

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

**Estudio prospectivo, aleatorizado, abierto, cruzado, comparativo para
establecer en sujetos sanos la bioequivalencia de Metotrexato tabletas de
2.5 mg: Metotrexato de prueba vs Metotrexato de referencia**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

PRESENTA

M.C.P. AMILCAR ESQUIVEL AGUILAR

Director de Tesis: D. en C. Jorge Eduardo Herrera Abarca

Co-Director de Tesis: D. en C. Eduardo Padilla Camberos

Asesor: M. en C. Daniel Ruiz Molina

GUADALAJARA, JALISCO, DICIEMBRE, 2017

Guadalajara, Jalisco a 15 de Diciembre de 2017.

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL
ESTADO DE JALISCO, A.C.

PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Examen de Grado estudiante **M.C.P. Amilcar Esquivel Aguilar**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ESTUDIO PROSPECTIVO, ALEATORIZADO, ABIERTO, CRUZADO, COMPARATIVO PARA ESTABLECER EN SUJETOS SANOS LA BIOEQUIVALENCIA DE METOTREXATO TABLETAS DE 2.5 MG: METOTREXATO DE PRUEBA VS METOTREXATO DE REFERENCIA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el estudiante para aspirar al grado de Maestro en Investigación Clínica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 15 del mes de Diciembre del año 2017.

Dra. Ana Laura Marquez Aguirre
Presidente

M. en C. Daniel Ruiz Molina
Secretario

Dr. Jorge Eduardo Herrera Abarca
Vocal

Dr. Eduardo Padilla Camberos
Comité

JUNTA DIRECTIVA

DIRECTOR DE TESIS

D.C. Jorge Eduardo Herrera Abarca

CO-DIRECTOR DE TESIS

D.C. Eduardo Padilla Camberos

ASESOR DE TESIS

M. en C. Daniel Ruiz Molina

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El financiamiento del presente estudio estuvo a cargo de los patrocinadores Zurich Pharma S.A. de C.V. y la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimiento Especiales, S.C. (CECYPE) quienes facilitaron los recursos financieros, medicamentos de prueba y de referencia, personal médico y paramédico de apoyo de las unidades clínica y analítica, infraestructura y equipos para la realización del estudio.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mi esposa e hijos

Por darme su apoyo para continuar con este proyecto de vida juntos.

A mis padres

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han inculcado siempre.

A mis maestros

Por su motivación para la culminación de mis estudios de posgrado, además de marcar cada etapa de mi desarrollo profesional y personal. Mi agradecimiento especial al M. en C. Daniel Ruiz, quien con su paciencia logro estimular mi deseo de superación.

I. ÍNDICE DE CONTENIDO

JUNTA DIRECTIVA	2
FUENTE DE FINANCIAMIENTO	3
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS	4
I. ÍNDICE DE CONTENIDO	5
II. ÍNDICE DE TABLAS	7
III. ÍNDICE DE FIGURAS	8
IV. ABREVIATURAS	9
1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCION	12
3. MARCO TEORICO	14
4. JUSTIFICACIÓN	19
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
6. HIPÓTESIS	21
7. OBJETIVOS	22
7.1. Objetivo General.....	22
7.2. Objetivos Particulares.....	22
8. METODOLOGÍA	23
8.1. Etapa Clínica	23
8.1.1. Diseño Experimental y tipo de estudio.....	23
8.1.2. Criterios de Inclusión.....	24
8.1.3. Criterios de Exclusión.....	26
8.1.4. Grupos de estudio.....	27
8.1.5. Tamaño de la muestra.....	27
8.1.6. Aspectos éticos y/o legales.....	28
8.1.7. Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación.....	29
8.1.8. Aprobación por autoridades regulatorias.....	29
8.1.9. Formato de consentimiento informado.....	29
8.1.10. Confidencialidad, responsabilidad, compensación e indemnización.....	30
8.2. Etapa analítica	30
8.3. Etapa Farmacocinética y Estadística	31

8.3.1.	Análisis Farmacocinético.....	31
8.3.1.1.	Área bajo la curva (ABC).....	32
8.3.1.2.	Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$).....	32
8.3.1.3.	Tiempo al cual se observa la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$).....	32
8.3.1.4.	Constante de eliminación (k_e)	32
8.3.1.5.	Vida media de eliminación ($t_{1/2}$)	32
8.3.2.	Análisis Estadístico.....	33
8.3.2.1.	Análisis de Varianza.....	34
8.3.2.2.	Hipótesis de la prueba	35
8.3.2.3.	Intervalo de confianza clásico.....	36
8.4.	Materiales	38
8.4.1.	Etapla clínica	38
8.4.2.	Etapla analítica.....	39
8.4.3.	Etapla estadística	40
9.	RESULTADOS	41
9.1.	Etapla clínica	41
9.2.	Etapla analítica.....	46
9.3.	Etapla estadística	57
9.3.1.	Análisis de Varianza (ANADEVA).....	58
10.	DISCUSIÓN	61
11.	CONCLUSIONES	63
12.	PERSPECTIVAS	64
13.	REFERENCIAS	65
14.1.	Anexo 1: Cronograma de Actividades.....	67
14.2.	Anexo 2: Horario de toma de muestras	68
14.3.	Anexo 3: Formato de Consentimiento Informado.....	69

