

Simulación Aplicada a un Ensayo de Bioequivalencia de Rifampicina

A. Viviana NISELMAN *¹, Marta GARCÍA BEN ² y Modesto C. RUBIO ¹

¹ Cátedras de Matemática y Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires 1113, Argentina.

² Cátedra de Estadística, Facultad de Ciencias Exáctas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,
Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. El objetivo de este trabajo es mostrar que una toma de decisión puede ser optimizada realizando una simulación exploratoria previa a un estudio de bioequivalencia. Los métodos estadísticos para bioequivalencia se aplican a datos simulados y experimentales de rifampicina. Estos métodos están basados en cuatro intervalos de confianza: paramétrico, no paramétrico, robustos usando M-estimadores con pesos de Tukey y robustos usando la distribución bootstrap, estos dos últimos con la corrección de Welch para varianzas distintas. Los métodos robustos asignan pesos a las observaciones, penalizando los datos atípicos.

SUMMARY. "Simulation Applied to a Bioequivalence Essay of Rifampicin". The aim of the present work is to show how decision may be optimized by making an exploratory simulation previously to any bioequivalence study. The statistical methods used to prove bioequivalence are applied to simulated and experimental data of rifampicine. These methods are based on four confidence intervals: parametric, non-parametric, robust based on M-estimators with Tukey's weights, and robust using the bootstrap distribution. This last two methods are used with Welch's correction for different variances. Robust methods assign weights to the observations to penalize the outliers.

INTRODUCCIÓN

Dos medicamentos se consideran bioequivalentes si al ser administrados en el mismo régimen de dosis tienen la misma biodisponibilidad. El diseño sugerido para un estudio de bioequivalencia es el "cross-over" y los parámetros que tradicionalmente se registran son: el área bajo la curva de concentración (AUC), el pico (C_{MAX}) y el tiempo para lograr la concentración al pico (T_{MAX}). Los procedimientos estadísticos recomendados para aceptar bioequivalencia de acuerdo a las normas para productos medicinales de la Comunidad Europea ¹ y de la *Farmacopea Americana* ² consisten, para las variables AUC y C_{MAX}, en aplicar primero la transformación logarítmica a los datos de AUC y C_{MAX} y después verificar que el intervalo de confianza paramétrico ³ para la diferencia de medias entre la formulación test y la formulación referencia esté incluido en el intervalo de bioequivalen-

PALABRAS CLAVE: Bioequivalencia, Estadística, Rifampicina, Simulaciones.

KEY WORDS: Bioequivalence, Rifampicine, Simulations, Statistics.

* Autora a quien debe dirigirse la correspondencia

cia (θ_1, θ_2) establecido por las agencias regulatorias. El sugerido para AUC y CMAX es $\theta_1 = \log(0,80)$ y $\theta_2 = \log(1,25)$. En el caso de la medida TMAX no se aplica la transformación logarítmica, se recomienda el intervalo no paramétrico ^{4,5} y como intervalo de bioequivalencia $\theta_1 = -0,20$, X_R y $\theta_2 = 0,20$, X_R , donde X_R es el promedio de la variable TMAX para la formulación referencia.

El hecho de que la bioequivalencia no se pueda probar con la muestra seleccionada no significa que las formulaciones sean "bioinequivalentes". Un estudio de bioequivalencia puede resultar sin conclusión; podríamos estar usando un método estadístico inadecuado o estar usando un procedimiento adecuado y recomendado, pero bajo hipótesis que no se cumplen o tener la presencia de "outliers".

En este trabajo se agregan dos intervalos más: robustos usando M-estimadores con pesos de Tukey ^{6,7} y robustos usando la distribución "bootstrap" ⁸, con la corrección de Welch para varianzas distintas ⁹.

ESTUDIO DE SIMULACIÓN

Se realiza un estudio de simulación para comparar la potencia de los 4 procedimientos considerados. Para simular un ensayo, se generan muestras de 6 sujetos que recibieron las formulaciones en el orden referencia-test y 6 sujetos que las recibieron en el orden test-referencia. Para cada sujeto se genera una curva de concentración-tiempo usando un modelo de un compartimiento con administración oral y velocidad de absorción y eliminación de primer orden.

