud
R	Fármaco de referencia
T	Fármaco de prueba
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima

TOST *two one sided test*

Índice general

Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
1. Introducción	1
1.1. Revisión bibliográfica	1
1.2. Contexto y motivación	3
1.3. Planteamiento del problema	3
1.4. Objetivos	4
1.5. Hipótesis	4
2. Bioequivalencia	5
2.1. Introducción	5
2.2. Criterios de bioequivalencia	6
2.3. Participantes	7
2.4. Diseño de los estudios de bioequivalencia	8
2.4.1. Diseño cruzado aleatorizado	8
2.5. Efecto <i>Carryover</i>	9
3. Biodisponibilidad	10
3.1. Curva de concentración plasmática	11
3.2. Parámetros farmacocinéticos	12

3.3. Regla del trapecio	13
4. Modelo estadístico	15
4.1. Modelo lineal mixto	15
4.2. Estimación por Máxima Verosimilitud Restringida (REML)	18
4.3. Análisis de varianza	19
4.4. Prueba t de Student para datos pareados	20
4.5. Suma de rangos de Wilcoxon	22
5. Prueba de bioequivalencia	23
5.1. Principio de inclusión de intervalos	25
5.2. Prueba bioequivalencia de dos caras (<i>TOST</i>)	26
6. Tamaños de muestra	27
6.1. Errores tipo I y de tipo II	27
6.2. Determinación del tamaño muestral mediante el coeficiente de variación	28
7. Estudio estadístico	30
7.1. Conjunto de datos	30
7.2. Curva de concentración plasmática	38
7.3. Parámetros farmacocinéticos	44
7.4. Modelo lineal mixto	49
7.4.1. Validación de los supuestos del modelo	52
7.5. Prueba de bioequivalencia promedio	53
8. Simulación	54
8.1. Determinación del tamaño de muestra mediante el coeficiente de variación	54
8.2. Determinación del tamaño de muestra mediante simulación	56
9. Conclusión del estudio	59

9.1. Discusión	60
10. Referencias	61
11. Anexo	63

Índice de tablas

2.1. Ejemplo del diseño cruzado aleatorizado.	8
5.1. Errores de tipo I y II para bioequivalencia	24
7.1. Sistema de Casificación Biofarmacéutica.	30
7.2. Estructura de datos del “Conjunto A”.	32
7.3. Estructura de datos del “Conjunto B”.	33
7.4. Concentraciones plasmáticas v/s el tiempo post-administración en 28 voluntarios sanos para las formulaciones T y R.	34
7.5. Concentraciones plasmáticas v/s el tiempo post-administración en 20 voluntarios sanos para las formulaciones T y R.	36
7.6. Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de prueba del conjunto A.	45
7.7. Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de referencia del conjunto A.	46
7.8. Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de prueba del conjunto B.	47
7.9. Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de referencia del conjunto B.	48
7.10. Estructura de los datos para la utilización del modelo lineal mixto. . .	49
7.11. Análisis de varianza para los parámetros farmacocinéticos del conjunto A.	50
7.12. Análisis de varianza para los parámetros farmacocinéticos del conjunto B.	51
7.13. Resumen de la validación de los supuestos de los modelos ajustados. .	52
7.14. Pruebas de bioequivalencia promedio $IC_{90\%}$ y TOST.	53

8.1. Coeficientes originales y simulados del modelo lineal mixto $\ln(AUC_{0-t})$.	56
8.2. simulación de una población de 5000 voluntarios de diseño cruzado aleatorizado.	56
8.3. Promedio de aprobación de bioequivalencia de 100 simulaciones para cada tamaño de muestra.	58

Índice de figuras

3.1. Curva de la concentración plasmática.	11
3.2. Regla del trapecio.	13
3.3. Regla de los trapecios.	14
4.1. Región de no rechazo y de rechazo.	21
7.1. Curva de concentración plasmática individual para el conjunto A. . .	38
7.2. Curva de concentración plasmática individual para el conjunto B. . .	39
7.3. Curva de concentración plasmática promedio del primer período. . .	40
7.4. Curva de concentración plasmática promedio del segundo período. . .	40
7.5. Curva de concentración plasmática promedio del primer período. . .	41
7.6. Curva de concentración plasmática promedio del segundo período. . .	41
7.7. Curva de concentración plasmática promedio y intervalos de confianza del 95 % en el conjunto A.	42
7.8. Curva de concentración plasmática promedio y intervalos de confianza del 95 % en el conjunto B.	43

Capítulo 1

Introducción

1.1. Revisión bibliográfica

La ley española define un medicamento genérico como: “La especialidad con la misma forma farmacéutica e igual composición cualitativa y cuantitativa en sustancias medicinales que otra especialidad de referencia, cuyo perfil de seguridad y eficacia este suficientemente establecido por su continuado uso clínico”. El medicamento genérico debe demostrar la equivalencia terapéutica mediante estudios de bioequivalencia dado que es la metodología aceptada por todas las agencias normativas de los países desarrollados (Estévez-Carrizo, 2000).

Un estudio de biodisponibilidad (BA) consiste en medir el grado de velocidad y absorción del medicamento vía oral, además se encarga disminuir todos aquellos procesos que puedan perjudicar la absorción de las formulaciones. .^{El} estudio de biodisponibilidad relativa de dos formulaciones contiene la combinación de medicamentos de paracetamol, fenilefrina y clorfeniramina, estudio realizado por una sola dosis, aleatorizado abierto, *crossover* con factor de formulación de 3 niveles y parcialmente replicado”. La evaluación utiliza intervalos de confianza del 90 % para el cociente de medias geométrica en relación con los medicamentos de referencia y de prueba para los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de la concentración promedio de medicamento, la concentración máxima ($C_{máx}$) y el área bajo la curva AUC que están comprendidos entre el 80 % y 125 % (Santos *et al.*, 2020).

La metodología estadística aplicada a bioequivalencia, debe estar regida por las pautas regulatorias vigentes de las autoridades de salud tales como *Food and Drug Administration*(*FDA*) y *European medicine agency* (*EMA*). EL principio de inclusión de intervalos de confianza es el método frecuentemente utilizado para garantizar la equi-

valencia terapéutica, donde la incorporación del tamaño muestral adecuado demuestra ser de gran ayuda para la certificación de seguridad y eficacia del medicamento. El análisis estadístico varía dependiendo de la complejidad del diseño y la cantidad de formulaciones administradas en la circulación sistémica de los voluntarios en estudio (Hauschke, Steinijans y Pigeot, 2007).

El modelo asociado para estos tipos de diseños cruzados aleatorizados por lo general, uno de los modelos utilizados es un modelo lineal mixto. Este modelo considera que la variable respuesta es en transformación logarítmica de los parámetros farmacocinéticos $C_{máx}$ o AUC , además considera un efecto aleatorio correspondiente a la variabilidad que provoca cada voluntario, también puede incorporar el efecto *carry-over* o de arrastre que ocurre cuando existe una concentración residual generada en el primer período, antes de la administración del segundo medicamento en el segundo período (Chow, S., Liu, J, 2008).

Los estudios de bioequivalencia exitosos permiten que la población obtenga un mayor alcance a los medicamentos, dado que se reducirían los precios. Este tipo de estudios se realiza a través de “diseños experimentales, por lo que existe la necesidad de establecer un adecuado tamaño de muestra para la investigación.” El diseño cruzado aleatorizado es uno de los tipos de diseños experimentales más comunes para estudios de bioequivalencia, donde por lo general, se utilizan voluntarios clínicamente sanos. “En los Estudios de Bioequivalencia se requiere establecer el cálculo del tamaño de muestra; sin embargo, no hay un consenso metodológico que establezca cómo realizarlo.” así, una de las consideraciones para la estimación del tamaño de muestra es la utilización del coeficiente de variación (CV%) intra-sujeto, el cual es tomado directamente del análisis de varianza (Batista-Diéguez, 2018).

El Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) contempla un protocolo para evitar que se generen posibles efectos en los resultados de los estudios donde considera el tamaño muestral para cualquier estudio de bioequivalencia. “El número de sujetos de investigación evaluables no debe ser menor a 12 y se debe especificar previamente en el protocolo y en el informe, considerando posibles retiradas de los sujetos.” En el cálculo se determina considerando un error tipo I (α) menor o igual a un 5% y una potencia estadística no menos a un 80%, con un intervalo de confianza del 90% de la razón de las medias geométrica dentro de los límites de equivalencia (Instituto de Salud Pública de Chile, 2019).

1.2. Contexto y motivación

Los estudios de bioequivalencia (BE) son esenciales a la hora de inferir la equivalencia terapéutica entre un medicamento genérico (prueba) y un medicamento de referencia (innovador). En el presente trabajo se describe el proceso de bioequivalencia *in vivo*, para comprender la importancia del tamaño muestral para la certificación según el protocolo vigente de las autoridades de salud, mediante simulaciones y los procedimientos estadísticos necesarios para comprobar la BE.

1.3. Planteamiento del problema

Los productos certificados como bioequivalentes permiten que la población objetivo tenga un mayor acceso a medicamentos, típicamente a precios más asequibles que el original. Los estudios de BE se realizan a través de diseños experimentales, en consecuencia, uno de los experimentos mayormente utilizado para medicamentos con baja variabilidad es el diseño cruzado (*crossover*) aleatorizado. En este diseño se incorpora un medicamento de referencia (R) y uno de prueba o innovador (T). De esta manera, los voluntarios seleccionados se dividen en dos grupos de forma aleatoria, en cada grupo se administra un medicamento de entrada (R o T) y después de un periodo de reposo se administra el medicamento opuesto. De esta forma, es posible medir la concentración del fármaco y estimar los parámetros farmacocinéticos, los cuales son utilizados posteriormente para determinar si el producto de prueba es intercambiable con el medicamento de referencia.

Establecer el tamaño muestral adecuado es una gran problemática para estudios de BE, es imprescindible a la hora de detectar diferencias entre tratamientos atribuibles al producto y evitar conclusiones erróneas de equivalencia terapéutica.

1.4. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

Objetivo general

- Establecer el tamaño de muestral mínimo para estudios de bioequivalencia *in vivo* a partir de un diseño cruzado aleatorizado que garantice la calidad, seguridad y eficacia de un medicamento genérico.

Objetivos específicos

1. Realizar un exhaustivo análisis de la literatura científica de estudios de bioequivalencia y reglamentación vigente nacional e internacional.
2. Analizar y comparar los medicamentos a través de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia promedio.
3. Determinar un modelo apropiado para un diseño cruzado aleatorizado.
4. Replicar mediante simulación el diseño cruzado aleatorizado para determinar el tamaño muestral.

1.5. Hipótesis

Se postula que los estudios de bioequivalencia *in vivo* entre dos formulaciones, requiere una cantidad de voluntarios mayor al recomendado por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), quien señala que 12 voluntarios es la cantidad mínima requerida.

Capítulo 2

Bioequivalencia

2.1. Introducción

Los costos de los medicamentos se han incrementado y, por consiguiente, este aspecto se ha convertido en un punto de interés en las políticas sanitarias, por ello surgió la necesidad de la bioequivalencia (BE). De esta manera reducir los gastos farmacéuticos y permitir que la población objetivo obtenga un mayor acceso a tratamientos terapéuticos.

Una de las maneras de limitar los gastos farmacéuticos de los pacientes es la existencia de medicamentos originales, o de referencia, y otros fármacos llamados genéricos o de prueba. Los medicamentos genéricos suelen tener un menor costo que los originales establecidos en el mercado durante el periodo de protección de patente o de exclusividad.

La BE es un estudio comparativo mediante el cual es posible certificar que un medicamento genérico es intercambiable con uno original o de referencia en términos de calidad, eficacia y seguridad. Es una medida comparativa respecto a la formulación farmacéutica, en términos de la velocidad y la cantidad de principio activo que es absorbido desde el tracto gastrointestinal y que se refleja en los niveles plasmáticos después de la administración del fármaco.

- Medicamento original (referencia): Es aquel medicamento que pertenece al laboratorio fabricante, con patente vigente.
- medicamento genérico (prueba): Es un medicamento, creado con finalidad de obtener el mismo efecto terapéutico y la misma dosificación que un medicamento de marca ya comercializado.

Un medicamento genérico es un fármaco que contiene un principio activo, ya conocido y previamente desarrollado, inventado por otros investigadores. El costo de este tipo de productos es menor que el de los originales porque su desarrollo y comercialización es mucho más sencilla. Todo lo dicho implica que no se tiene que demostrar su eficacia y seguridad en largos y costosos ensayos clínicos. Con todo ello, los fabricantes de los medicamentos genéricos tienen que demostrar que su formulación contiene el mismo principio activo que el original y que el medicamento genérico se comporta en el organismo de la misma manera, es decir, se debe demostrar su bioequivalencia.

2.2. Criterios de bioequivalencia

Las normativas de bioequivalencia y biodisponibilidad realizadas por las autoridades de salud a través de agencias regulatorias que fijan las condiciones para el registro de productos farmacéuticos son los encargados de garantizar la seguridad y la eficacia.

Los criterios de BE permiten facilitar la toma de decisión respecto a la intercambiabilidad farmacéutica. Sin embargo, hay diferentes puntos de vista según cada agencia regulatoria, las más reconocidas en Chile son; El Instituto de Salud Pública (ISP), *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA).

- *Food and Drug Administration* (FDA): Establece un enfoque para la determinación BE, denominada bioequivalencia promedio (ABE), e implica un intervalo de confianza 90 % para las razones de las medias geométricas de los productos de referencia y de prueba. Además surgen recomendaciones específicas para el uso de la transformación logarítmica.
- *European Medicines Agency* (EMA): La evaluación de BE se basa en intervalos de confianza del 90 % para las diferencias de las medias geométricas (prueba/referencia) para los parámetros considerados, este método es equivalente a *two one-sided test* (TOST), dos pruebas unilaterales con la hipótesis nula de bioequivalencia a un nivel de significancia del 5 %. Los parámetros farmacocinéticos considerados deben analizarse mediante ANOVA con los datos transformados logarítmicamente.
- Instituto de Salud Pública (ISP): La normativa chilena dice que “Para establecer la BE promedio de fármacos que no poseen características farmacocinéticas y clínicas complejas, el intervalo de confianza de 90 % debe estar dentro de los límites de BE de 80 a 125 %, para la razón de medias del AUC del producto en estudio respecto del producto de referencia”.

Los estudios que garantizan la BE corresponden a estudios de biodisponibilidad (BA), Bioequivalencia promedio (*ABE*) y bioequivalencia *in vitro*.

2.3. Participantes

Los ensayos clínicos se caracterizan por la evaluación experimental de un producto, medicamento o sustancia terapéutica que puede ser empleada en seres humanos. El ensayo clínico consiste en la comparación de dos o varios de grupos de sujetos en estudio, usando dos o más tratamientos para determinar beneficios reales que permitan garantizar la seguridad y eficacia.

La selección de voluntarios para el estudio de bioequivalencia debe basarse en criterios de inclusión, por ejemplo, los sujetos sean mayores de edad con la capacidad de dar su consentimiento libre e informado del participante en el estudio. En general, los estudios de bioequivalencia son realizados en voluntarios sanos dado que tienen la ventaja de entregar resultados menos variables comparados a estudios realizados en pacientes no sanos. Es preferible que el grupo de voluntarios sea balanceado que incluya a personas de ambos sexos a menos que el medicamento en estudio sea exclusivo para un solo sexo, la edad debe estar entre 18 y 55 años, el peso en un rango de normalidad para su sexo y edad, donde su índice de masa corporal (IMC) cuente con valores entre 19 y 30.

Los voluntarios no deberán tener antecedentes de abuso de drogas y/o alcohol, y con preferencia a no fumadores. Además, no deben haber sido sometidos a ningún tipo de cirugía digestiva. Cada voluntario será examinado por un médico que asegure el buen estado de salud.

El estudio de BE también debe incluir criterios de exclusión, tales como hipersensibilidad al fármaco, historial de enfermedades relevantes, antecedentes cirugía gástrica, mujeres embarazadas y/o amamantadoras, terapia farmacológica, abuso alcohol y drogas, donación o pérdida de sangre, test positivo VIH, Hepatitis B y C, por historial de desmayo por extracción de sangre y por último, no haber participado en ensayos clínicos en al menos 3 meses previos al inicio del estudio.

2.4. Diseño de los estudios de bioequivalencia

La realización de un ensayo de bioequivalencia semi-replicado o replicado por lo general considera solo fármacos de alta variabilidad intraindividual, dado que permite la posibilidad de ampliar los márgenes de aceptación de los intervalos de confianza para los parámetros en estudio. Este tipo de diseños permite conocer la variabilidad intrasujeto del medicamento de referencia o de ambos medicamentos.

La elección correcta del diseño del estudio debe tomar en cuenta las características farmacocinéticas del fármaco y, por otro lado, minimizar la variabilidad que no es atribuible a los efectos de la formulación. Es posible minimizar los riesgos del efecto *Carryover*, considerando un tiempo de depuración hasta 6 veces la vida útil del fármaco.

2.4.1. Diseño cruzado aleatorizado

Los diseños cruzados aleatorizados son un tipo de experimento de medidas repetidas, donde los distintos tratamientos son aplicados en periodos de tiempo sucesivos a las unidades experimentales. Éstos han demostrado ser eficaces en una amplia gama de aplicaciones, y en particular, en ensayos clínicos.

Tabla 2.1: Ejemplo del diseño cruzado aleatorizado.

	Período 1	Lavado	Período 2
Secuencia 1 (n1)	Fármaco de Referencia		Fármaco de Prueba
		Depuración o Carryover	
Secuencia 2 (n2)	Fármaco de Prueba		Fármaco de Referencia

En la Tabla 2.1 se representa un diseño cruzado aleatorizado, donde cada voluntario es asignado aleatoriamente a una de dos secuencias, n1 y n2 representan la cantidad de voluntarios en la secuencia, la secuencia representa el orden de la administración de los

fármacos. Los periodos representan el tiempo de la administración de los fármacos, una vez aplicado el primer período hay un tiempo de lavado para limpiar el efecto residual, este tiempo de depuración puede llegar a ser hasta 6 veces la vida útil del fármaco, esto hace que el efecto *carryover* o residual es muy poco probable que ocurra. Además, el efecto *carryover* solo puede presentarse en el segundo período.