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de parámetros farmacocinéticos reportados en estudios de bioequivalencia en voluntarios sanos y pacientes.	18
Tabla 2. Resultados de variaciones permitidas en el electrocardiograma de los sujetos incluidos.....	42
Tabla 3. Resultados de variaciones permitidas en el Laboratorio clínico de los sujetos incluidos.....	43
Tabla 4. Datos demográficos de los sujetos incluidos en el estudio de Metotrexato.....	44
Tabla 5. Resumen de la validación del método analítico para cuantificar metotrexato .	47
Tabla 6. Concentraciones Plasmáticas de metotrexato tabletas de 2.5 mg (n=14)	54
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos para cada sujeto de investigación	55
Tabla 9. Resultados de los parámetros farmacocinéticos del medicamento de prueba y de referencia (n=14)	57
Tabla 10. Análisis de Varianza para evaluar los parámetros $C_{máx}$ y ABC_{0-t}	59
Tabla 11. CV% inter e intrasujeto obtenidos en población mexicana del estudio de bioequivalencia de Metotrexato vs. Ledertrexate®.....	59
Tabla 12. Resultados de las pruebas estadísticas aplicadas a los parámetros farmacocinéticos de $C_{máx}$ y ABC_{0-t} (nivel de confianza del 90%)	60

III. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metotrexato.....	17
Figura 2. Diseño de estudio cruzado 2 X 2.....	23
Figura 3. Blanco de reactivos	48
Figura 4. Mezcla de plasma de diferentes fuentes	48
Figura 5. Blanco de plasma lipémico	49
Figura 6. Blanco de Plasma Hemolizado.....	49
Figura 7. Mezcla de plasmas + metotrexato	49
Figura 8. Mezcla de plasmas + estándar interno	50
Figura 9. Mezcla de plasmas + metotrexato + estándar interno	50
Figura 10. Mezcla de plasmas + Anticoagulante (EDTA)	50
Figura 11. Mezcla de plasmas + anticoagulante (Heparina).....	51
Figura 12. Mezcla de plasmas + fármaco (analgésico).....	51
Figura 13. Mezcla de plasmas + fármaco (AINEs).....	51
Figura 14. Mezcla de plasmas + fármaco (AINEs).....	52
Figura 15. Calibración analítica para cuantificar metotrexato	52
Figura 16. Perfil farmacocinético promedio de metotrexato en escala normal (dosis 2.5 mg). A=Referencia, Ledertrexate [®] , B = Prueba, metotrexato	56
Figura 17. Perfil farmacocinético promedio de metotrexato en escala semilogaritmica (dosis 2.5 mg). A=Referencia, Ledertrexate [®] , B = Prueba, metotrexato	56
Figura 18. Histogramas de Frecuencia de la diferencia, cociente y logaritmo del cociente para los parámetros farmacocinéticos de C _{máx} y ABC _{0-t} de metotrexato.....	58

IV. ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva de la concentración plasmática
ABC_{0→t}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde el tiempo 0 hasta el último tiempo de muestreo
ABC_{0→∞}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde el tiempo 0 extrapolado al infinito.
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANADEVA	Análisis de Varianza
BHC	Biometría Hemática Completa
°C	Grados centígrados
CIOMS	Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas
C_{máx}	Concentración plasmática máxima.
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
CV	Coefficiente de Variación
DE	Desviación Estándar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etildiaminotetraacético - Anticoagulante
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Administración de Drogas y Alimentos (USA)
g	Gravedad o gramos (ver contexto)
h	Horas
HBsAg	Antígeno de Superficie de Hepatitis B
H₀	Hipótesis nula
H₁	Hipótesis alterna
IC	Intervalos de Confianza
Kg	Kilogramo
m²	Metro cuadrado
m	Metros
min	Minutos
mL	Mililitro
mg	Miligramos

mmHg	Milímetros de mercurio
n	Numero de sujetos del estudio
ng	Nanogramos
RNA	Ácido Ribonucleico
t_{máx}	Tiempo en alcanzar la concentración plasmática máxima
t_{1/2}	Tiempo medio de eliminación
HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i> – Análisis de Detección de Enfermedades venéreas.

1. RESUMEN

La terapia con metotrexato es ampliamente usada en el tratamiento de diversas enfermedades neoplásicas, así como también en pacientes con artritis reumatoide y psoriasis.

En la actualidad existe interés por generar formulaciones genéricas de metotrexato, para proporcionar a los pacientes una opción más económica y de esta forma, mejorar la adherencia al tratamiento, con formulaciones que demuestren ser estadísticamente iguales al producto de referencia.