Sea $C(t)$ la concentración plasmática en el instante t .

$$C(t) = C_p(t, K_a, K_e, V_d, F, D) \cdot \epsilon_t$$

Considerando un sujeto de 70 Kg es

$$C_p(t) = \frac{F K_a D}{70 \cdot V_d (K_a - K_e)} \{ \exp(-K_a \cdot t) - \exp(-K_e \cdot t) \}$$

Nosotros simulamos a esta expresión funcional con la suposición de que los errores transformados mediante la función logaritmo tienen una distribución normal $N(0, \sigma)$ con $\sigma = \log 1,1$, para obtener una variabilidad intraindividual de aproximadamente 10%.

Con el objeto de simular la variabilidad interindividual las constantes cinéticas K_a , K_e , F , V_d se generan con distribución normal con la media y varianza poblacionales que para cada droga están estimadas en la bibliografía ¹⁰.

Para Rifampicina (media \pm desvío estándar) son:

$$F = 1, K_a = 2 \pm 0,24 \text{ (1/h)}, V_d = 1 \pm 0,4 \text{ (l/Kg)}, T_{1/2\beta} = 3,5 \pm 0,8 \text{ (h) } F$$

La curva promedio simulada se muestra en la Figura 1.

Entre las formulaciones test y referencia el parámetro que se varía es el "F" de la formulación test, generando perfiles plasmáticos de formulaciones con distinta fracción biodisponible. A partir de ellos se obtienen las medidas AUC y CMAX con las que se calculan los intervalos de confianza y se verifica si caen dentro del intervalo de bioequivalencia.

Luego se hacen simulaciones similares con outliers entre los datos.

Si llamamos τ a la varianza estimada del $\log(\text{AUC})$, los outliers para la medida AUC se generan sumando variables $N(0, 25 \cdot \tau)$ a un 10% de los datos de $\log(\text{AUC})$ de ambas muestras referencia y test (análogamente con CMAX).

En cada simulación se generan un millón de perfiles plasmáticos de cada formulación de los que se obtienen los parámetros farmacocinéticos. Esto se hace en dos pasos: primero se generan 1000 muestras de AUC, CMAX y TMAX; luego se generan 1000 muestras bootstrap para cada uno de estos parámetros.

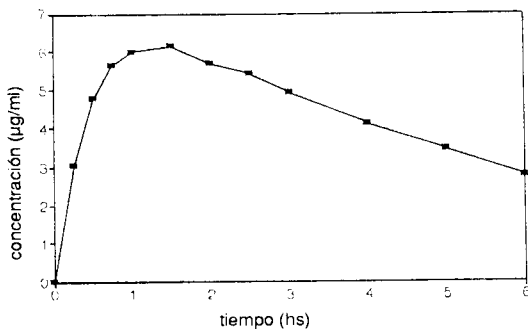


Figura 1. Rifampicina. Curva promedio simulada

RESULTADOS DE LA SIMULACIÓN

Las Figuras 2 y 3 muestran las curvas de potencia para las medidas AUC y CMAX cuando los datos son normales y las Figuras 4 y 5 corresponden a datos con outliers.

Se observa la pérdida de potencia del método paramétrico, en relación a los otros, cuando los datos contienen outliers.

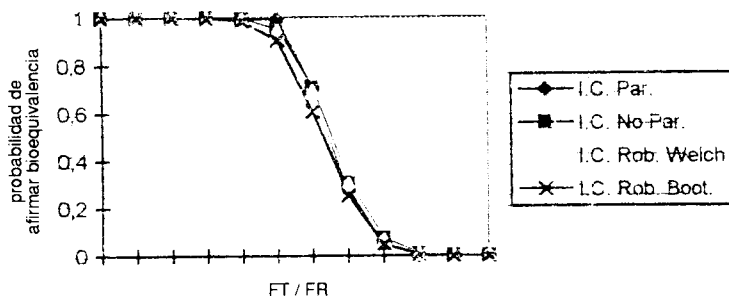


Figura 2. Rifampicina-Simul/F-Normales. Medida registrada AUC. FT/FR = cociente de la fracción biodisponible test/referencia.

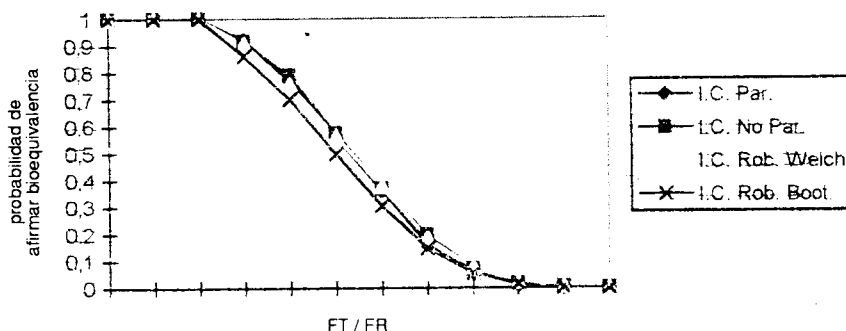


Figura 3. Rifampicina-Simul/F-Normales. Medida registrada CMAX. FT/FR = cociente de la fracción biodisponible test/referencia.