2.5. Efecto *Carryover*

Es el efecto persistente del fármaco, se produce cuando el tiempo entre cada tratamiento no es el adecuado para que el cuerpo se limpie del efecto del tratamiento aplicado anteriormente. Normalmente suele suceder con fármacos con lenta eliminación.

El modelo del diseño cruzado aleatorizado tiene en cuenta esta necesidad de limpieza y considera un factor fijo llamado *Carryover*. Este efecto *Carryover* puede generar sesgo en las estimaciones en el caso de que dicho efecto exista. Por esta razón es adecuado estudiar como punto de inicio en el análisis de bioequivalencia si existen indicios de este efecto *Carryover*.

Capítulo 3

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad (BA) mide el grado y velocidad con que una forma activa del fármaco accede a la circulación sistémica.

La BA de un fármaco depende en gran medida de las propiedades de la forma farmacéutica, que a su vez depende en parte de su diseño y fabricación. Las diferencias de biodisponibilidad entre formulaciones de un mismo fármaco pueden tener importancia clínica.

La equivalencia química consiste en que dos productos farmacológicos que contienen la misma cantidad del compuesto activo y cumplan con los requisitos oficiales vigentes, puedan variar en su contenido en ingredientes inactivos. El estudio de BA del fármaco puede ser de dos formas:

- Biodisponibilidad absoluta: consiste en que la administración del fármaco debe ser comparada con la misma dosis y administrado vía intravenosa.
- Biodisponibilidad relativa: consiste en que la administración del fármaco debe ser vía oral y esta se compara con un producto al que se denomina referencia.

Los fármacos administrados por vía oral tienen una absorción menor que la vía intravenosa, porque deben atravesar la pared intestinal y después la circulación portal hasta el hígado; en estos dos sitios, se produce el metabolismo del primer paso (metabolismo que ocurre antes de que un fármaco alcance la circulación sistémica).

La BA de un fármaco también puede verse afectada por la edad, el sexo, la actividad física, el fenotipo genético, el estrés, las enfermedades (p. ej., aclorhidria, síndromes de malabsorción) y los antecedentes quirúrgicos digestivos (p. ej., cirugía bariátrica).

3.1. Curva de concentración plasmática

Es el perfil de la curva que determina la absorción, distribución, metabolización y excreción del medicamento en la circulación sistémica. En el caso de biodisponibilidad relativa el proceso de metabolización es más lenta dado que el medicamento debe atravesar la pared intestinal y después la circulación portal hasta el hígado que es en donde se produce el metabolismo del primer paso, que consiste a un paso previo antes de ser transportado a todo el organismo (el hígado es quien metaboliza una parte del medicamento). El grado de absorción de medicamento es distinto para cada individuo, por ello es indispensable el criterio de selección de voluntarios para poder mitigar esta variación.

En la Figura 3.1, se observa un ejemplo de la curva de concentración plasmática general en distintos instantes de tiempo, correspondiente a un voluntario en estudio con mediciones de concentración del fármaco administrado.

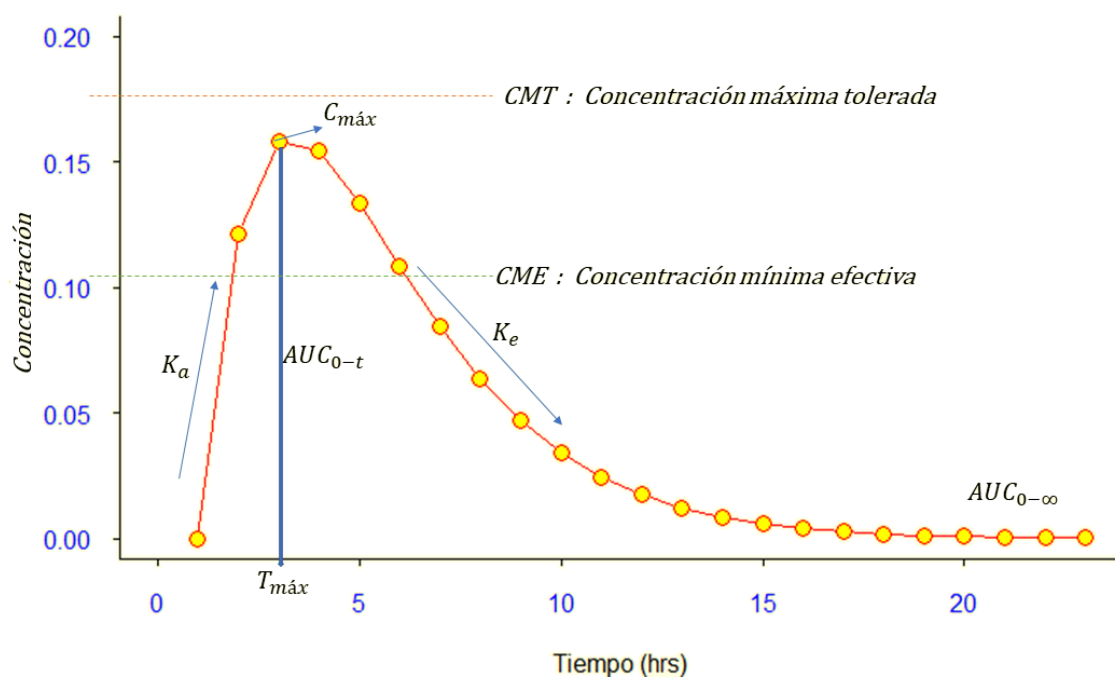


Figura 3.1: Curva de la concentración plasmática.

Fuente: Sánchez (2020) (modificado).

3.2. Parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos son una parte fundamental para la evaluación estadística de bioequivalencia. Estos parámetros son obtenidos a partir del estudio de BA, con más exactitud en las curvas de concentración plasmática en el tiempo. Para cada voluntario es posible obtener los cálculos de: AUC , $C_{máx}$, $T_{máx}$, $t_{1/2}$, K_a y K_e .

A continuación se presentan las deficiones de los parámetros farmacocinéticos principales:

- AUC : corresponde al área bajo la curva hasta la última observación observada en el tiempo de la curva de concentración plasmática, y se denota como AUC_{0-t} . Si $t = t_k$, se calcula mediante la regla del trapecio como:

$$\sum_{i=1}^k \frac{(c_i + c_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2} .$$

- $C_{máx}$: es la máxima concentración alcanzada por el fármaco, que se define como:

$$C_{máx} = máx\{c_0, c_1, \dots, c_k\}$$

- $T_{máx}$: el tiempo requerido para alcanzar la máxima concentración del fármaco.
- $t_{1/2}$: tiempo de vida media del fármaco.
- K_a : constante de velocidad de absorción del fármaco.
- K_e : constante de eliminación del fármaco.

Estos 3 últimos parámetros farmacocinéticos no son utilizados para determinar bioequivalencia, pero son de utilidad para caracterizar el comportamiento de las formulaciones. Se denominan parámetros secundarios.

3.3. Regla del trapecio

La regla del trapecio es un método de integración, que se emplea para calcular aproximadamente el valor de la integral definida. En bioequivalencia es de gran utilidad para el cálculo del área bajo la curva (*AUC*), dado que reduce la cantidad de cálculos de integración.

En la Figura 3.2 se presenta la regla del trapecio, se basa en aproximar el valor de la integral de $f(x)$ por el de la función lineal que pasa a través de los puntos $(t_1, f(t_1))$ y $(t_2, f(t_2))$. La integral de esta área es igual al área del trapecio bajo la gráfica de una función lineal, esto es,

$$\int_{t_1}^{t_2} f(x)dx \approx (t_2 - t_1) \frac{f(t_1) + f(t_2)}{2} \quad , \quad (3.1)$$

en que el término del error es:

$$\frac{(t_2 - t_1)^3}{12} f^{(2)}(\xi) \quad , \quad (3.2)$$

con ξ un número entre t_1 y t_2 .

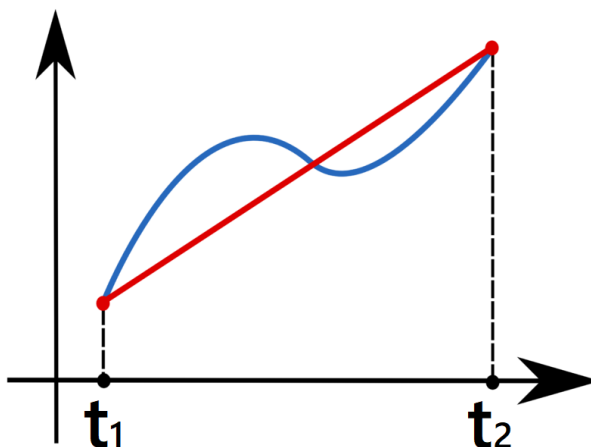


Figura 3.2: Regla del trapecio.
Fuente: www.inf.utfsm.cl (modificado).

En la Figura 3.3 se presenta la regla del trapecio compuesta o regla de los trapecios es una forma de aproximar una integral definida utilizando n trapecios. En la formulación de este método se supone que f es continua y positiva en el intervalo $[t_1, t_2]$.

$$\int_{t_1}^{t_2} f(x)dx \approx \frac{(t_2 - t_1)}{n} \left(\frac{f(t_1) + f(t_2)}{2} + \sum_{k=1}^{n-1} f\left(t_1 + k \frac{t_2 - t_1}{n}\right) \right) \quad (3.3)$$

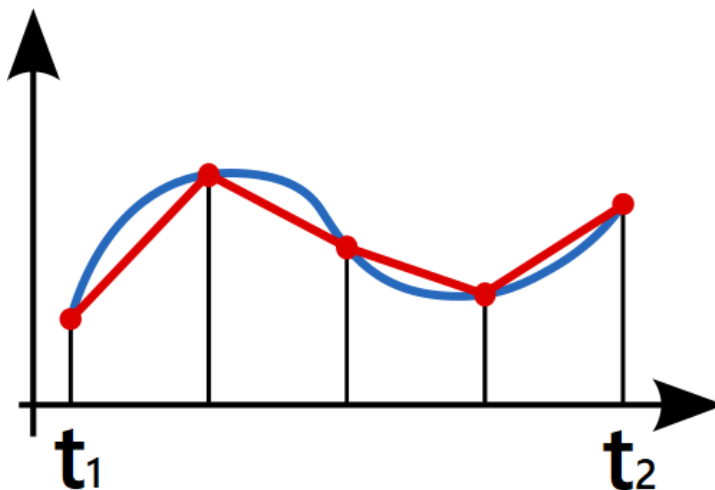


Figura 3.3: Regla de los trapecios.
Fuente: www.inf.utfsm.cl (modificado).

Capítulo 4

Modelo estadístico

4.1. Modelo lineal mixto

Antes de explicar en que consiste un modelo lineal mixto es preciso aclarar algunos conceptos básicos asociados a este tipo de modelos de regresión, los cuales tienen que ver con los efectos fijos y aleatorios.

- Efectos aleatorios: los efectos que son tomados al azar de una población de posibles niveles, son los factores de los cuales no es objetivo principal obtener una estimación. Otra forma de verlos es el efecto que desea ser marginalizado por algún motivo.
- Efectos fijos: los efectos que se determinan a propósito, es decir son los efectos que centran el objetivo principal del análisis, de los cuales, se desea obtener una estimación del impacto en cada posible nivel.

Un modelo mixto permite analizar una variable aleatoria Y modelizando simultáneamente el valor esperado del fenómeno estudiado y su variabilidad; es decir, modela un efecto fijo a todos los sujetos en estudio y otro efecto aleatorio asociado a cada uno de los sujetos.

Es posible obtener un modelo lineal mixto de la agrupación de un modelo de dos etapas, que no es más que la estimación del modelo lineal simple que permite aproximar los perfiles asociados a cada sujeto. La primera parte es ajustar una reacción asociada a cada sujeto por separado y la segunda es ajustar una reducción de los coeficientes asociados a cada sujeto en función de las variables conocidas como efectos fijos.

La formulación general que propone Jones y Kenward (2015) del modelo lineal mixto asociado a un diseño cruzado aleatorizado es dada por:

$$Y_{ijk} = \mu + \pi_j + g_i + \tau_{d[i,j]} + s_{ik} + e_{ijk} \quad ,$$

donde, los términos de este modelos corresponden a:

Y_{ijk} : es el logaritmo de la respuesta farmacocinética observada en el i -ésimo sujeto en la secuencia k -ésima, en el j -ésimo período ($\ln(AUC_{0-t})$, $\ln(AUC_{0-\infty})$ y $\ln(C_{máx})$).

μ : es la media general de la variable respuesta correspondiente.

π_j : es un efecto fijo asociado al período j -ésima , $j = 1, \dots, p$.

g_i : es el efecto secuencia i -ésimo, donde $i = 1, 2$ son las dos secuencias con voluntarios sanos aleatorizados en cada secuencia.

$\tau_{d[i,j]}$: es el efecto de tratamiento directo asociado con el tratamiento aplicado en el período j -ésima de la secuencia.

$S_{i(k)}$: es el efecto aleatorio del sujeto i -ésimo dentro de la secuencia k -ésima.

e_{ijk} : es el error aleatorio o residuo al observar Y_{ijk} .

En ocasiones es necesario representar el efecto *carryover* potencial en un modelo que puede afectar solamente al segundo período. En este caso,

- $\lambda_{(j-1,k)}$: es el efecto fijo residual o *carryover* del $(j - 1)$ - ésimo período de la k -ésima secuencia este efecto ocurre a partir del segundo período, tal que,

$$\sum_{J=1}^J \sum_{k=1}^K \lambda_{(j-1,k)} = 0 \quad .$$

Además, se deben cumplir los siguientes supuestos :

$S_{i(k)} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma_S^2)$	$e_{ijk} \stackrel{iid}{\sim} N(0, \sigma_t)$
--	---

- *iid* significa que las variables aleatorias son independientes e idénticamente distribuidas, con varianza $\sigma_{S,t}^2$ representa la variabilidad intrasujetos.
- Ambos deben ser mutuamente independientes.

Es necesario hacer una distinción importante entre aquellos modelos en que se supone que los efectos del sujeto ($S_{i(k)}$) son parámetros fijos conocidos y aquellos en los que se supone que son realizaciones de variables aleatorias, usualmente normal con media cero y varianza σ^2 .

Este uso implica que el análisis subsiguiente utiliza únicamente información de comparación intra individual. Esto es apropiado para la mayoría de los ensayos cruzados bien diseñados y tiene la ventaja de mantener el análisis dentro del entorno familiar de la regresión lineal.

Sin embargo, hay circunstancias en las que los totales de los sujetos contienen información relevante y esta solo se puede recuperar el efecto del sujeto y se trata como aleatorio. Tal modelo es un ejemplo de un modelo lineal mixto.

4.2. Estimación por Máxima Verosimilitud Restringida (REML)

Inicialmente el método de máxima verosimilitud restringida fue desarrollada por Anderson y Bancroft (1952) y Ruseell y Bradley (1958). Para luego ser extendido por Thompson (1962) para datos balanceados en general, formalizada y extendida a diseños de bloques o datos balanceados con distribución normal. Generalmente, este método es utilizado para modelos mixtos. Consiste en factorizar la verosimilitud completa en dos partes independientes, una de las cuales no contiene la media, asumiendo que al usar esta parte de la verosimilitud no se pierde información con respecto al usar la verosimilitud completa, citada por León (2004).

En este sentido, O' Neill., (2010), plantea que consiste en dividir la verosimilitud en dos componentes, el primer componente es una verosimilitud de uno o más estadísticos que involucran a todos los parámetros fijos como (μ) (y puede involucrar parámetro de varianza). El segundo componente es una verosimilitud restringida y que solo involucra los parámetros de la varianza de los efectos aleatorios, maximizando de esta manera cada componente de forma separada. Es por esto que las estimaciones de parámetro de varianza son conocidas como REML. Entonces, en presencia de una población normal, el primer componente resulta ser la verosimilitud de la media de la muestra y la segunda verosimilitud son para las variables asociadas con la varianza muestral.

$$-2L(\theta, \beta | Y_{obs}) = \log \frac{|L_\theta|^2}{|W|} + n \log(2\pi\sigma^2) + \frac{r^2(\theta)}{\sigma^2} + \frac{\|R_x(\beta - \hat{\beta}_\theta)\|^2}{\sigma^2}, \quad (4.1)$$

$$\left. \log \frac{|L_\theta|^2}{|W|} + n \log(2\pi\sigma^2) + \frac{r^2(\theta)}{\sigma^2} \right\} \text{ Primera componente}$$

$$\left. \frac{\|R_x(\beta - \hat{\beta}_\theta)\|^2}{\sigma^2} \right\} \text{ Segunda componente}$$

4.3. Análisis de varianza

El análisis de varianza representa una etapa fundamental que informa acerca del proceso de recolección de los datos y permite evaluar los diferentes efectos del diseño cruzado. En primera instancia se debe realizar un análisis de varianza preliminar para cada uno de los periodos y secuencias que entregan una certeza sobre la calidad o el desempeño del estudio. Posteriormente un análisis de varianza completo para cada uno de los periodos y secuencia.

En este análisis de varianza se utiliza información de comparación intra-individual únicamente.

Efecto formulación: ocurre si el tratamiento no es constante en el tiempo y se denomina como interacción del periodo - formulación. Si es significativo, se podría ignorar, ya que se produce de forma artificial cuando la variabilidad es baja o hay un número de voluntarios muy alto

Efecto período: este efecto se encuentra entre los resultados obtenidos en el período 1 y período 2 . Si el efecto es significativo, puede deberse a que uno de los períodos, los niveles plasmáticos plasmático de concentración ($C_{m\acute{a}x}$ y AUC) son mayores o menores que en otro.

Efecto secuencia: este efecto se puede encontrar según el orden de la administración de fármacos. Si es significativo, podría indicar que hay un efecto *carryover* presente o bien un efecto de la interacción entre la formulación y el periodo.

4.4. Prueba t de Student para datos pareados

La prueba t de Student introducida por William Sealy Gosset en 1908, la prueba t de Student para datos pareados también conocida como prueba t de Student dependiente o correlacionada. Este tipo de prueba estadística compara las medias y desviaciones estándar con la distribución teórica de los grupos relacionados para determinar si existe una diferencia significativa entre los dos grupos.

Hipótesis estadística

- H_0 : Las medias de los tratamientos administrados son iguales.
- H_1 : Las medias de los fármacos administrados son diferentes.

Para la utilización de esta prueba es necesario verificar los siguientes supuestos:

- La variable dependiente se distribuye normal.
- Las observaciones se muestran de forma independiente.
- Las variables independientes deben constar de dos grupos relacionados o pares coincidentes.

En el caso de bioequivalencia, se mide la variable dependiente de ambos tratamientos, donde el investigador busca si el efecto del tratamiento alternativo difiere significativamente del tratamiento de referencia.



Figura 4.1: Región de no rechazo y de rechazo.
Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 4.1 representa un ejemplo de la prueba t Student, con un intervalo de confianza del 90 %, señalando las zonas de aceptación y rechazo.

4.5. Suma de rangos de Wilcoxon

La prueba de suma de rangos de Wilcoxon surge un 1945 por Frank Wilcoxon, es una prueba no paramétrica y es utilizada de forma alternativa a la prueba de t de Student, cuando el cumplimiento de los supuestos no pueden ser verificados o cumplidos. La variable dependiente debe estar en una escala cuantitativa o de escala ordinal. Esta prueba compara el rango medio de dos muestras relacionadas y determina si existen diferencias entre ellas. Es de gran utilidad en el caso no paramétrico dado que utiliza la información relativa a la ubicación de cada observación de las muestras.

Hipótesis estadística

- H_0 : No existen diferencias localizadas entre los tratamientos.
- H_1 : Existen diferencias.

Características :

- Parten de la base de que los datos analizados adoptan una distribución libre.
- No suponen ninguna distribución de probabilidad teórica de la distribución de datos.
- Conviene utilizarlo cuando trabajamos con muestras pequeñas ($n < 10$) en las que se desconoce si es válido suponer normalidad.
- Las pruebas no paramétricas no asumen normalidad de la población y en su mayoría se basan en ordenamientos o recuentos de datos.
- El parámetro que se usa para hacer las pruebas estadísticas es la Mediana y no la Media.
- Son menos potentes que las técnicas paramétricas, aunque tienen la ventaja que se pueden aplicar más fácilmente.

Capítulo 5

Prueba de bioequivalencia

Las pruebas de BE son ampliamente utilizadas para probar si el medicamento o principio activo está en la misma cantidad media en las dos formulaciones que están bajo comparación y que el efecto terapéutico depende principalmente de su concentración y que debería ser similar en todas las formulaciones comparadas.

En la actualidad, se siguen utilizando varios de los criterios propuestos en *Chow et al.*, (2000) para establecer la condición de bioequivalencia promedio (*ABE*).

Una de las principales agencias regulatorias, la *FDA*, determina que para ambos productos R y T sean comparables en el enfoque de *ABE* esto implica el cálculo de un intervalo de confianza del 90 % para la relación de los promedios (medias geométricas de la población) de las medias de los productos. Para establecer la BE el intervalo de confianza calculado debe estar dentro de los límites de BE generalmente 80-125 % para productos de baja variabilidad. Además, este enfoque dispone de recomendaciones específicas:

1. Transformación logarítmica para los datos farmacocinéticos.
2. Métodos para evaluar los efectos de secuencia.
3. Métodos para evaluar datos atípicos.

Por parte de la agencia de aprobación nacional el ISP realiza recomendaciones similares a las del *FDA* donde, para un producto de baja variabilidad el intervalo de confianza del 90 % de la razón de las medias geométricas de los parámetros farmacocinéticos seleccionados (C_{max} , AUC_{0-t} y $AUC_{0-\infty}$) y para un producto con estrecho margen terapéutico, el intervalo de confianza del 90 % debe caer dentro del rango 90-111 %.

Tabla 5.1: 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 bioinequivalencia	Decisión correcta	Error del tipo II Declarar no bioequivalencia cuando si lo era
Rechazar la hipótesis nula de bioinequivalencia	Error del tipo I Declarar bioequivalencia cuando no lo era	Decisión correcta

Hauschke et al., Bioequivalence Studies in drug Development. 2007

La preocupación fundamental en la evaluación de la BE es limitar el riesgo de una falsa declaración de equivalencia (error tipo I). El análisis estadístico de los ensayos de BE debe demostrar que es poco probable una diferencia significativa en la BA entre el producto similar y el comparador. Los procedimientos estadísticos deben especificarse en el protocolo antes de comenzar con la recolección de datos.

En la Tabla 5.1 se presentan los tipos de errores tipo I y II para bioequivalencia, donde el menos aceptable es el error tipo I, es decir, declarar bioequivalencia cuando en realidad no la hay. Se admite una probabilidad no mayor al 5% para la ocurrencia de este error. El error tipo II es no poder declarar bioequivalencia cuando si lo es.

5.1. Principio de inclusión de intervalos

El método estadístico para pruebas de estudios de BE se basa en la determinación de intervalos de confianza del 90 % en torno a la razón de los promedios de población log transformados (Producto de prueba/producto de referencia) de los parámetros farmacocinéticos en consideración y por realización de un test de dos colas con un nivel de significancia del 5 %.

Sea ϕ el efecto formulación ($\phi = \mu_t - \mu_R$). Para demostrar bioequivalencia se deben contrastar las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \phi \leq -\epsilon_1 \cup \phi \geq \epsilon_2$$

$$H_1 : \epsilon_1 < \phi < \epsilon_2 \quad .$$

IC_ϕ debe estar completamente incluido dentro de los límites de bioequivalencia (ϵ_1, ϵ_2). El límite establecido para fármacos de baja variabilidad es de 80 % a 125 %. Para establecer bioequivalencia es necesario los parámetros farmacocinéticos AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ y $C_{máx}$ estén dentro de los límites de bioequivalencia.

Dado el parámetro de interés ϕ se procede a calcular la estimación de su intervalo de confianza ya sea en forma exacta o aproximada, mediante un test t Student o para el caso no paramétrico un test Wilcoxon de suma de rangos.

5.2. Prueba bioequivalencia de dos caras (*TOST*)

La declaración de BE se establece en función de una equivalencia para el efecto de formulación ϕ , donde es $-\epsilon_1 = \epsilon_2 = \epsilon = 0.223$ y se asume que los límites de equivalencia son simétricos para los datos en escala logarítmica ($\epsilon = \pm 0.223$). La propuesta realizada por Schuirmann (1987), consiste en descomponer la hipótesis de bioequivalencia en dos hipótesis unilaterales:

$$\begin{aligned} H_{01} : \phi \leq -\epsilon \quad \text{vs} \quad H_{11} : \phi > -\epsilon \\ H_{02} : \phi \geq \epsilon \quad \text{vs} \quad H_{12} : \phi < \epsilon \quad . \end{aligned}$$

Para la declaración de bioequivalencia, considere lo siguiente :

- Es un procedimiento basado en rechazar ambas hipótesis nulas, H_{01} y H_{02} a un nivel de α , si ambas hipótesis son rechazadas se declara bioequivalencia.
- Basta que no se rechace alguna de las dos hipótesis nulas, para que los fármacos no puedan ser considerados bioequivalentes.

Capítulo 6

Tamaños de muestra

La determinación del tamaño muestral para un diseño experimental cruzado aleatorizado, puede determinarse basándose en un análisis de precisión o en un análisis de potencia. El análisis de precisión y de potencia para determinar el tamaño de muestra suelen realizarse controlando el error tipo I (nivel de confianza) y el error tipo II (potencia). A continuación, una breve introducción de los conceptos del error tipo I y de tipo II.

6.1. Errores tipo I y de tipo II

En la práctica se producen dos tipos de errores al comprobar la hipótesis. Si se rechaza la hipótesis nula cuando es verdadera, se ha producido el error tipo I. Si la hipótesis no es rechazada cuando es falsa, se comete el error tipo II.

La probabilidad de cometer el error tipo I y de tipo II, denotados por α y β , respectivamente, se dan a continuación.

$$\begin{aligned}\alpha &= P\{\text{error tipo I}\} \\ &= \{\text{Rechazar } H_0 \text{ cuando } H_0 \text{ es verdadera}\} \\ \beta &= P\{\text{error tipo II}\} \\ &= \{\text{No rechazar } H_0 \text{ cuando } H_0 \text{ es falsa}\}\end{aligned}$$

Un límite superior para α es un nivel de significación del procedimiento de prueba. La potencia de la prueba se define como una probabilidad de rechazar correctamente la hipótesis nula cuando está en falsa, es decir,

$$\begin{aligned}\text{Potencia} &= 1 - \beta \\ &= P\{\text{Rechazar } H_0 \text{ cuando } H_0 \text{ es falsa}\}\end{aligned}$$

Como ejemplo, suponga que se desea probar las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \text{La droga es ineficaz} \quad \text{v/s} \quad H_1 : \text{La droga es eficaz}$$

6.2. Determinación del tamaño muestral mediante el coeficiente de variación

Quan y Shih (1996) desarrollaron un método para estimar el coeficiente de variación (CV) intrasujeto basado en un modelo simple de efectos mixtos aleatorios de una vía. Para el caso de un diseño cruzado aleatorizado, el cual es modelado a partir de un modelo lineal mixto, asume que la variabilidad intra-sujeto es una constante. Un estimador intuitivo insesgado para μ_i viene dado por

$$\hat{\mu}_i = \frac{1}{n_i m} \sum_{j=1}^{n_i} \sum_{k=1}^m x_{ijk} \quad .$$

Por lo tanto, se puede obtener un estimador de la CV intrasujeto como

$$\widehat{CV}_i = \frac{\hat{\sigma}_{wi}}{\hat{\mu}_i} \quad .$$

Por la expansión de Taylor's, se deduce que

$$\widehat{CV}_i - CV_i = \frac{\hat{\sigma}_{wi}}{\hat{\mu}_i} - \frac{\sigma_{wi}}{\mu_i} \approx \frac{1}{2\mu_i\sigma_{wi}}(\hat{\sigma}_{wi}^2 - \sigma_{wi}^2) - \frac{\sigma_{wi}}{\mu_i^2}(\hat{\mu}_i - \mu_i) \quad .$$

Por tanto, por el teorema del límite central, el CV_i se distribuye asintóticamente como una variable aleatoria normal con media CV_i y varianza σ_i^{*2}/n_i , donde

$$\sigma_i^{*2} = \frac{\sigma_{wi}^2}{2m\mu_i^2} + \frac{\sigma_{wi}^4}{\mu_i^4} = \frac{1}{2m}CV_i^2 + CV_i^4 \quad .$$

Intuitivamente un estimador de $\hat{\sigma}_i^{*2}$

$$\hat{\sigma}_i^{*2} = \frac{1}{2m} \widehat{CV}_i^2 + \widehat{CV}_i^4 \quad .$$

Para comprobar la igualdad en los CV intrasujeto se suelen considerar las siguientes hipótesis:

$$H_0 : CV_T = CV_R \quad \text{v/s} \quad H_1 : CV_T \neq CV_R$$

Bajo la hipótesis nula, el estadístico de prueba es dado por

$$T = \frac{\widehat{CV}_T - \widehat{CV}_R}{\sqrt{\hat{\sigma}_T^{*2}/n_T + \hat{\sigma}_R^{*2}/n_R}} \quad .$$

Por lo tanto, la potencia es aproximadamente

$$P(|T| > Z_{\alpha/2}) \approx P(T > Z_{\alpha/2}) = 1 - \Phi \left(Z_{\alpha/2} - \frac{CV_T - CV_R}{\sqrt{\sigma_T^{*2}/n_T + \sigma_R^{*2}/n_R}} \right) \quad .$$

una potencia de $1 - \beta$ puede obtenerse resolviendo la siguiente ecuación:

Bajo el supuesto de que $n = n_1 = n_2$, el tamaño de la muestra necesario para tener

$$Z_{\alpha/2} - \frac{CV_T - CV_R}{\sqrt{\sigma_T^{*2}/n + \sigma_R^{*2}/n}} = -Z_\beta \quad .$$

Finalmente, se obtiene

$$n = \frac{(\sigma_T^{*2} + \sigma_R^{*2})(Z_{\alpha/2} + Z_\beta)^2}{(CV_T - CV_R)^2} \quad .$$

Capítulo 7

Estudio estadístico

7.1. Conjunto de datos

En este trabajo de titulación, se estudiaron 2 conjuntos de datos reales encriptados por motivos de confidencialidad del laboratorio. Estos datos pertenecen a resultados de concentración de medicamentos de un diseño experimental cruzado aleatorizado. Además, estos conjuntos de datos están en proceso de aprobación, por una agencia regulatoria nacional (ARN). Los fármacos en estudio pertenecen al tipo IV de acuerdo a la clasificación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

Tabla 7.1: Sistema de Casificación 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.

Fuente: Sánchez (2004).

A continuación, en la Tabla 7.2 se presenta el primer conjunto de datos, denotado como “Conjunto A”. En este diseño experimental se incluyeron 28 voluntarios sanos, la dosis del fármaco de prueba es de vía oral y el tiempo de seguimiento de la concentración plasmática fue en distintos intervalos de tiempo, hasta un tiempo máximo de 12 horas con un total de 952 observaciones.

En la Tabla 7.3 se presenta el segundo conjunto de datos, denotado como “Conjunto B”, a diferencia que en el Conjunto A, en el diseño experimental incluyeron 20 voluntarios sanos, donde el seguimiento de la concentración plasmática conlleva un tiempo máximo de 72 horas y un total de 880 observaciones.

En la Tabla 7.4 se presentan las concentraciones plasmáticas del conjunto A, obtenidas de las muestras de sangre de los 28 voluntarios sanos que participaron en el estudio completo con ambas formulaciones. Se indican las concentraciones promedios \pm su desviación estándar. A partir de estos datos se construyeron las curvas de concentración plasmática promedio por período, mostrados en la Figura 7.2 y Figura 7.3.

En la Tabla 7.5 se presentan las concentraciones plasmáticas del conjunto B obtenidas de las muestras de sangre de los 20 voluntarios sanos que participaron en el estudio completo con ambas formulaciones. Se indican las concentraciones promedios \pm su desviación estándar. A partir de estos datos se construyeron las curvas de concentración plasmática promedio por período, mostrados en la Figura 7.4 y Figura 7.5.

Tabla 7.2: Estructura de datos del “Conjunto A”.

Voluntario	Tiempo (hrs)	Período	Concentración	Secuencia	Tratamiento de
01	0,00	1	0,000	RT	De referencia
01	0,25	1	0,349	RT	De referencia
01	0,50	1	0,733	RT	De referencia
01	0,75	1	0,619	RT	De referencia
01	1,00	1	0,589	RT	De referencia
01	1,25	1	0,547	RT	De referencia
01	1,50	1	0,446	RT	De referencia
01	1,75	1	0,387	RT	De referencia
01	2,00	1	0,362	RT	De referencia
01	2,50	1	0,218	RT	De referencia
01	3,00	1	0,195	RT	De referencia
01	3,50	1	0,169	RT	De referencia
01	4,00	1	0,131	RT	De referencia
01	5,00	1	0,000	RT	De referencia
01	6,00	1	0,000	RT	De referencia
01	8,00	1	0,000	RT	De referencia
01	12,00	1	0,000	RT	De referencia
01	0,00	2	0,000	RT	De prueba
01	0,25	2	0,000	RT	De prueba
01	0,50	2	0,325	RT	De prueba
01	0,75	2	0,647	RT	De prueba
01	1,00	2	0,637	RT	De prueba
01	1,25	2	0,508	RT	De prueba
01	1,50	2	0,665	RT	De prueba
01	1,75	2	0,617	RT	De prueba
01	2,00	2	0,493	RT	De prueba
01	2,50	2	0,294	RT	De prueba
01	3,00	2	0,232	RT	De prueba
01	3,50	2	0,151	RT	De prueba
01	4,00	2	0,136	RT	De prueba
01	5,00	2	0,000	RT	De prueba
01	6,00	2	0,000	RT	De prueba
01	8,00	2	0,000	RT	De prueba
01	12,00	2	0,000	RT	De prueba
Datos omitidos					
28	0,00	2	0,000	TR	De referencia
28	0,25	2	0,325	TR	De referencia
28	0,50	2	1,966	TR	De referencia
28	0,75	2	1,195	TR	De referencia
28	1,00	2	0,841	TR	De referencia
28	1,25	2	0,699	TR	De referencia
28	1,50	2	0,554	TR	De referencia
28	1,75	2	0,530	TR	De referencia
28	2,00	2	0,455	TR	De referencia
28	2,50	2	0,317	TR	De referencia
28	3,00	2	0,280	TR	De referencia
28	3,50	2	0,102	TR	De referencia
28	4,00	2	0,000	TR	De referencia
28	5,00	2	0,000	TR	De referencia
28	6,00	2	0,000	TR	De referencia
28	8,00	2	0,000	TR	De referencia
28	12,00	2	0,000	TR	De referencia

Tabla 7.3: Estructura de datos del “Conjunto B”.