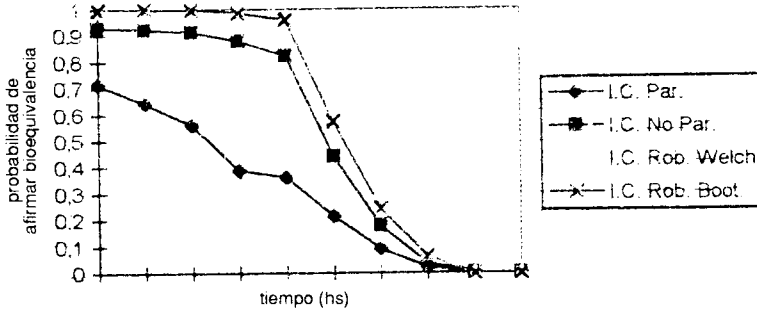


Figura 4. Rifampicina-Simul/F-Outliers. Medida registrada AUC.
 FT/FR = cociente de la fracción biodisponible test/referencia.

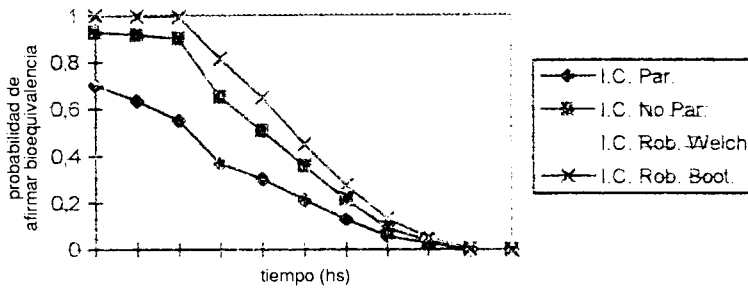


Figura 5. Rifampicina-Simul/F-Outliers. Medida registrada CMAX.
 FT/FR = cociente de la fracción biodisponible test/referencia.

ESTUDIO EXPERIMENTAL

Se realiza un estudio de bioequivalencia de dos formulaciones de Rifampicina. El diseño experimental para el estudio del perfil plasmático de las formulaciones test y referencia es cross-over. Intervienen 12 voluntarios sanos de sexo masculino de edad entre 18 y 25 años. Los mismos reciben, en todos los casos, un comprimido de 600 mg de rifampicina con 150 ml de agua luego de 8 horas de ayuno.

El dosaje de droga en plasma se realiza por cromatografía líquida de alta resolución según el método de Lecaillon¹¹. La mañana del estudio se inserta una cánula venosa en el brazo de los voluntarios ayunados, tomándose 7 ml de sangre venosa en tubos heparinizados a los siguientes tiempos: 0 h, 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 2,5 h, 3 h, 4 h, 5 h y 6 h.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

La Figura 6 muestra las curvas promedio experimentales de las formulaciones referencia y test.

La Tabla 1 muestra los resultados de aplicar los métodos estadísticos a los datos experimentales.

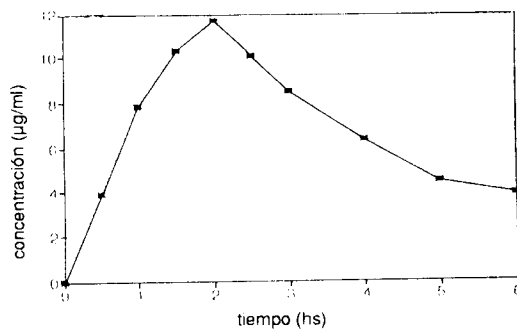


Figura 6. Rifampicina. Curva promedio experimental.

Región	Medida	I.C. paramétrico	I.C. no paramétrico	I.C. robusto	I.C. robusto bootstrap
0,80 1,25	AUC	0,76 0,94	0,77 0,96	0,79 0,96	0,79 0,99
0,80 1,25	C _{MAX}	0,86 0,96	0,88 0,96	0,86 0,95	0,85 0,96

Tabla 1. Rifampicina. I.C: intervalos de confianza

La medida T_{MAX} no se analiza porque todas las curvas plasmáticas experimentales tienen el mismo tiempo al pico. No se puede afirmar la bioequivalencia entre las formulaciones por caer los intervalos de confianza fuera de la región permitida para los AUC.