Voluntario	Tiempo (hrs)	Período	Concentración	Secuencia	Tratamiento de:
1	0	1	0	AB	De prueba
1	1	1	5536.22	AB	De prueba
1	2	1	10099.63	AB	De prueba
1	3	1	16160.89	AB	De prueba
1	3.5	1	18950.24	AB	De prueba
1	4	1	21424.08	AB	De prueba
1	4.5	1	20527.07	AB	De prueba
1	5	1	18824.44	AB	De prueba
1	5.5	1	18204.50	AB	De prueba
1	6	1	17928.04	AB	De prueba
1	6.5	1	17555.21	AB	De prueba
1	7	1	18190.55	AB	De prueba
1	7.5	1	18233.99	AB	De prueba
1	8	1	18265.93	AB	De prueba
1	9	1	18687.92	AB	De prueba
1	10	1	18339.47	AB	De prueba
1	12	1	17335.44	AB	De prueba
1	16	1	18249.05	AB	De prueba
1	24	1	14969.64	AB	De prueba
1	36	1	13054.54	AB	De prueba
1	48	1	12165.02	AB	De prueba
1	60	1	10576.28	AB	De prueba
1	72	1	10148.50	AB	De prueba
1	0	2	0	AB	De referencia
1	1	2	5051.70	AB	De referencia
1	2	2	16856.46	AB	De referencia
1	3	2	23994.85	AB	De referencia
1	3.5	2	23188.32	AB	De referencia
1	4	2	22343.03	AB	De referencia
1	4.5	2	19138.78	AB	De referencia
1	5	2	20641.37	AB	De referencia
1	5.5	2	19656.74	AB	De referencia
1	6	2	18652.79	AB	De referencia
1	6.5	2	17962.50	AB	De referencia
1	7	2	18818.96	AB	De referencia
1	7.5	2	18212.13	AB	De referencia
1	8	2	18711.02	AB	De referencia
1	9	2	19484.31	AB	De referencia
1	10	2	19318.47	AB	De referencia
1	12	2	18079.60	AB	De referencia
1	16	2	17474.02	AB	De referencia
1	24	2	15109.83	AB	De referencia
1	36	2	13841.53	AB	De referencia
1	48	2	12533.74	AB	De referencia
1	60	2	10846.90	AB	De referencia
1	72	2	9406.28	AB	De referencia
(Datos omitidos)					
20	48	1	17089.12	BA	De referencia
20	60	1	15033.27	BA	De referencia
20	72	1	13979.40	BA	De referencia

Tabla 7.4: Concentraciones plasmáticas v/s el tiempo post-administración en 28 voluntarios sanos para las formulaciones T y R.

Voluntario	Tiempo	Formulación de prueba															
		0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8
1	p-2t	0,000	0,001	0,325	0,647	0,637	0,508	0,665	0,617	0,493	0,294	0,232	0,151	0,136	0,001	0,001	0,001
2	p-1t	0,000	0,542	1,680	1,120	0,623	0,666	0,537	0,496	0,412	0,335	0,112	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
3	p-2t	0,000	1,265	2,050	1,383	1,241	0,699	0,647	0,545	0,478	0,299	0,196	0,153	0,108	0,001	0,001	0,001
4	p-1t	0,000	0,001	0,411	0,727	1,308	1,701	1,157	1,141	1,065	0,680	0,471	0,342	0,311	0,151	0,001	0,001
5	p-2t	0,000	0,879	2,565	1,362	0,893	0,713	0,544	0,424	0,364	0,285	0,161	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
6	p-1t	0,000	0,304	2,080	1,712	0,776	1,113	0,812	0,791	0,677	0,449	0,387	0,295	0,187	0,001	0,001	0,001
7	p-2t	0,000	0,001	1,053	1,193	1,182	1,104	1,099	0,893	0,733	0,531	0,368	0,266	0,194	0,001	0,001	0,001
8	p-1t	0,000	0,001	2,258	1,547	1,520	1,176	0,781	0,757	0,653	0,488	0,343	0,260	0,205	0,112	0,001	0,001
9	p-1t	0,000	0,001	0,222	0,296	0,428	0,608	0,952	0,637	0,504	0,393	0,266	0,219	0,134	0,001	0,001	0,001
10	p-2t	0,000	0,799	2,173	1,265	0,959	0,817	0,744	0,600	0,626	0,374	0,268	0,192	0,140	0,001	0,001	0,001
11	p-2t	0,000	1,661	2,365	0,773	0,657	0,436	0,335	0,357	0,287	0,196	0,147	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
12	p-1t	0,000	0,001	0,332	0,864	0,946	0,825	0,653	0,649	0,533	0,362	0,252	0,215	0,001	0,001	0,001	0,001
13	p-2t	0,000	3,333	1,503	0,869	0,602	0,407	0,478	0,409	0,344	0,269	0,169	0,001	0,164	0,001	0,001	0,001
14	p-1t	0,000	0,001	0,300	0,807	1,153	1,346	1,051	0,979	0,857	0,600	0,465	0,382	0,280	0,204	0,001	0,001
15	p-2t	0,000	0,642	1,210	2,141	1,429	1,148	0,941	0,769	0,685	0,455	0,310	0,247	0,177	0,001	0,001	0,001
16	p-1t	0,000	0,001	0,101	0,660	1,643	1,316	1,187	0,986	0,751	0,555	0,389	0,315	0,211	0,133	0,001	0,001
17	p-2t	0,000	0,001	0,502	1,386	2,079	1,244	0,813	0,634	0,508	0,288	0,240	0,135	0,001	0,001	0,001	0,001
18	p-1t	0,000	0,303	1,454	1,360	1,319	1,159	1,008	0,866	0,668	0,567	0,435	0,314	0,306	0,212	0,171	0,001
19	p-2t	0,000	0,001	0,271	0,225	0,378	0,542	0,782	0,766	0,795	0,444	0,353	0,211	0,160	0,001	0,001	0,001
20	p-1t	0,000	0,001	0,173	0,392	0,306	1,361	1,159	0,639	0,500	0,341	0,260	0,179	0,140	0,001	0,001	0,001
21	p-2t	0,000	0,001	0,929	1,232	1,207	0,918	0,699	0,556	0,479	0,349	0,283	0,200	0,174	0,001	0,001	0,001
22	p-1t	0,000	0,910	1,728	1,377	1,077	0,846	0,650	0,524	0,434	0,297	0,170	0,121	0,001	0,001	0,001	0,001
23	p-2t	0,000	1,563	1,510	0,915	0,731	0,565	0,489	0,371	0,293	0,219	0,148	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
24	p-1t	0,000	0,763	1,614	0,918	0,636	0,525	0,377	0,321	0,235	0,189	0,136	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
25	p-2t	0,000	0,751	2,611	1,692	1,303	0,949	0,843	0,764	0,695	0,404	0,332	0,304	0,178	0,108	0,105	0,001
26	p-1t	0,000	0,001	0,590	0,922	1,091	0,832	0,773	0,891	0,807	0,572	0,504	0,357	0,275	0,101	0,001	0,001
27	p-2t	0,000	0,752	1,218	0,909	0,822	0,982	0,898	0,753	0,607	0,437	0,394	0,255	0,238	0,001	0,001	0,001
28	p-1t	0,000	0,467	2,259	1,129	0,896	0,674	0,691	0,606	0,539	0,343	0,127	0,117	0,001	0,001	0,001	0,001
X		0,000	0,534	1,267	1,065	0,994	0,899	0,777	0,669	0,572	0,393	0,283	0,187	0,133	0,037	0,011	0,001
SD		0,000	0,745	0,832	0,443	0,411	0,329	0,235	0,206	0,192	0,128	0,116	0,121	0,105	0,067	0,037	0,000

X: Promedio; SD: desviación estándar.

		Formulación de referencia																
Voluntario	Tiempo	0	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	12
1	p-1R	0	0,349	0,733	0,619	0,589	0,547	0,446	0,387	0,362	0,218	0,195	0,169	0,131	0,001	0,001	0,001	0,001
2	p-2R	0	0,001	1,669	1,004	1,049	0,716	0,552	0,446	0,411	0,284	0,198	0,158	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
3	p-1R	0	1,680	1,550	1,204	1,012	0,795	0,610	0,531	0,439	0,302	0,223	0,155	0,100	0,001	0,001	0,001	0,001
4	p-2R	0	0,162	0,678	0,590	0,794	1,201	1,120	0,996	1,186	0,888	0,439	0,347	0,267	0,150	0,001	0,001	0,001
5	p-1R	0	0,426	1,528	1,521	1,126	0,714	0,580	0,456	0,364	0,234	0,153	0,113	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
6	p-2R	0	0,001	0,109	0,309	0,775	1,371	1,801	1,473	1,352	0,979	0,692	0,465	0,368	0,173	0,001	0,001	0,001
7	p-1R	0	0,303	3,173	1,785	1,367	1,047	0,956	0,788	0,641	0,465	0,396	0,333	0,227	0,158	0,111	0,001	0,001
8	p-2R	0	0,824	1,854	1,552	1,125	0,866	0,809	0,660	0,601	0,527	0,437	0,334	0,236	0,163	0,001	0,001	0,001
9	p-2R	0	0,001	0,937	0,902	0,702	0,746	0,779	0,541	0,486	0,366	0,238	0,213	0,126	0,001	0,001	0,001	0,001
10	p-1R	0	1,877	1,510	1,146	0,946	0,776	0,643	0,549	0,441	0,298	0,245	0,185	0,122	0,001	0,001	0,001	0,001
11	p-1R	0	2,629	1,345	0,816	0,694	0,502	0,403	0,314	0,238	0,213	0,152	0,101	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
12	p-2R	0	0,001	0,655	2,039	1,176	0,840	0,643	0,512	0,444	0,315	0,207	0,174	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
13	p-1R	0	0,218	1,304	0,825	0,794	0,673	0,508	0,476	0,411	0,274	0,204	0,107	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
14	p-2R	0	0,218	0,716	0,715	0,937	0,643	0,576	0,592	0,679	0,690	0,460	0,305	0,231	0,133	0,001	0,001	0,001
15	p-1R	0	0,218	1,093	1,222	1,126	0,824	0,747	0,696	0,719	0,517	0,167	0,289	0,176	0,191	0,001	0,001	0,001
16	p-2R	0	0,218	1,180	1,139	1,207	0,907	0,805	0,729	0,599	0,433	0,373	0,297	0,172	0,102	0,001	0,001	0,001
17	p-1R	0	0,218	1,920	1,337	0,986	0,667	0,557	0,492	0,411	0,213	0,189	0,103	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
18	p-2R	0	0,218	3,725	1,831	1,348	1,067	0,808	0,785	0,629	0,467	0,326	0,317	0,256	0,177	0,158	0,108	0,001
19	p-1R	0	0,218	0,528	2,264	1,248	0,902	0,678	0,568	0,465	0,320	0,202	0,169	0,122	0,001	0,001	0,001	0,001
20	p-2R	0	0,218	0,001	0,174	0,693	1,468	1,047	0,635	0,546	0,486	0,399	0,243	0,198	0,120	0,001	0,001	0,001
21	p-1R	0	0,218	1,318	1,987	1,187	1,077	0,891	0,712	0,663	0,479	0,324	0,284	0,189	0,108	0,001	0,001	0,001
22	p-2R	0	0,218	0,571	0,529	0,416	0,437	0,363	0,356	0,652	0,579	0,360	0,252	0,150	0,001	0,001	0,001	0,001
23	p-1R	0	0,218	0,777	0,630	0,602	0,792	0,616	0,390	0,378	0,256	0,170	0,109	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
24	p-2R	0	0,218	0,654	0,793	0,670	0,524	0,484	0,372	0,314	0,222	0,149	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
25	p-1R	0	0,218	1,792	2,206	1,839	1,457	1,143	0,930	1,110	0,602	0,521	0,408	0,283	0,185	0,116	0,001	0,001
26	p-2R	0	0,218	1,410	2,516	2,113	1,052	0,760	0,735	0,539	0,526	0,501	0,246	0,158	0,001	0,001	0,001	0,001
27	p-1R	0	0,218	0,976	1,588	1,368	1,044	0,880	0,719	0,665	0,465	0,337	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
28	p-2R	0	0,218	1,966	1,195	0,841	0,699	0,554	0,530	0,455	0,317	0,280	0,102	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
X		0	0,419	1,274	1,230	1,026	0,870	0,750	0,620	0,579	0,426	0,305	0,214	0,126	0,060	0,015	0,005	0,001
SD		0	0,614	0,811	0,623	0,373	0,275	0,293	0,239	0,259	0,196	0,138	0,116	0,110	0,077	0,041	0,020	0,000

X: Promedio; SD: desviación estándar.

Tabla 7.5: Concentraciones plasmáticas v/s el tiempo post-administración en 20 voluntarios sanos para las formulaciones T y R.

Voluntario	tiempo	Formulación de prueba																						
		0	1	2	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	9	10	12	16	24	36	48	60	72
1	p-1A	0	5,536	10,100	16,161	18,950	21,424	20,527	18,824	18,205	17,928	17,555	18,191	18,234	18,266	18,688	18,339	17,335	18,249	14,970	13,055	12,165	10,576	10,149
2	p-1A	0	907	6,481	13,393	16,379	19,872	18,992	20,350	20,697	22,211	20,749	22,724	23,663	23,392	23,245	23,523	20,545	21,293	18,294	16,137	14,341	13,084	11,835
3	p-1A	0	1,370	6,050	10,468	15,631	19,139	18,740	19,485	18,704	18,856	18,731	18,236	19,623	20,420	21,577	22,398	19,379	20,018	16,531	15,625	14,216	13,108	11,795
4	p-2A	0	999	17,728	35,023	28,747	30,761	27,901	27,186	25,784	25,170	25,172	25,309	24,178	24,634	24,011	24,626	22,497	21,568	18,434	16,209	12,868	9,894	8,681
5	p-2A	0	1,989	10,527	13,522	22,635	18,269	17,112	16,977	16,124	17,876	19,700	19,153	18,140	20,302	19,553	19,937	19,472	18,582	16,439	14,986	12,917	10,459	8,286
6	p-2A	0	760	13,513	21,502	21,614	25,851	21,819	20,743	20,663	21,390	21,903	22,709	21,893	22,182	21,764	22,921	22,272	20,689	18,059	16,095	13,782	10,943	9,528
7	p-1A	0	194	4,508	16,766	17,695	20,582	24,042	22,551	21,702	21,836	21,323	22,754	21,688	22,618	21,240	20,044	20,218	18,109	15,297	13,384	11,737	12,174	8,064
8	p-1A	0	3,093	19,063	28,117	27,074	28,534	29,805	27,301	27,536	26,164	22,810	27,410	29,987	28,178	26,704	28,678	25,332	26,594	21,645	16,527	15,065	12,565	11,289
9	p-1A	0	10,718	25,790	24,137	25,074	25,347	24,437	23,226	23,834	22,981	22,132	23,255	22,248	23,439	22,059	21,598	19,666	20,340	20,076	18,334	15,409	13,783	13,049
10	p-2A	0	325	3,839	15,818	16,616	23,032	24,342	23,525	22,943	26,832	25,840	26,122	28,149	29,176	29,328	29,497	27,873	26,546	22,228	19,705	15,170	12,986	10,306
11	p-2A	0	1,660	7,662	15,994	18,198	23,617	23,507	24,595	23,573	23,667	23,122	22,505	23,538	24,576	24,383	24,958	22,431	21,184	17,253	15,505	11,664	9,794	
12	p-2A	0	832	11,353	22,872	27,765	31,305	29,834	30,727	32,260	32,378	32,108	33,893	32,904	32,868	34,630	34,488	31,176	30,254	24,870	22,211	17,544	16,973	13,138
13	p-2A	0	1,950	13,898	24,588	24,853	21,965	21,488	22,189	22,356	21,244	20,219	22,572	24,145	24,394	23,604	23,493	23,051	21,036	17,692	17,923	14,469	13,051	11,766
14	p-1A	0	29,135	37,579	34,997	33,089	31,794	29,525	29,221	28,395	27,753	27,638	28,981	28,948	28,161	29,758	26,255	25,409	24,013	21,674	19,164	14,984	14,424	12,421
15	p-1A	0	2,315	11,960	15,860	18,220	16,855	17,543	19,319	20,393	19,886	19,600	21,480	21,362	21,014	20,440	21,228	18,829	18,135	16,393	13,572	12,234	11,399	10,143
16	p-2A	0	991	16,777	29,828	33,404	34,478	35,694	28,686	30,359	33,261	31,966	33,001	32,485	35,429	35,336	34,215	32,287	29,491	23,390	20,746	16,608	15,568	12,026
17	p-2A	0	232	4,606	12,398	17,079	22,168	19,902	24,274	24,863	22,018	26,378	22,872	23,840	24,306	25,564	25,455	24,713	22,985	18,762	17,176	14,701	14,294	11,213
18	p-1A	0	457	4,155	26,295	26,327	27,901	30,531	28,805	28,028	26,995	26,781	28,750	27,025	28,312	27,376	29,242	28,830	26,033	22,912	19,085	19,619	15,475	13,953
19	p-1A	0	290	4,761	9,751	12,266	14,596	16,773	19,112	19,596	18,466	19,432	21,733	21,738	21,884	24,306	26,233	25,933	26,538	22,915	19,379	15,967	15,517	15,203
20	p-2A	0	705	9,479	21,420	23,831	25,608	25,133	25,669	24,026	25,445	25,069	26,862	25,054	26,300	26,078	25,889	22,977	23,559	21,036	18,261	16,065	15,180	13,021
X		0	3223	11991	20445	22272	24155	23882	23638	23502	23618	23414	24426	24442	24993	24982	25151	23511	22761	19444	17154	14654	13156	11283
SD		0	6566	8412	7659	5951	5393	5274	4050	4250	4401	4142	4362	4275	4321	4549	4391	4164	3736	2958	2492	1940	1985	1915

X: Promedio; SD: desviación estándar.

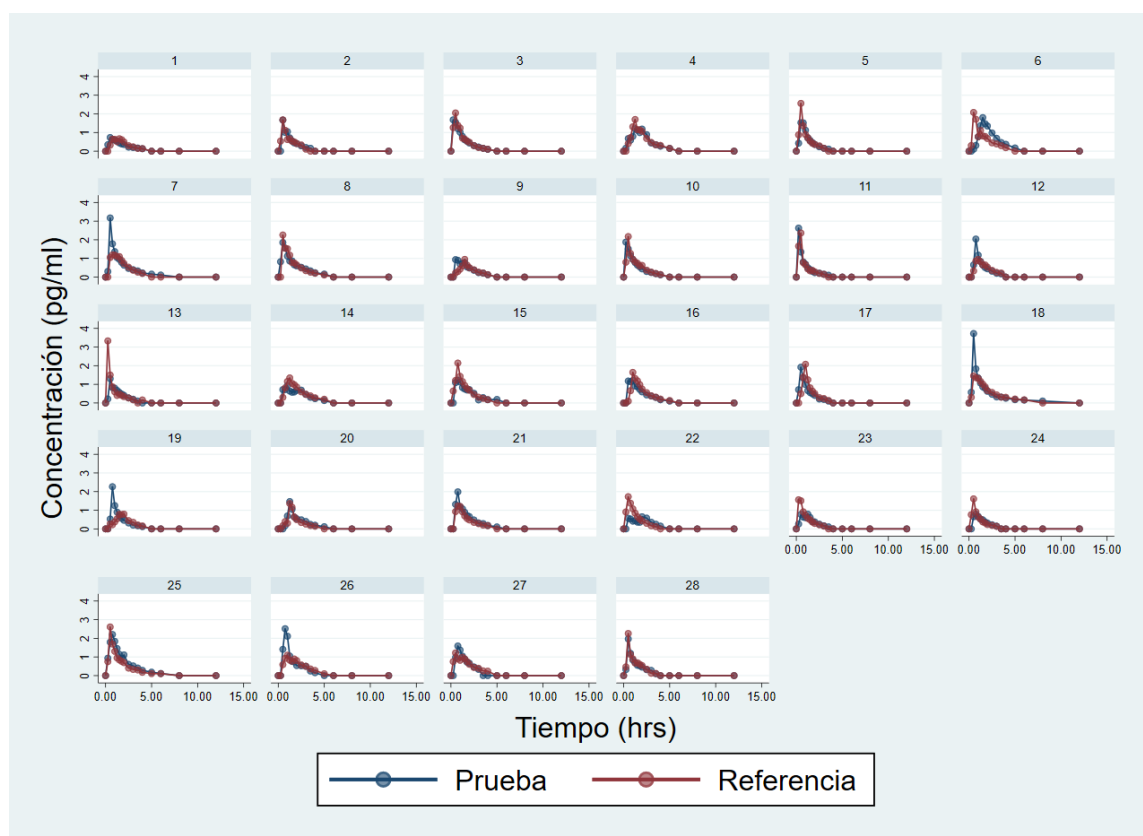
		Formulación de referencia																						
Voluntario	tiempo (hrs)	0	1	2	3	3-5	4	4,5	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	9	10	12	16	24	36	48	60	72
1	p-2b	0	5052	16856	23995	23188	22343	19139	20641	19657	18653	17963	18819	18212	18711	19484	19318	18080	17474	15110	13842	12534	10847	9406
2	p-2b	0	1333	9176	12123	14445	16795	22459	20432	23083	21481	21058	21723	22622	23398	22396	21814	21455	20127	17412	18339	14329	14634	12220
3	p-2b	0	7580	19563	21907	23017	22320	20816	21401	20868	20795	20889	22187	20076	21185	21680	23418	20277	18642	16915	15866	13325	12442	11176
4	p-1b	0	19737	34578	30776	28765	27500	25752	25012	24028	22659	21907	23067	22891	22998	23136	22731	21489	21460	17647	15781	13740	11150	9183
5	p-1b	0	11569	12349	19034	19268	20025	20437	19946	20802	19218	18687	21557	20445	20162	20537	20330	18845	19016	16503	14434	10949	10146	8779
6	p-1b	0	2958	9119	16266	18864	21590	20721	21279	22304	20926	20487	22454	21404	22893	21554	22658	21543	21310	18055	14026	14205	12022	10701
7	p-2b	0	4459	12438	20121	23420	25008	23544	21785	21059	21278	21945	21685	20445	20505	20196	20867	19525	18905	15180	15244	12748	10691	7290
8	p-2b	0	11855	30250	34715	33053	29201	29083	28692	28121	27023	27289	26358	25769	27852	26583	25989	24323	26164	21265	17708	16050	12543	10204
9	p-2b	0	16813	26421	27378	25858	26243	24425	23442	22929	23065	23358	22674	22249	22029	20781	21511	20696	20401	17284	17048	14871	13968	13150
10	p-1b	0	5952	14919	22516	23485	27213	25312	24203	24932	26043	25696	26866	27702	28336	29056	29703	27274	26455	23408	18881	15972	13483	11601
11	p-1b	0	4780	11237	18026	19321	20592	20177	20728	20980	20348	20789	20386	21681	22982	21675	21368	19674	20251	16726	14303	13109	11279	10010
12	p-1b	0	8580	20170	26955	34876	32236	34276	33080	34713	33266	34861	35178	35907	35022	34862	35929	31406	31142	25550	20675	17565	15700	14106
13	p-1b	0	14126	16094	20225	19903	22699	23049	20386	20942	21025	20563	22596	23618	23813	22426	23998	21063	20423	17565	16725	14884	13736	11931
14	p-2b	0	28806	25177	29406	25302	28509	28465	27448	27908	27074	26284	28139	26700	27808	28850	27500	25693	23642	21138	18534	14332	13436	10655
15	p-2b	0	5168	13834	20614	21201	20003	18873	19800	20575	20346	19962	21530	21236	22032	21818	22490	20918	18956	16227	14810	11351	11223	9266
16	p-1b	0	29578	38072	35021	33575	32472	32047	32988	31402	31073	30746	33834	33520	33525	33066	33696	30456	30274	23989	20878	17659	14147	13396
17	p-1b	0	4436	14581	16731	13672	20752	22245	20905	22024	21088	18840	22825	23308	24976	24568	24378	23679	22006	19392	17645	14961	14647	12533
18	p-2b	0	6744	24633	29131	28351	28702	26976	27219	24206	27039	25711	28626	25781	27144	28527	29180	25562	25903	22975	21084	17686	17818	12992
19	p-2b	0	1471	7863	14190	14104	15424	16832	17001	17354	20168	20890	22480	23277	24607	25940	27082	25758	28597	24285	20669	17978	17202	14423
20	p-1b	0	4153	15422	19960	19310	22469	22937	23458	24406	24443	22887	24852	23572	25318	24293	23855	22058	21467	19322	17951	17089	15033	13979
X		0	9293	17750	21862	22047	22957	22694	22374	22491	22239	21944	23231	22877	23638	23397	23801	21895	21554	18380	16404	14066	12677	10813
SD		0	8348	9333	8098	7905	7020	6819	6667	6563	6422	6529	6762	6747	6817	6832	7100	6181	6332	5274	4427	3820	3573	3144

X: Promedio; SD: desviación estándar.

7.2. Curva de concentración plasmática

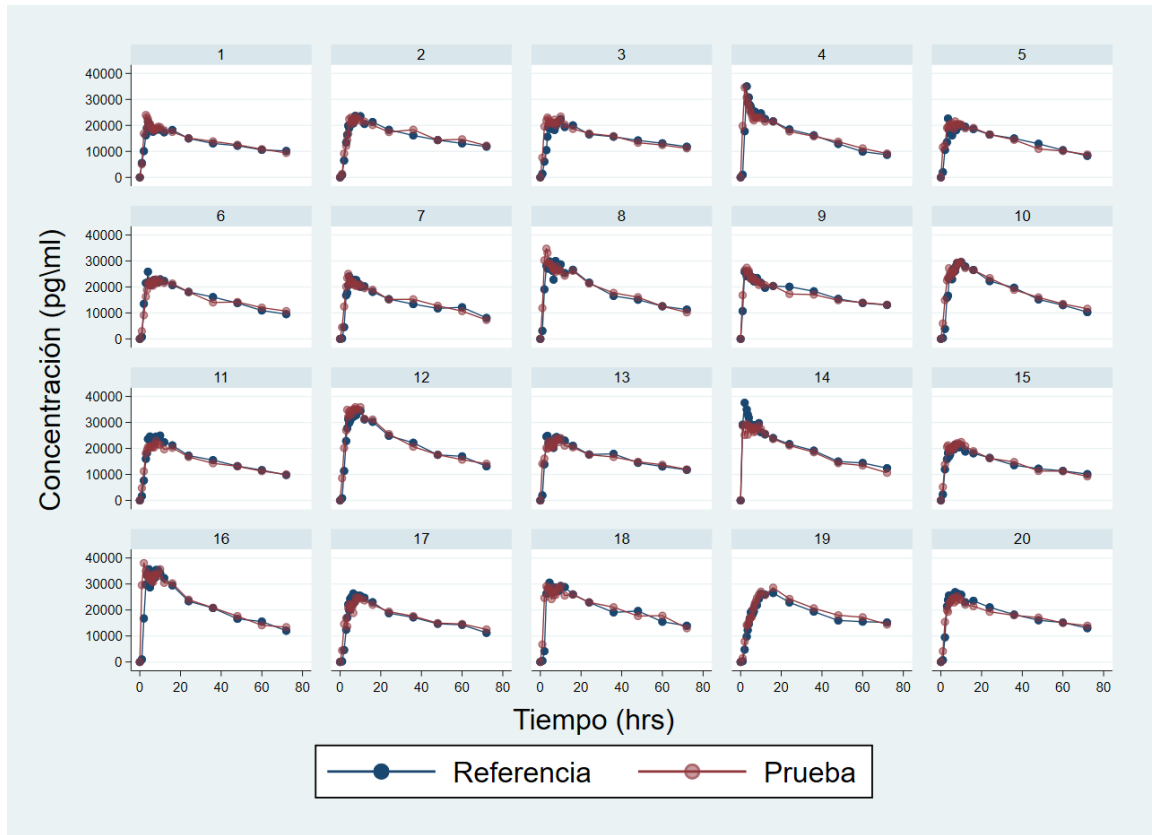
A partir de la estructura de datos de las tablas 7.1 y 7.2, se construyeron gráficos de concentración plasmática para cada uno de los voluntarios, por períodos y uno representativo para conjunto de datos con intervalos de confianza del 95 %, calculados a través de un modelo lineal mixto y el método Delta.

Figura 7.1: Curva de concentración plasmática individual para el conjunto A.



En la Figura 7.1, se presenta los casos de concentración plasmática para cada voluntario en estudio, del conjunto A, se observa bastante similitud entre ambos tratamientos con algunas diferencias en la $C_{m\acute{a}x}$ para el voluntario 13, 19 y 24.

Figura 7.2: Curva de concentración plasmática individual para el conjunto B.



En la Figura 7.2, se presenta los casos de de concentración plasmática para cada voluntario en estudio, del conjunto B, se observa bastante similitud entre ambos tratamientos y constante de eliminación (K_e) lenta pese a que hay 72 horas de seguimiento.

Conjunto A

Figura 7.3: Curva de concentración plasmática promedio del primer período.

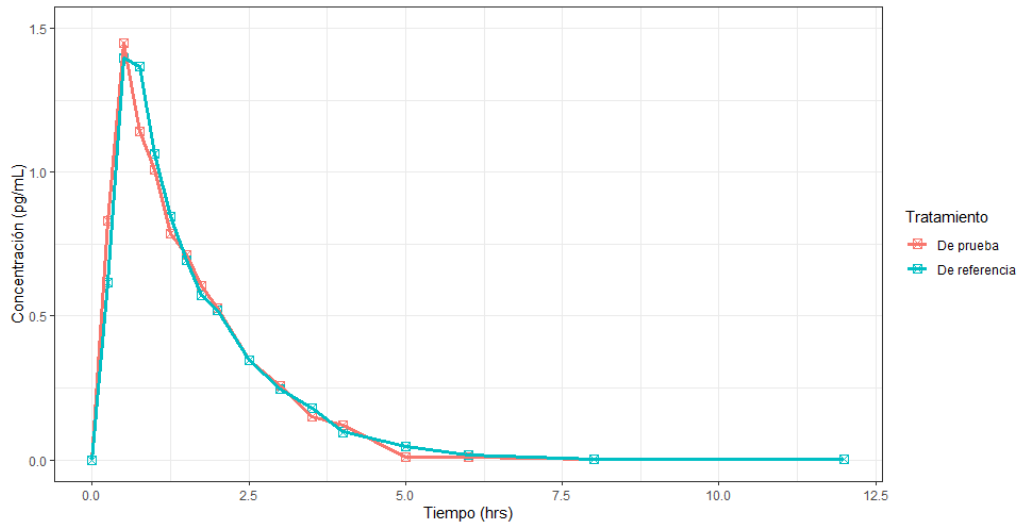
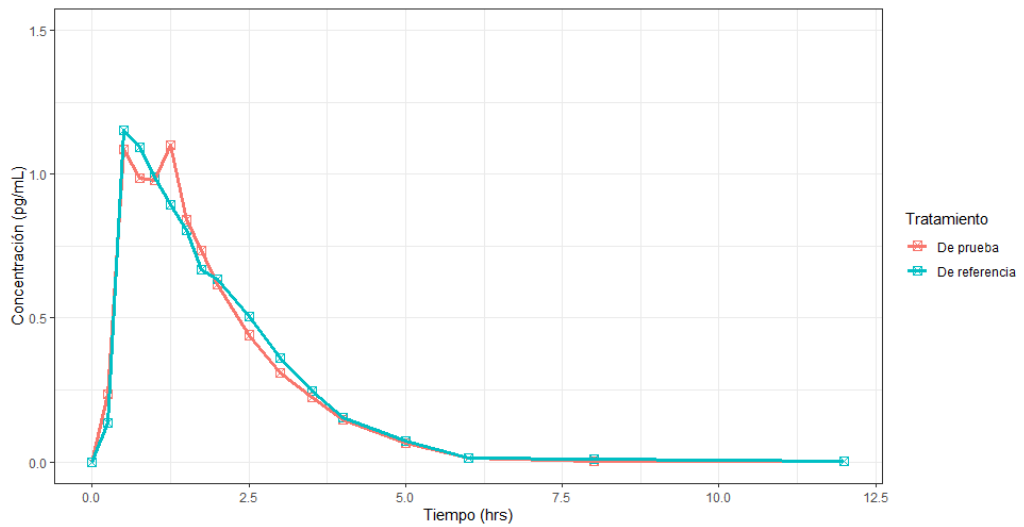


Figura 7.4: Curva de concentración plasmática promedio del segundo período.



En las Figuras 7.3 y 7.4 se presentan las concentraciones plasmáticas promedio para cada período en el conjunto A, se observa una gran similitud entre ambos tratamientos. Las diferencias encontradas en la Figura 7.1 no representan ser significativas.

Conjunto B

Figura 7.5: Curva de concentración plasmática promedio del primer período.

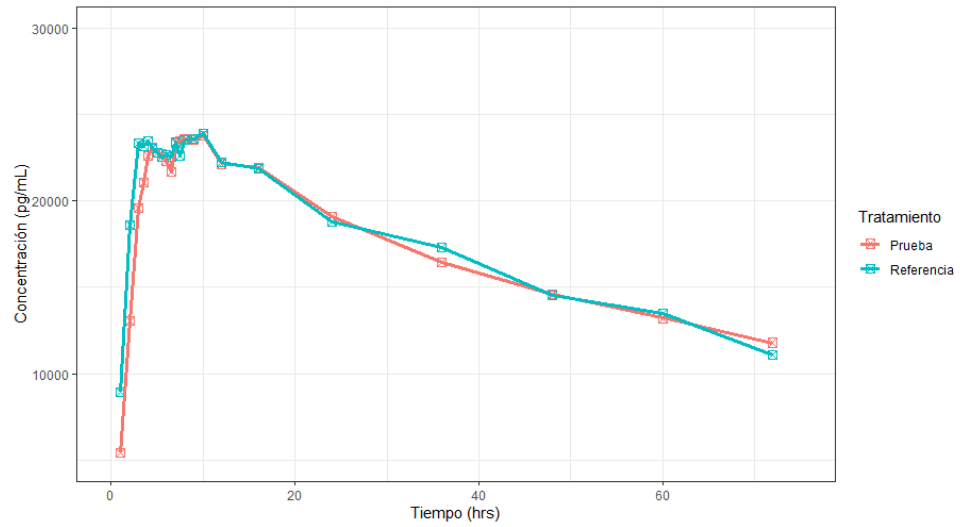
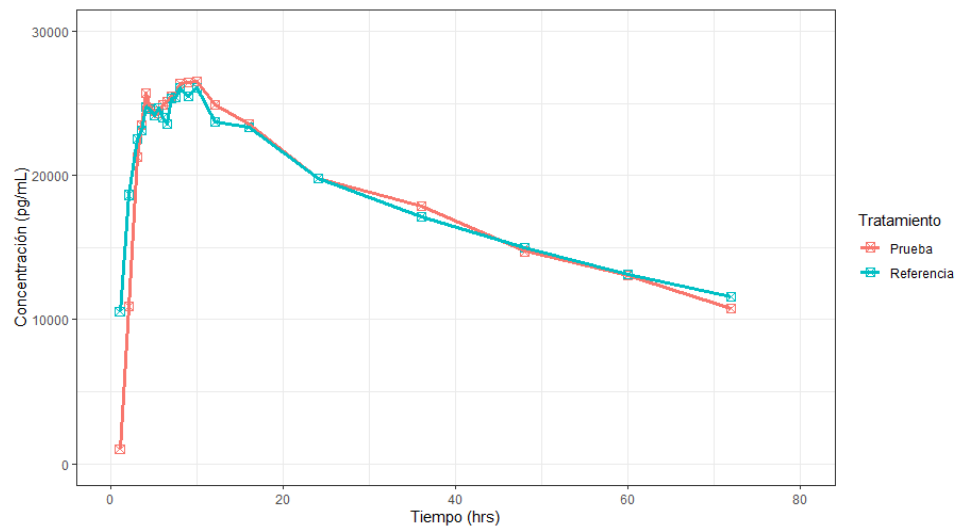


Figura 7.6: Curva de concentración plasmática promedio del segundo período.



En las Figuras 7.5 y 7.6 se presentan las concentraciones plasmáticas promedio para cada período del conjunto B, hay una gran similitud entre ambos tratamientos con una constante de eliminación del medicamento más lenta que el conjunto A.