Todos los métodos dan resultados parecidos. Esto avala que la falta de equivalencia biológica no se debe a la presencia de outliers entre los datos.

Los intervalos de confianza se construyen con dos muestras: una correspondiente al orden referencia-test y otra correspondiente al orden test-referencia. Los "pesos de Tukey" para la primera muestra son: 0,98; 0,91; 0,99; 0,99; 0,89; 0,62 y para la segunda muestra: 0,04; 0,96; 0,95; 0,87; 0,95; 0,96; lo que nos reitera que no aparecen outliers groseros entre los datos.

DISCUSIÓN

Los resultados de la simulación muestran que al usar el método paramétrico clásico unos pocos outliers hacen que el mismo pierda mucha potencia y no logre demostrar bioequivalencia aún cuando las formulaciones produzcan perfiles plasmáticos similares, lo que no ocurre con los métodos robustos.

Al aplicar los métodos a los resultados experimentales, todos los métodos concuerdan que no hay outliers entre los datos, porque si los hubiera el paramétrico daría peor. Por otra parte no se obtuvieron pesos de Tukey con valor 0, lo que indicaría un outlier grosero.

Una forma de identificar los outliers es aplicar primero intervalos de confianza paramétricos y luego tests de identificación de outliers. Sin embargo los intervalos clásicos al estar muy influenciados por los outliers pueden impedir una buena identificación posterior.

Es mejor emplear un intervalo resistente a outliers, como el robusto, para la identificación de los mismos.

CONCLUSIÓN

La presencia de outliers hace fallar la suposición de normalidad en que se basa el método paramétrico y aumenta la longitud del intervalo de confianza, por lo que cabe la posibilidad de que la bioequivalencia no se pueda demostrar mediante el uso de los procedimientos paramétricos recomendados.

Si todos los métodos coinciden, la decisión se reafirma. Es bueno distinguir si la presencia de outliers es la razón por la cual no se puede probar la bioequivalencia. En este caso se debería detectar cuáles son dichos outliers y qué causas los produjeron. Estos outliers se originan en muchos casos en subpoblaciones genéticas donde por alteraciones en el funcionamiento gastrointestinal o hepático se alterna los tiempos de absorción, la fracción absorbida o la eficacia del metabolismo presistémico¹². Si la presencia de outliers se descarta, como en el caso experimental mostrado en este trabajo, queda comprobado que son otros los motivos por los que falla la bioequivalencia, y no así la sensibilidad del procedimiento estadístico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. European Community (1992) *"Rules Governing Medical Products in European Community"*. Vol 3, págs.159-61, 010/92a
2. U.S.P. XXII (1995) *"Guidances. In vivo Guidances"*, págs. 1923-32
3. Schuirman, D. (1987) *J. Pharmacokin. Biopharm.* **15**: 657-80
4. Hauschke, D., V.W. Steinijans & E. Diletti (1990) *Int. J. Clin. Pharm. Ther. Toxicol.* **28**: 72-8
5. Hollander, M. & D.A. Wolfe (1983) *"Nonparametric statistical methods"*. John Wiley & Sons, New York
6. Hampel, F. R., E. M. Ronchetti, P. J. Rousseeuw & W. J. Stabel (1986) *"Robust statistics the approach based on influence functions"*. Ed Wiley, New York
7. Staude, R.G. & S.J. Sheater (1990) *"Robust estimation and testing"*. Ed Wiley, New York
8. Efrom, B. & R. Tibshirani (1993) *"An introduction to the bootstrap"*. Ed Chapman and Hall, New York & London.
9. Welch, L. (1947) *Biometrika* **34**: 28-35
10. Vožeh, S., W. Taeschner & M. Wenk (1990) *"Pharmacokinetic drug data in clinical pharmacokinetic"*. Adis Press, Aveckland, New Zeland
11. Lecaillon, J.B., N. Fevre, J.P. Metayer & C. Souppart (1978) *J. Chromatogr.* **145**: 369-73
12. Llerens, A., J. Cobaleda, C. Martínez & J. Benitez (1996) *Europ. J. Drug Metab. Pharmacokin.* **21**: 129-38