En la Figura 7.7 y Figura 7.8 se observa la curva de concentración plasmática promedio por tratamiento, donde cada punto representa el promedio de concentración plasmática en 28 voluntarios del conjunto A y 20 voluntarios del conjunto B. Además, se presentan los intervalos de confianza, que representa la desviación estándar estimada a través del método Delta, donde previamente se ajustó un modelo mixto con el comando xtmixed de Stata, señalando la variable voluntario como efecto aleatorio y como efectos fijos las variables tiempo y tratamiento.

Figura 7.7: Curva de concentración plasmática promedio y intervalos de confianza del 95 % en el conjunto A.

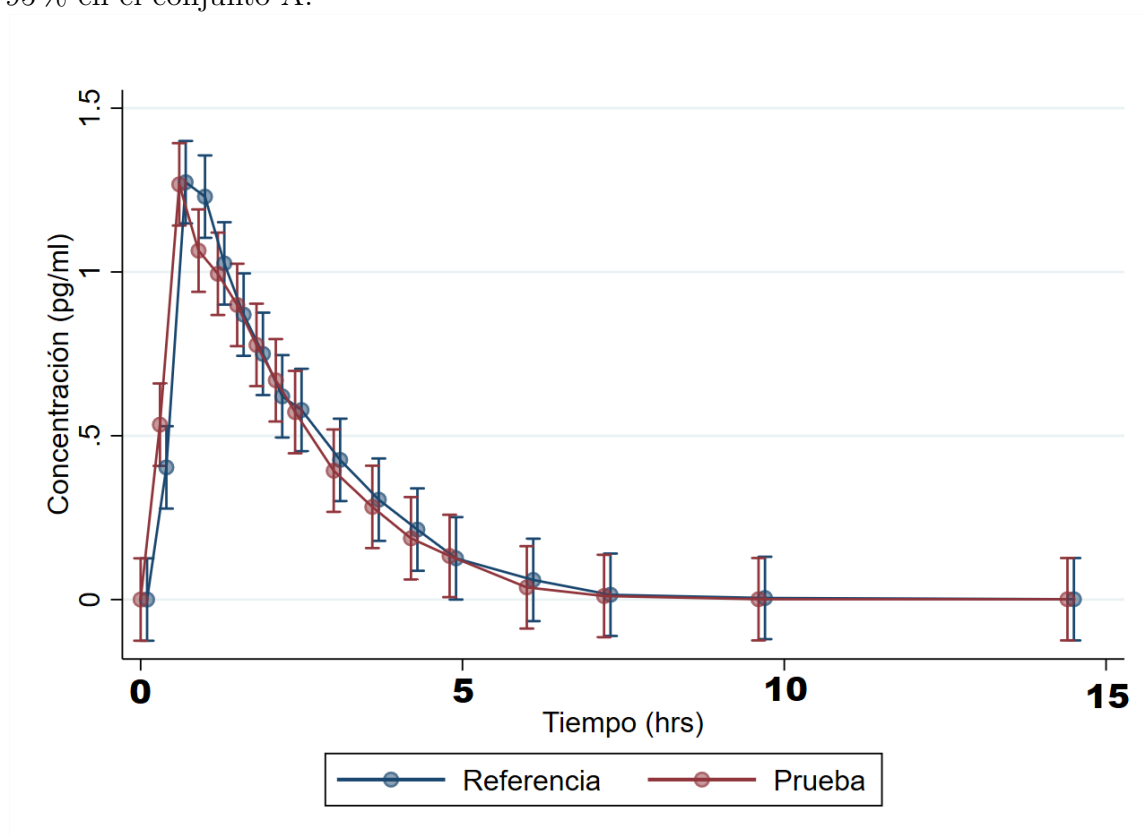
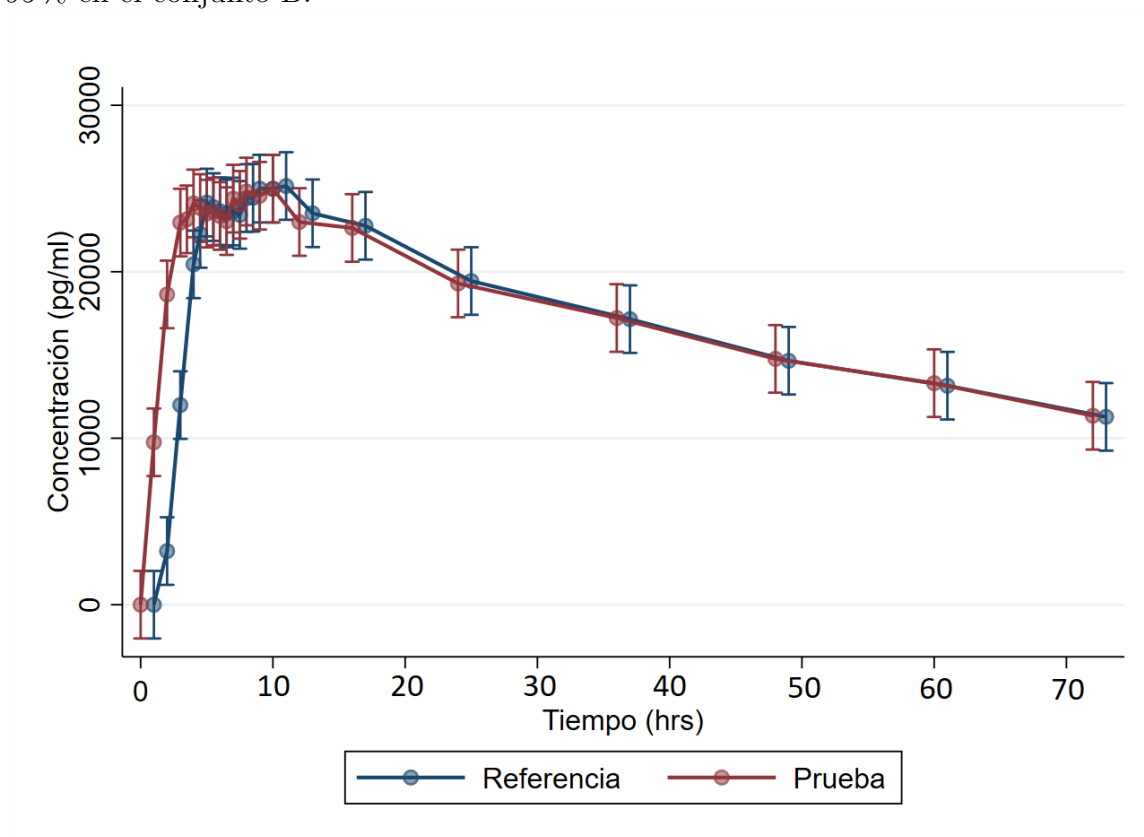


Figura 7.8: Curva de concentración plasmática promedio y intervalos de confianza del 95 % en el conjunto B.



7.3. Parámetros farmacocinéticos

Para realizar este análisis se utilizaron los datos obtenidos de la curva de concentración plasmática y con ayuda del comando `pkcollapse` del software Stata 17. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos para cada uno de los voluntarios. Antes de la utilización de este comando es importante remodelar los datos en formato amplio, donde la columna de concentración debe ser dividida por tratamiento.

Voluntario	Tiempo	Concentración prueba	Concentración referencia
1	0,00	0,000	0,000
1	0,25	0,349	0,001
1	0,50	0,733	0,325
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.

Los parámetros farmacocinéticos de mayor importancia son el AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ y $C_{m\acute{a}x}$ que son los utilizados para probar la bioequivalencia. Los parámetros $t_{1/2}$ y k_e fueron determinados por fines científicos ya que, no son utilizados para definir la bioequivalencia, pero son de utilidad para poder caracterizar el comportamiento de la formulación.

En las Tablas 7.6 y 7.8 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el tratamiento de prueba, para cada uno de los voluntarios del conjunto A y B.

En las Tablas 7.7 y 7.9 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el tratamiento de referencia, para cada uno de los voluntarios del conjunto A y B.

Tabla 7.6: Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de prueba del conjunto A.

Voluntario	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	ke	$C_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{m\acute{a}x})$
1	1,48	1,48	0,91	0,76	0,67	1,5	0,39	0,39	-0,41
2	1,80	1,80	1,11	0,62	1,68	0,5	0,59	0,59	0,52
3	2,55	2,55	0,93	0,75	2,05	0,5	0,94	0,94	0,72
4	3,15	3,15	0,82	0,84	1,70	1,25	1,15	1,15	0,53
5	2,21	2,21	1,12	0,62	2,57	0,5	0,79	0,79	0,94
6	2,86	2,86	0,86	0,81	2,08	0,5	1,05	1,05	0,73
7	2,64	2,64	0,85	0,82	1,19	0,75	0,97	0,97	0,18
8	3,07	3,07	0,87	0,79	2,26	0,5	1,12	1,12	0,81
9	1,52	1,52	0,89	0,78	0,95	1,5	0,42	0,42	-0,05
10	2,60	2,60	0,89	0,78	2,17	0,5	0,96	0,96	0,78
11	1,93	1,93	1,17	0,59	2,37	0,5	0,66	0,66	0,86
12	1,69	1,69	0,95	0,73	0,95	1	0,52	0,52	-0,06
13	2,38	2,38	1,05	0,66	3,33	0,25	0,87	0,87	1,20
14	2,87	2,87	0,84	0,83	1,35	1,25	1,06	1,06	0,30
15	2,97	2,97	0,87	0,80	2,14	0,75	1,09	1,09	0,76
16	2,68	2,68	0,85	0,81	1,64	1	0,99	0,99	0,50
17	2,19	2,19	0,97	0,72	2,08	1	0,79	0,79	0,73
18	3,48	3,48	0,93	0,74	1,45	0,5	1,25	1,25	0,37
19	1,67	1,67	0,86	0,80	0,80	2	0,51	0,51	-0,23
20	1,70	1,70	0,90	0,77	1,36	1,25	0,53	0,53	0,31
21	2,12	2,12	0,90	0,77	1,23	0,75	0,75	0,75	0,21
22	2,24	2,24	0,99	0,70	1,73	0,5	0,81	0,81	0,55
23	1,84	1,84	1,16	0,60	1,56	0,25	0,61	0,61	0,45
24	1,55	1,55	1,19	0,58	1,61	0,5	0,44	0,44	0,48
25	3,41	3,41	0,95	0,73	2,61	0,5	1,23	1,23	0,96
26	2,61	2,61	0,84	0,82	1,09	1	0,96	0,96	0,09
27	2,54	2,54	0,86	0,80	1,22	0,5	0,93	0,93	0,20
28	2,18	2,18	0,98	0,71	2,26	0,5	0,78	0,78	0,81

Tabla 7.7: Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de referencia del conjunto A.

Voluntario	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	ke	$C_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{m\acute{a}x})$
1	1,45	1,45	0,96	0,72	0,73	0,5	0,37	0,37	-0,31
2	1,84	1,84	0,99	0,70	1,67	0,5	0,61	0,61	0,51
3	2,43	2,43	0,93	0,75	1,68	0,25	0,89	0,89	0,52
4	3,02	3,02	0,82	0,85	1,20	1,25	1,11	1,11	0,18
5	1,98	1,98	1,02	0,68	1,53	0,5	0,68	0,68	0,42
6	3,49	3,49	0,79	0,88	1,80	1,5	1,25	1,25	0,59
7	3,69	3,69	0,94	0,74	3,17	0,5	1,31	1,31	1,15
8	3,16	3,16	0,87	0,80	1,85	0,5	1,15	1,15	0,62
9	1,84	1,84	0,91	0,76	0,94	0,5	0,61	0,61	-0,07
10	2,49	2,49	0,92	0,75	1,88	0,25	0,91	0,91	0,63
11	2,01	2,00	1,07	0,65	2,63	0,25	0,70	0,70	0,97
12	1,99	1,99	0,98	0,71	2,04	0,75	0,69	0,69	0,71
13	1,67	1,67	1,00	0,69	1,30	0,5	0,51	0,51	0,27
14	2,34	2,34	0,86	0,80	0,94	1	0,85	0,85	-0,07
15	2,51	2,51	0,89	0,78	1,22	0,75	0,92	0,92	0,20
16	2,52	2,52	0,88	0,79	1,21	1	0,92	0,92	0,19
17	2,08	2,08	1,01	0,69	1,92	0,5	0,73	0,73	0,65
18	4,27	4,27	1,23	0,56	3,72	0,5	1,45	1,45	1,32
19	2,17	2,16	0,92	0,75	2,26	0,75	0,77	0,77	0,82
20	2,05	2,05	0,88	0,78	1,47	1,25	0,72	0,72	0,38
21	2,84	2,84	0,88	0,79	1,99	0,75	1,04	1,04	0,69
22	1,63	1,63	0,89	0,78	0,65	2	0,49	0,49	-0,43
23	1,44	1,43	1,02	0,68	0,79	1,25	0,36	0,36	-0,23
24	1,19	1,18	1,15	0,60	0,79	0,75	0,17	0,17	-0,23
25	4,33	4,33	0,90	0,77	2,21	0,75	1,47	1,47	0,79
26	3,11	3,11	0,86	0,80	2,52	0,75	1,14	1,13	0,92
27	2,30	2,30	1,02	0,68	1,59	0,75	0,83	0,83	0,46
28	2,06	2,05	0,98	0,71	1,97	0,5	0,72	0,72	0,68

Tabla 7.8: Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de prueba del conjunto B.

Voluntario	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	ke	$C_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{m\acute{a}x})$
1	974210,25	1296676,00	68,14	0,01	21424,08	4	13,789	14,075	9,972
2	1152416,50	1490655,75	63,84	0,01	23662,7	7,5	13,957	14,215	10,072
3	1099035,63	1520774,63	74,08	0,01	22397,93	10	13,910	14,235	10,017
4	1145499,75	1267341,75	41,76	0,02	35022,51	3	13,951	14,052	10,464
5	1014685,75	1201556,13	52,73	0,01	22635,49	3,5	13,830	13,999	10,027
6	1121030,38	1318770,88	51,02	0,01	25850,78	4	13,930	14,092	10,160
7	1000834,25	1159084,50	50,33	0,01	24041,82	4,5	13,816	13,963	10,088
8	1307052,38	1491990,75	46,11	0,02	29986,86	7,5	14,083	14,216	10,309
9	1263314,13	1811764,38	81,36	0,01	25789,85	2	14,049	14,410	10,158
10	1321523,25	1470579,63	42,31	0,02	29496,58	10	14,094	14,201	10,292
11	1115145,00	1286270,00	47,94	0,01	24957,61	10	13,924	14,067	10,125
12	1565283,38	1794610,38	47,38	0,01	34629,52	9	14,264	14,400	10,452
13	1200138,75	1517131,63	61,16	0,01	24852,94	3,5	13,998	14,232	10,121
14	1410330,13	1674869,63	53,31	0,01	37578,8	2	14,159	14,331	10,534
15	1018095,63	1277141,50	59,81	0,01	21479,89	7	13,833	14,060	9,975
16	1514952,88	1673231,88	41,76	0,02	35693,65	4,5	14,231	14,330	10,483
17	1218791,00	1481437,88	56,00	0,01	26378,01	6,5	14,013	14,209	10,180
18	1448059,38	1826309,38	60,89	0,01	30530,52	4,5	14,186	14,418	10,326
19	1342044,50	1927108,00	77,05	0,01	26537,99	16	14,110	14,472	10,186
20	1317066,50	1699831,88	64,64	0,01	26862,28	7	14,091	14,346	10,198

Tabla 7.9: Parámetros farmacocinéticos del tratamiento de referencia del conjunto B.

Voluntario	AUC_{0-t}	$AUC_{0-\infty}$	$t_{1/2}$	ke	$C_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{m\acute{a}x})$
1	1004992	1273912	62,948	0,011	23994,85	3	13,820	14,058	10,086
2	1184510	1639115	75,285	0,009	23397,6	8	13,985	14,310	10,060
3	1120827	1446817	64,763	0,011	23417,66	10	13,930	14,185	10,061
4	1175520	1351486	48,972	0,014	34577,85	2	13,977	14,117	10,451
5	1009219	1184702	50,556	0,014	21557,42	7	13,825	13,985	9,978
6	1112289	1371654	57,397	0,012	22893,16	8	13,922	14,132	10,039
7	1030755	1171895	47,828	0,014	25008,29	4	13,846	13,974	10,127
8	1341324	1520487	46,460	0,015	34715,27	3	14,109	14,235	10,455
9	1227345	1808224	85,734	0,008	27378,09	3	14,020	14,408	10,217
10	1373365	1569570	46,307	0,015	29703,05	10	14,133	14,266	10,299
11	1065143	1290518	55,071	0,013	22981,93	8	13,879	14,071	10,042
12	1586668	1807137	45,619	0,015	35928,94	10	14,277	14,407	10,489
13	1195662	1568948	67,736	0,010	23998,19	10	13,994	14,266	10,086
14	1339767	1518990	46,355	0,015	29405,51	3	14,108	14,234	10,289
15	1041259	1217802	50,106	0,014	22490,28	10	13,856	14,013	10,021
16	1576977	1779722	44,549	0,016	38072,49	2	14,271	14,392	10,547
17	1243480	1611162	64,755	0,011	24975,76	8	14,033	14,292	10,126
18	1486049	1872001	63,456	0,011	29179,69	10	14,212	14,443	10,281
19	1437193	1969589	73,441	0,009	28597,44	16	14,178	14,493	10,261
20	1290724	1847466	79,930	0,009	25318,46	8	14,071	14,429	10,139

7.4. Modelo lineal mixto

A partir de información obtenida de los parámetros farmacocinéticos, es posible ajustar un modelo lineal mixto para la siguiente estructura de los datos.

Tabla 7.10: Estructura de los datos para la utilización del modelo lineal mixto.

Conjunto A							
Voluntario	Secuencia	Tratamiento	<i>Carryover</i>	período	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{máx})$
1	1	1	0	1	0,372	0,370	-0,311
1	1	2	1	2	0,394	0,393	-0,408
2	2	2	0	1	0,611	0,610	0,512
:	:	:	:	:	:	:	:
28	2	1	1	2	0,781	0,780	0,815

Conjunto B							
Voluntario	Secuencia	Tratamiento	<i>Carryover</i>	período	$\ln(AUC_{0-t})$	$\ln(AUC_{0-\infty})$	$\ln(C_{máx})$
1	1	1	0	1	13,789	14,075	9,972
1	1	2	1	2	13,820	14,058	10,086
2	1	1	0	1	13,957	14,215	10,072
:	:	:	:	:	:	:	:
20	2	1	1	2	14,091	14,346	10,198

En la Tabla 7.10 se presenta la estructura de los datos para la realización de un modelo lineal mixto, donde los datos deben estar perfectamente ordenados por voluntarios y por períodos. Además, las variables dicotómicas deben considerar valores entre uno y dos excepto la variable *carryover*, la cual toma valores entre cero y uno (0 = primer Período, 1 = Segundo período).

Tabla 7.11: Análisis de varianza para los parámetros farmacocinéticos del conjunto A.

$\ln(AUC_{0-t})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,01	1	0,01	0,03	0,856
Residual	4,04	26	0,16	8,06	0,000
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	0,04	0,851
Período	0,00	1	0,00	0,05	0,822
Residual	0,50	26	0,02		
Total	4,55	55			

$\ln(AUC_{0-\infty})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,01	1	0,01	0,03	0,856
Residual	4,04	26	0,16	8,06	0,000
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	0,04	0,851
Período	0,00	1	0,00	0,05	0,821
Residual	0,50	26	0,02		
Total	4,55	55			

$\ln(C_{m\acute{a}x})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,18	1	0,18	0,93	0,343
Residual	4,98	26	0,19	1,18	0,336
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	0,01	0,930
Período	0,01	1	0,01	0,09	0,766
Residual	4,21	26	0,16		
Total	9,38	55			

En la Tabla 7.11 se presentan los análisis de varianzas para los parámetros farmacocinéticos transformados logarítmicamente, donde no presenta indicios de un efecto de arrastre presente en las formulaciones de los productos. Además, los efectos de período y tratamiento no fueron significativamente diferentes (Sig. < 0,05).

Tabla 7.12: Análisis de varianza para los parámetros farmacocinéticos del conjunto B.

$\ln(AUC_{0-t})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,01	1	0,01	0,34	0,569
Residual	0,75	18	0,04	89,87	0,000
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	2,73	0,12
Período	0,00	1	0,00	0,71	0,41
Residual	0,01	18	0,00		
Total	0,78	39			

$\ln(AUC_{0-\infty})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,01	1	0,01	0,10	0,753
Residual	0,92	18	0,05	51,38	0,000
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	3,70	0,070
Período	0,01	1	0,01	5,57	0,030
Residual	0,02	18	0,00		
Total	0,95	39			

$\ln(C_{máx})$					
Fuente	SC	gl	MC	F	Sig.
Inter-sujeto					
Secuencia	0,04	1	0,04	0,63	0,437
Residual	1,03	18	0,06	15,36	0,000
Intra-sujeto					
Tratamiento	0,00	1	0,00	0,05	0,831
Período	0,01	1	0,01	1,87	0,188
Residual	0,07	18	0,00		
Total	1,14	39			

En la Tabla 7.12 se presentan los análisis de varianzas para los parámetros farmacocinéticos transformados logarítmicamente, donde no presenta indicios de un efecto de arrastre presente en las formulaciones de los productos. En cambio el efecto período para el parámetro $\ln(AUC_{0-\infty})$ presenta un p-valor significativo (Sig. < 0,05), esto indica que hay diferencias en el nivel de concentración plasmática en uno de los períodos.

7.4.1. Validación de los supuestos del modelo

Tabla 7.13: Resumen de la validación de los supuestos de los modelos ajustados.

Conjunto A								
Verificación de los supuestos	M.L.M		M.L.M		M.L.M		M.L.M.G	
	$\ln(AUC_{0-t})$		$\ln(AUC_{0-\infty})$		$\ln(C_{máx})$			
	e_{ijk}	$S_{i(k)}$	e_{ijk}	$S_{i(k)}$	e_{ijk}	$S_{i(k)}$	e_{ijk}	$S_{i(k)}$
Nomalidad (Shapiro Wilk)	0,44	0,13	0,44	0,13	0,61	0,02	-	-
Homocedasticidad (Bartlett)	0,69	0,80	0,70	0,81	0,34	0,28	0,77	0,79
Independencia (Gráfico)	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí	sí

Conjunto B						
Verificación de los supuestos	M.L.M		M.L.M		M.L.M	
	$\ln(AUC_{0-t})$		$\ln(AUC_{0-\infty})$		$\ln(C_{máx})$	
	e_{ijk}	$S_{i(k)}$	e_{ijk}	$S_{i(k)}$	e_{ijk}	$S_{i(k)}$
Nomalidad (Shapiro Wilk)	0,55	0,07	0,55	0,08	0,76	0,07
Homocedasticidad (Bartlett)	0,58	0,95	0,64	0,47	0,64	0,34
Independencia (Gráfico)	sí	sí	sí	sí	sí	sí

En la tabla 7.13 se presentan el resumen de la validación de supuestos de los modelos ajustados a partir de un modelo lineal mixto (M.L.M) y un modelo lineal mixto generalizado (M.L.M.G) suponiendo que la variable respuesta se distribuye Gamma. Se observa que en el caso $\ln(C_{máx})$, al no poder demostrar que los efectos aleatorios no se distribuyen de forma normal (valores sombreados en amarillo) se propone como alternativa utilizar un modelo lineal mixto generalizado el cual obtuvo resultados favorables.

7.5. Prueba de bioequivalencia promedio

Para probar la bioequivalencia de los medicamentos se usó dos métodos. El primero es el principio de inclusión de intervalos y el segundo método es una prueba bilateral conocida como *two one side test (TOST)* propuesta por Schuirman. Los resultados son presentados en la Tabla 7.14 con valores para los límites inferior y superior. Los parámetros farmacocinéticos $\ln(AUC_{0-t})$, $\ln(AUC_{0-\infty})$ y $\ln(C_{máx})$ para los conjuntos de datos A y B. Para el caso de principio de inclusión de intervalos están dentro de los límites de aceptación (80 % y 125 %) y en test de Suchuirman también están dentro de los límites de (-0,223 ; 0,223). Esto permite rechazar las hipótesis nulas para que exista bioequivalencia entre las formulaciones.

Tabla 7.14: Pruebas de bioequivalencia promedio IC90 % y TOST.

Conjunto A				
	Principio de inclusión de intervalos		Test de Schuirman	
	IC 90/ %		TOST	
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
$\ln(AUC_{0-t})$	93,84 %	106,90 %	-0,056	0,070
$\ln(AUC_{0-\infty})$	93,85 %	106,89 %	-0,056	0,070
$\ln(C_{máx})$	84,88 %	122,49 %	-0,193	0,174

Conjunto B				
	Principio de inclusión de intervalos		Test de Schuirman	
	IC 90/ %		TOST	
	Límite superior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior
$\ln(AUC_{0-t})$	99,93 %	102,45 %	-0,001	0,023
$\ln(AUC_{0-\infty})$	100,30 %	103,89 %	0,002	0,036
$\ln(C_{máx})$	95,83 %	103,36 %	-0,038	0,029

Capítulo 8

Simulación

8.1. Determinación del tamaño de muestra mediante el coeficiente de variación

Para efectos de simulación, en este capítulo solamente se utilizará el conjunto A, ya que este conjunto tiene una constante de eliminación más rápida, con la idea de representar fármacos que tengan las mismas características de eliminación del efecto de la dosis.

El parámetro farmacocinético seleccionado para el cálculo del tamaño de muestra es $\ln(C_{m\acute{a}x})$, ya que es el recomendado por la normativa chilena. A continuación se presenta el procedimiento para el cálculo del tamaño de muestra por el método del CV propuesto en el Capítulo 6.

El coeficiente de variación intra-sujeto para las formulaciones de prueba y de referencia viene dado por.

$$\widehat{CV}_T = \frac{\hat{\sigma}_{wT}}{\hat{\mu}_T} = 0,816 \quad \widehat{CV}_R = \frac{\hat{\sigma}_{wR}}{\hat{\mu}_R} = 1,009 \quad .$$

Por tanto, por el teorema del límite central, el CV_i se distribuye asintóticamente como una variable aleatoria normal con media CV_i y varianza σ_i^{*2}/n_i , donde

$$\sigma_T^{*2} = \frac{1}{2m}CV_T^2 + CV_T^4 = 0,059 \quad y \quad \sigma_R^{*2} = \frac{1}{2m}CV_R^2 + CV_R^4 = 0,088 \quad .$$

Bajo la hipótesis

$$H_0 : CV_T = CV_R \quad \text{v/s} \quad H_1 : CV_T \neq CV_R \quad ,$$

el estadístico de prueba es

$$T = \frac{\widehat{CV}_T - \widehat{CV}_R}{\sqrt{\widehat{\sigma}_T^{*2}/n_T + \widehat{\sigma}_R^{*2}/n_R}} = \frac{0,816 - 1,009}{\sqrt{0,059^2/28 + 0,088^2/28}} = |9,557|$$

El p-valor es calculado en base el estadístico y con 27 con grados de libertad para cada formulación $(n_T - 1, n_R - 1)$. El resultado de esta prueba indica un p-valor menor a 0,05, esto quiere decir que no hay suficiente evidencia para demostrar que hay diferencias entre los coeficientes de variación.

El cálculo del tamaño de muestra se determinó en base a un 80% de potencia y un nivel de significancia del 5%. En efecto,

$$n = \frac{(1,64 + 0,84)^2(0,059 + 0,088)}{(0,816 - 1,009)^2} = 24,5 \approx 25$$

Este valor implica que se necesitan 25 voluntarios para alcanzar una potencia del 80%. Es decir, con un 80% de probabilidad se rechazará bioequivalencia cuando verdaderamente no lo hay.

8.2. Determinación del tamaño de muestra mediante simulación

A partir del conjunto A, se genera una población de 5000 voluntarios. Para realizar la simulación se utilizó información de los coeficientes utilizados en el modelo lineal mixto, los cuales se presentan en la Tabla 8.1 juntos a los coeficientes simulados. La constante en este caso representa el promedio del $\ln(AUC_{0-t})$. También se incorpora información acerca de la estimación de los efectos aleatorios.

Tabla 8.1: Coeficientes originales y simulados del modelo lineal mixto $\ln(AUC_{0-t})$.

Coeficientes (original)		Coeficientes (simulación)	
Período	-0,008433	Período	-0,0083133
Secuencia	0,0192829	Secuencia	0,0245829
Tratamiento	0,0070371	Tratamiento	0,009994
Constante	0,8040437	Constante	0,7591933

Efectos Aleatorios		Efectos Aleatorios	
Aleatorios del sujeto	0,251	Aleatorios del sujeto	0,286
Residuos	0,133	Residuos	0,189

Tabla 8.2: simulación de una población de 5000 voluntarios de diseño cruzado aleatorizado.

Voluntario	Período	Secuencia	Tratamiento	$\ln(AUC_{0-t})$
1	2	1	2	0,426
1	1	1	1	0,859
2	1	1	1	0,717
2	2	1	2	0,661
.
.
.
5000	1	2	2	1,130
5000	2	2	1	0,915

En la Tabla 8.2, se presenta la estructura de los datos simulados a partir de la información recolectada del conjunto A. Los resultados de la simulación consisten en calcular

el promedio de aceptación bioequivalencia por medio del método *TOST*, considerando bioequivalencia cuando ambos límites de aceptación estén dentro del rango simétrico (-0,223 y 0.223). Se realizaron 100 simulaciones para cada tamaño de muestra, desde 10 voluntarios hasta 30 voluntarios.

En la Tabla 8.3 se presentan los promedios de aceptación de bioequivalencia y desviación estándar. Los datos simulados provienen de información de un modelo lineal mixto, considerando el parámetro $\ln(AUC_{0-t})$ como variable dependiente proveniente conjunto A. Se obtienen resultados favorables, con una aproximación del 90% en aprobación de bioequivalencia, considerando como mínimo 26 voluntarios sanos.

Tabla 8.3: Promedio de aprobación de bioequivalencia de 100 simulaciones para cada tamaño de muestra.

Tamaño muestral	Promedio	Desviación estandar
10	0,58	0,050
11	0,63	0,049
12	0,58	0,050
13	0,68	0,047
14	0,67	0,047
15	0,65	0,048
16	0,56	0,050
17	0,57	0,050
18	0,63	0,049
19	0,69	0,046
20	0,66	0,048
21	0,59	0,049
22	0,64	0,048
23	0,73	0,045
24	0,8	0,040
25	0,84	0,037
26	0,89	0,031
27	0,94	0,024
28	0,93	0,026
29	0,92	0,027
30	0,93	0,026

Capítulo 9

Conclusión del estudio

1. Se determinó la concentración plasmática promedio con márgenes de intervalos de confianza del 95 % y además la concentración plasmática individual, no se detectó ningún voluntario con alguna alteración significativa.
2. Se realizó el cálculo de los parámetros farmacocinéticos de los voluntarios del conjunto A y B. El conjunto B presentó una constante de eliminación lenta.
3. Se realizó el estudio de bioequivalencia para ambos conjuntos de datos siguiendo las recomendaciones de ISP.
4. El estudio fue completado de forma satisfactoria para los 28 voluntarios sanos del conjunto A y 20 voluntarios del conjunto B.
5. Se determinó que los productos de prueba son bioequivalentes en base a su producto de referencia.
6. Se determinó el tamaño muestra de 25 voluntarios para el conjunto A, con 80 % de potencia y 5 % de significancia
7. Se determinó mediante simulación un tamaño muestral mínimo de 26 voluntarios sanos, con un nivel aprobación de bioequivalencia de aproximadamente del 90 % para el conjunto A.

Se concluye que el estudio de bioequivalencia del conjunto A, que fue estudiado por una ARN, la cual considera una cantidad de 28 voluntarios sanos, es una cantidad aceptable para la determinación bioequivalencia. Por otra parte, si se considera el tamaño muestral mínimo recomendado por el ISP, el cual corresponde a 13 voluntarios. En este caso no sería suficiente, ya que se ha demostrado mediante simulación que con una cantidad de 13 voluntarios la probabilidad de cometer el error I es más del 30 %, quiere decir, que de 100 veces que se considera un tamaño muestral de 13 voluntarios en 33 ocasiones se determina no bioequivalencia cuando en realidad si lo era.

9.1. Discusión

Para evaluar la bioequivalencia en fármacos de baja variabilidad, se debe tener en cuenta la variabilidad de cada sujeto. Este enfoque ha sido recomendado por distintas agencias presentadas a lo largo de este trabajo de titulación, pero todos estos métodos sufren en general al momento de determinar un tamaño muestral para poder controlar el error tipo I, es decir, declarar bioequivalencia cuando no los es. Por lo general, se propone determinar un tamaño muestral mediante el coeficiente de variación, esto implica realizar el cálculo mediante una fórmula.

En este trabajo de titulación se propuso determinar el tamaño muestral mediante simulación, la ventaja que se obtiene, es una visión más amplia, ya que permite observar el comportamiento de bioequivalencia para distintos tamaños muestrales. La limitación de la simulación dependerá de la información de los fármacos y el tiempo del costo computacional.

En futuros trabajos, se propone realizar de forma más detallada el diagnóstico de los modelos mixtos, por ejemplo, el diagnóstico vía eliminación de observaciones, influencia en los estimadores de los efectos fijos, influencia en los efectos aleatorios e influencia sobre la función de verosimilitud.

Capítulo 10

Referencias

- Batista-Diéguez, D. (2018, 10 mayo). Tamaño de muestra adecuado para un Estudio de Bioequivalencia Cruzado. Farmazine. <https://farmazine.mx/articulos/tamano-de-muestra-adecuado-para-un-estudio-de-bioequivalencia-cruzado>
- Chow, S. C., Shao, J., Wang, H., y Lokhnygina, Y. (2017). *Sample Size Calculations in Clinical Research*, Third Edition. Taylor Francis.
- Chow, S. C., y Wang, H. (2001). On Sample Size Calculation in Bioequivalence Trials. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* N°2/VOL. 28.
- Chow, S., y Liu, J. (2008). *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. CRC Press.
- Daza, M. L. (2013). Biodisponibilidad y bioequivalencia in vitro en cápsulas de amoxicilina de 500 mg comercialidad en Bolivia. *CON-CIENCIA* N°1/VOL. 1, 93-104
- EMA. Questions & Answers: positions on specific questions addressed to the Pharmacokinetics Working Party (PKWP). European Medicines Agency, EMA/618604/2000 Rev. 12. London., 2015.
- Estévez-Carrizo, F. (2000). Estudios de bioequivalencia: enfoque metodológico y aplicaciones prácticas en la evaluación de medicamentos genéricos. *Rev Med Uruguay*; 16:133-143
- Estévez-Carrizo, F., Parrillo S., y Cedrés M. (2012). Estudios de bioequivalencia in vivo para demostrar la intercambiabilidad de medicamentos. *Rev Med Uruguay*; 28(3):165-173

- FDA U.S Food and Drug Administration. (2016). Guidance for industry: BIO-EQUIVALENCE: BLOOD LEVEL BIOEQUIVALENCE STUDY (VICH GL52). Department of Health and Human Services. Rockville.
<https://www.fda.gov/media/89840/download> [Acceso 8 Noviembre, 2021].
- Hauschke, D., Steinijans, V., y Pigeot, I. (2007). Bioequivalence studies in drug development: methods and applications. John Wiley & sons.
- Instituto de Salud Pública de Chile, 2019. Lineamiento para la realización de estudios para la demostración de equivalencia terapéutica en sistemas terapéuticos transdérmicos y parches de acción local. Gobierno de Chile.
- Jones, B., y Kenward, M. G. (2015). Design and Analysis of Cross-Over Trials, Third Edition. Taylor & Francis.
- León, E. (2004). Métodos de Estimación de Componente de Varianza en Poblaciones. Una Reseña Histórica. Revista computarizada del Instituto de Investigaciones porcinas. Vol: 11 N^o1- 2004, gaveta postal, punta Brava La Habana Cuba.
- O'Neill, M. (2010). ANOVA and REML.A guide to linear mixed models in an experimental design context. Statisticaladvisory and training servicePty. LTD.
- Patterson, S. D., y Jones, B. (2017). Bioequivalence and Statistics in Clinical Pharmacology. Amsterdam University Press.
- Santos, A. F. D., Santos, Q. A. D., Correa, C. E. M., y Coelho E., C. (2020). Evaluation of the bioequivalence of two formulations containing the combination of 400 mg of acetaminophen (paracetamol), 4 mg of phenylephrine and 4 mg of chlorpheniramine in capsules: open-label, three-way crossover study, partially replicated in healthy volunteers of both sexes. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 56, 1–12.
- Sánchez, M. P. (2020). Comunicación Personal
- Sánchez, M. P. (2010). Análisis de procedimientos para la evaluación de medicamentos: Bioequivalencia y Farmacogenética. Universitat de Barcelona. España.
<https://www.tesisenred.net/handle/10803/1568> [Acceso 24 Marzo, 2021].

Capítulo 11

Anexo

```
# Conjunto A

# Graficos de biodisponibilidad
clear all
version 17
cd "C:\Users\diego\Desktop\tesis libros\data concentraciones\csv"
import excel "farmaco a", firstrow clear
rename Subject id
rename Period periodo
rename Sequence secuencia
rename Treatment formulacion
rename Time time
rename Concentration conc
destring id, replace

replace conc =0.001 if conc == 0
replace conc = 0 if time == 0
drop secuencia periodo

generate byte treat = .
replace treat = 1 if formulacion == "R"
replace treat = 2 if formulacion == "T"
drop formulacion

tway (connected conc time if treat == 1) (connected conc time if treat == 2), by(id)
replace time = time*12
anova conc treat / id|treat time treat#time, repeated(time)
matrix list e(Srep)
contrast time@treat, effect
margins time, at(treat=1) pwcompare(effects) noestimcheck
margins time, at(treat=2) pwcompare(effects) noestimcheck
anova conc treat##time
contrast time@treat, effect
margins treat#time
marginsplot, x(time)

// forma 2
xtmixed conc treat##time || id:, var reml
contrast treat##time
margins treat#time
marginsplot, x(time)

// parametros farmacocinéticos, Conjunto A //

clear all
```

```

version 16
cd "C:\Users\diego\Desktop\tesis libros\data concentraciones\csv"
import excel "farmaco a", firstrow clear

rename Subject      id
rename Treatment    treat
rename Time         time
rename Concentration conc
destring id, replace
replace conc =0.001 if conc == 0
replace conc = 0 if time == 0
generate byte sequence = .
replace sequence = 1 if Sequence == "RT"
replace sequence = 2 if Sequence == "TR"
drop Sequence

// parametros farmacocineticos del producto de Prueba //

preserve
keep if sequence == 1
keep if Period == 2
drop treat
reshape wide conc, i(id time) j(Period)
rename conc2 prueba
pkcollapse time prueba, id(id) trapezoid fit(10)
save ab.dat, replace
restore
preserve
keep if sequence == 2
keep if Period == 1
drop treat
reshape wide conc, i(id time) j(Period)
rename conc1 prueba
pkcollapse time prueba, id(id) trapezoid fit(10)
save ba.dat, replace
restore
use ab.dat, clear
append using ba.dat
sort id
drop aucexp_prueba auclog_prueba tmax_prueba
rename half_prueba vida
rename auc_prueba auc
rename aucline_prueba aucline
rename ke_prueba ke
rename cmax_prueba cmax
rename tomc_prueba tmax

generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)
generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax= log(cmax)
export excel using "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco A\stata diego\Pk_referencia.xls",
sheetmodify firstrow(variables) nolabel keepcellfmt

// parametros farmacocineticos del producto de referencia //

import excel "farmaco a", firstrow clear
rename Subject      id
rename Treatment    treat
rename Time         time
rename Concentration conc
destring id, replace
replace conc =0.001 if conc == 0
replace conc = 0 if time == 0
generate byte sequence = .
replace sequence = 1 if Sequence == "RT"

```

```

replace sequence = 2 if Sequence == "TR"
drop Sequence
preserve
  keep if sequence == 1
  keep if Period == 1
  drop treat
  reshape wide conc, i(id time) j(Period)
  rename conc1 referencia
  pkcollapse time referencia, id(id) trapezoid fit(10)
  save ab.dat, replace
  restore
preserve
  keep if sequence == 2
  keep if Period == 2
  drop treat
  reshape wide conc, i(id time) j(Period)
  rename conc2 referencia
  pkcollapse time referencia, id(id) trapezoid fit(10)
  save ba.dat, replace
restore
use ab.dat, clear
append using ba.dat
sort id
drop aucexp_referencia auclog_referencia tmax_referencia

rename half_referencia vida
rename auc_referencia auc
rename aucline_referencia aucline
rename ke_referencia ke
rename cmax_referencia cmax
rename tomc_referencia tmax

//// transformacion logarimica ln natural

generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)
generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax= log(cmax)

export excel using "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco A\stata diego\Pk_prueba.xls",
sheetmodify firstrow(variables) nolabel keepcellfmt

// MLM y MLMG de los parámetros farmacocineticos //

clear all
version 17
cd "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco A\stata diego"
import excel "Modelo A mixto", firstrow clear

rename seq sequence
generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)
generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax = log(cmax)

// ln auc //
xtmixed ln_auc period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects

```

```

swilk res res2
imtest res
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway res res2
oneway res ln_aucline
oneway res2 ln_auc
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)

// ln_aucline //
xtmixed ln_aucline period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
swilk res res2
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway res res2
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)

// anova //
oneway ln_aucline period
anova ln_aucline period sequence treat

// ln_cmax //
xtmixed ln_cmax period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
swilk res res2
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway res ln_cmax
oneway res2 ln_cmax
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)

// caso mixto generalizado //
replace ln_cmax = ln_cmax*0+0.0001 if ln_cmax <= 0
meglm ln_cmax sequence treat period || id:, family(gamma) link(log)

```

```

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
predict REs
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm REs
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway rfit res2
oneway rfit ln_cmax
oneway REs ln_cmax
twoway(scatter res2 rfit), yline(0)
twoway(scatter REs res), yline(0)

// pruebas de bioequivalencia promedio //
pkcross ln_auc
pkcross ln_aucline
pkcross ln_cmax
swilk ln_auc ln_aucline ln_cmax
// IC 90%
sort period id
list, sep(4)
pkequiv cmax treat period seq id
pkequiv auc treat period seq id
pkequiv aucline treat period seq id
// tost
pkequiv cmax treat period seq id, tost anderson
pkequiv auc treat period seq id, tost anderson
pkequiv aucline treat period seq id, tost anderson

#### tamaño muestra en R-Studio 4.0.5
## un solo caso ln_cmax

library(readr)
library(readxl)
datos<- read_excel("C:/Users/diego/Desktop/Fármaco A/stata diego/model_mixed.xls")
shapiro.test(datos$ln_cmax) ## normal
## datos administrados previamente en stata
T <- read_excel("C:/Users/diego/Desktop/Fármaco A/stata diego/Pk_prueba.xls")
R <- read_excel("C:/Users/diego/Desktop/Fármaco A/stata diego/Pk_referencia.xls")

summary(T)
u1<-mean(T$ln_cmax) ;u1
u2<-mean(R$ln_cmax) ;u2
sdt<- sd(T$ln_cmax) ;sdt
sdr<- sd(R$ln_cmax);sdr
sd1<- ((sdt^2)*0.25+ (sdt^4));sd1
sd2<- ((sdr^2)*0.25+ (sdr^4));sd2
cvt <- sdt/u1 ;cvt
cvr <- sdr/u2 ;cvr

cvd<- cvt-cvr
s<-sqrt((sd1^2 / 28) + (sd2^2 / 28));s
p<- cvd/s;p
pt(q = p, df = 27) + (1 - pt(q = -p, df = 27))
#####
## 80% de potencia y 5% de significancia
n<- (1.64 + 0.84)^2*(sd1 + sd2) / (cvt - cvr)^2 ;n #24.5
#2.5
n<- (1.96 + 0.84)^2*(sd1 + sd2) / (cvt - cvr)^2 ;n #31.2
## potencia 90%
n<- (1.64 + 1.28)^2*(sd1 + sd2) / (cvt - cvr)^2 ;n #33.9;

```

```

## potencia 90% 2.5
n<- (1.96 + 1.28)^2*(sd1 + sd2) / (cvt - cvr)^2 ;n #41.83

# conjunto B
#graficos de biodisponibilidad
clear all
version 17
cd "C:\Users\diego\Desktop\tesis libros\data concentraciones\csv"
import delimited "farmaco b.csv", clear

rename voluntario id
rename muestra time
rename concentración conc
drop secuencia periodo
generate byte treat = .
replace treat = 1 if formulación == "A" //test
replace treat = 2 if formulación == "B" // ref
drop formulación
tway (connected conc time if treat == 1) (connected conc time if treat == 2), by(id)
replace time = time+1 if treat == 1
replace time = time*2

anova conc treat / id|treat time treat#time, repeated(time)
matrix list e(Srep)
contrast time@treat, effect
margins time, at(treat=1) pwcompare(effects) noestimcheck
margins time, at(treat=2) pwcompare(effects) noestimcheck
anova conc treat##time
contrast time@treat, effect
margins treat#time
marginsplot, x(time)
// otra forma
xtmixed conc treat##time || id:, var reml
contrast treat##time
margins treat#time
marginsplot, x(time)

## Calculo de los parámetros farmacocinéticos
clear all
version 16
cd "C:\Users\diego\Desktop\tesis libros\data concentraciones\csv"
import delimited "farmaco b.csv", clear

rename ivoluntario id
rename periodo Period
rename secuencia Sequence
rename formulaciã treat
rename muestra time
rename concentraciã conc
generate byte sequence = .
replace sequence = 1 if Sequence == "AB"
replace sequence = 2 if Sequence == "BA"
drop Sequence

// parametros farmacocineticos del producto de referencia //
preserve
keep if sequence == 1
keep if Period == 2
drop treat
reshape wide conc, i(id time) j(Period)
rename conc2 referencia
pkcollapse time referencia, id(id) trapezoid fit(10)
save ab.dat, replace
restore
preserve
keep if sequence == 2
keep if Period == 1
drop treat

```

```

    reshape wide conc, i(id time) j(Period)
    rename conc1 referencia
    pkcollapse time referencia, id(id) trapezoid fit(10)
    save ba.dat, replace
restore
use ab.dat, clear
append using ba.dat
sort id
drop aucexp_referencia auclog_referencia tmax_referencia
rename half_referencia vida
rename auc_referencia auc
rename aucline_referencia aucline
rename ke_referencia ke
rename cmax_referencia cmax
rename tomc_referencia tmax
generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)
generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax= log(cmax)
export excel using "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco B\stata\Pk_referencia.xls",
sheetmodify firstrow(variables) nolabel keepcellfmt

// parametros farmacocineticos del producto de Referencia //
import delimited "farmaco b.csv", clear
rename ivoluntario id
rename periodo Period
rename secuencia Sequence
rename formulaci3n treat
rename muestra time
rename concentraci3n conc
generate byte sequence = .
replace sequence = 1 if Sequence == "AB"
replace sequence = 2 if Sequence == "BA"
drop Sequence
preserve
    keep if sequence == 1
    keep if Period == 1
    drop treat
    reshape wide conc, i(id time) j(Period)
    rename conc1 prueba
    pkcollapse time prueba, id(id) trapezoid fit(10)
    save ab.dat, replace
restore
preserve
    keep if sequence == 2
    keep if Period == 2
    drop treat
    reshape wide conc, i(id time) j(Period)
    rename conc2 prueba
    pkcollapse time prueba, id(id) trapezoid fit(10)
    save ba.dat, replace
restore
use ab.dat, clear
append using ba.dat
sort id
drop aucexp_prueba auclog_prueba tmax_prueba
rename half_prueba vida
rename auc_prueba auc
rename aucline_prueba aucline
rename ke_prueba ke
rename cmax_prueba cmax
rename tomc_prueba tmax

//// transformacion logarimica ln natural
generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)

```

```

generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax= log(cmax)
export excel using "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco B\stata\Pk_prueba.xls",
sheetmodify firstrow(variables) nolabel keepcellfmt

## MLM MLMG
clear all
version 17
cd "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco B\stata"
import excel "Modelo B mixto", firstrow clear
rename seq sequence
generate float ln_auc= .
replace ln_auc = log(auc)
generate float ln_aucline= .
replace ln_aucline = log(aucline)
generate float ln_cmax= .
replace ln_cmax = log(cmax)

// ln auc
xtmixed ln_auc period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
swilk res res2
intest res
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway res res2
oneway res ln_aucline
oneway res2 ln_auc
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)

// ln aucline //
xtmixed ln_aucline period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
swilk res res2
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedasticity of level-1 residuals
oneway res res2
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)
// anova
oneway ln_aucline period
anova ln_aucline period sequence treat

```

```

// ln_cmax //
xtmixed ln_cmax period sequence treat || id:

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
swilk res res2
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm rstand
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedastictiy of level-1 residuals
oneway res ln_cmax
oneway res2 ln_cmax
tway(scatter rstand rfit), yline(0)
tway(scatter res2 rstand), yline(0)

// caso mixto generalizado //

replace ln_cmax = ln_cmax*0+0.0001 if ln_cmax <= 0
meglm ln_cmax sequence treat period || id:, family(gamma) link(log)

predict res, residuals
predict rstand, rstandard
predict rfit, fitted
predict res2, reffects
predict REs
//normality of level-1 residuals
histogram rstand, normal
qnorm REs
pnorm rstand
//normality of level-2 residuals
histogram res2, normal
qnorm res2
pnorm res2
//homoscedastictiy of level-1 residuals
oneway rfit res2
oneway rfit ln_cmax
oneway REs ln_cmax
tway(scatter res2 rfit), yline(0)
tway(scatter REs res), yline(0)

### pruebas de bioequivalencia promedio ##
pkcross ln_auc
pkcross ln_aucline
pkcross ln_cmax
swilk ln_auc ln_aucline ln_cmax

// IC 90%
sort period id
list, sep(4)
pkequiv cmax treat period seq id
pkequiv auc treat period seq id
pkequiv aucline treat period seq id

// tost
pkequiv cmax treat period seq id, tost anderson
pkequiv auc treat period seq id, tost anderson
pkequiv aucline treat period seq id, tost anderson

## simulación #
clear all
version 17

```

```

cd "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco A\stata diego\simulacion"
set obs 10000
/* coeficientes del modelo original
mu      + pi      + tau_d _ij  + sequence + sik      + eijk
0.8040437  -0.0084337  0.0070371  0.192829
                                         Normales
                                         de 0.2513034
                                         de      0.1337556
*/
generate id = _n      if _n <= 5000
replace id = _n -5000 if _n > 5000
generate period = 1 if _n <= 2500
replace period = 2 if _n > 2500
replace period = 2 if _n > 5000
replace period = 1 if _n > 7500
generate sequence = 1 if _n <= 2500
replace sequence = 2 if _n > 2500
replace sequence = 1 if _n > 5000
replace sequence = 2 if _n > 7500
generate treat = 1 if _n <= 2500
replace treat = 1 if _n > 2500
replace treat = 2 if _n > 5000
replace treat = 2 if _n > 7500
sort id
generate s = rnormal(0,0.2513034)
generate e = rnormal(0,0.1337556)
generate ln_auc = 0.8040437 - 0.0084337 + 0.0070371 - 0.192829 + s + e if _n <= 2500
replace ln_auc = 0.8040437 - 0.0084337 + 0.0070371 + 0.192829 + s + e if _n > 2500
replace ln_auc = 0.8040437 + 0.0084337 - 0.0070371 - 0.192829 + s + e if _n > 5000
replace ln_auc = 0.8040437 + 0.0084337 - 0.0070371 + 0.192829 + s + e if _n > 7500
replace ln_auc = 0.8040437 - 0.0084337 - 0.0070371 - 0.192829 + s + e if _n <= 2500
replace ln_auc = 0.8040437 - 0.0084337 - 0.0070371 + 0.192829 + s + e if _n > 2500
replace ln_auc = 0.8040437 + 0.0084337 + 0.0070371 - 0.192829 + s + e if _n > 5000
replace ln_auc = 0.8040437 + 0.0084337 + 0.0070371 + 0.192829 + s + e if _n > 7500

xtmixed ln_auc period sequence treat || id:
swilk ln_auc
histogram ln_auc, by(treat)
save "Pob sim ln_auc", replace
use "Pob sim ln_auc", clear

** un caso
bsample 27, cluster(id)
//swilk ln_auc //
sort period id
pkequiv ln_auc treat period seq id
ereturn list

// casos ln_auc //
clear all
capture program drop n_ln_auc
program n_ln_auc
postfile tutorial n sup inf using sim_ln_auc_ma'1', replace
forvalues i=1(1)100{
quietly{
use "Pob sim ln_auc", clear
bsample '1', cluster(id)
sort period id
list, sep(4)
pkequiv ln_auc treat period seq id
return list
post tutorial ('1') (r(uci)) (r(lci))
}
}
postclose tutorial
end

forvalues k=10(1)30{

```

```
    n_ln_auc 'k'  
  }  
  // se juntan las simulaciones en una sola base de datos  
  cd "C:\Users\diego\Desktop\Fármaco A\stata diego\simulacion\simulaciones"  
import excel "simulacion 100", firstrow clear  
generate bei = 1 if inf >= -0.223  
replace bei =0 if inf < -0.223  
generate bes = 1 if sup <= 0.223  
replace bes = 0 if sup > 0.223  
generate be = bei*bes  
mean be, over(n)
```