Este estudio fue diseñado para evaluar la bioequivalencia de una formulación de prueba por vía oral, con dosis única de 2.5 mg (una tableta) en apego a los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013, mediante el empleo de un diseño experimental cruzado 2 X 2, aleatorizado, abierto, con un periodo de lavado de 7 días, en el cual se incluyeron 14 sujetos hombres, mexicanos y clínicamente sanos.

Se tomaron muestras sanguíneas mediante el esquema de muestreo 0.250, 0.500, 0.667, 0.833, 1.000, 1.250, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 6.000, 8.000, 12.000, 16.000 y 24.000 horas post-administración. Durante este mismo tiempo se evaluó el perfil de seguridad mediante la presencia de eventos adversos (EA).

Los valores promedio de $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} para el medicamento de prueba y referencia fueron 82.25 y 87.69 ng/mL, 245.70 y 242.71 h*ng/mL y 253.19 y 248.90 h*ng/mL respectivamente. Los IC al 90% para $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} de metotrexato fueron de 81.9700 - 112.7013 y de 88.5748 - 124.4497 respectivamente. Estos resultados demostraron que el producto de prueba es bioequivalente con el medicamento de referencia, ya que los IC al 90%, de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} , se encuentran contenidos dentro de los límites de aceptación del 80-125%.

2. INTRODUCCION

Al medicamento que es resultado de una investigación y que sale al mercado con una denominación distintiva (nombre comercial) se le llama innovador. Suele estar protegido por una patente, de tal manera que no puede ser copiado y comercializado por algún otro fabricante durante el tiempo que dura la patente, que en nuestro país es por lo general de 20 años. Este medicamento, mientras está protegido por la patente, también se suele conocer como medicamento de patente, aunque ambos términos no son sinónimos. Cuando la patente vence, sigue siendo el innovador pero ya no es más de patente. Al concluir el periodo protegido por la patente se libera la posibilidad de utilizar el principio activo para fabricar medicamentos diferentes del innovador pero que contiene la misma sustancia, el mismo fármaco, aunque ciertamente el proceso de fabricación puede ser diferente del que se emplea en el innovador y la denominación distintiva (nombre comercial) también es distinto. Estas “copias” del innovador se denominan genéricos y cuando tienen un nombre comercial se llaman genéricos de marca y suelen ser de calidad farmacéutica heterogénea (Guinzberg, 2011).

La FDA tiene publicadas las Guías para la Industria para la determinación estadística de la bioequivalencia, donde se describe la comparación entre el producto de prueba y el producto de referencia y estos estudios son necesarios para la aprobación de los fármacos nuevos o genéricos (Herring, 2016).

En México el criterio para dictaminar bioequivalencia en estudios farmacocinéticos entre los medicamentos de prueba y de referencia, con base en la normatividad nacional, son los intervalos de confianza al 90% del cociente de las medias geométricas (prueba/referencia) de los parámetros $C_{m\acute{a}x}$ y ABC de acuerdo al diseño, los cuales se deben encontrar entre 80 y 125% (NOM-177-SSA1-2013).

Por las características farmacocinéticas, la biodisponibilidad variable de los fármacos, la influencia de las diferencias en las técnicas y procesos farmacéuticos, incluidas las

posibles diferencias en la calidad y tipo de ingredientes en la formulación, es indispensable realizar estudios comparativos con nuevas formulaciones farmacéuticas provenientes de diversos laboratorios.

Es muy importante evaluar que los productos en desarrollo dentro del concepto de genéricos aporten evidencia de una absorción y biodisponibilidad adecuada y equivalente a la del producto de referencia. De tal modo que se garantice que el intercambio de marca comercial no sea en detrimento del tratamiento que sigue el paciente, además de cumplir con los requisitos legales exigidos por la autoridad sanitaria.

3. MARCO TEORICO

La incorporación en el mercado farmacéutico de los medicamentos denominados “genéricos”, presenta un interés económico relevante, ya que el costo de un tratamiento con estos fármacos suele ser inferior al tratamiento con otros productos que contienen el mismo principio activo y en la misma forma farmacéutica del producto innovador (Zapater & Horga, 1999). El menor costo se debe a que la inversión económica realizada por el laboratorio farmacéutico para su desarrollo y comercialización del producto genérico es menor que en el caso de los innovadores (Magazzini, 2001). Por lo tanto, para sustituir medicamentos innovadores por genéricos, se debe contar con evidencia científica, basada en estudios de equivalencia terapéutica in vivo (estudios de bioequivalencia) o in vitro (perfiles de disolución) (Zapater & Horga, 1999), dependiendo de la prueba requerida por la entidad regulatoria para formulaciones sólidas.

Después de la administración oral, el metotrexato se absorbe activamente en el yeyuno proximal, con una biodisponibilidad media absoluta que oscila entre 30-90%. El efecto de primer paso hepático de metotrexato a 7-OH-metotrexato se estima alrededor del 10%, pero con una gran variabilidad interindividual de 0.94 a 13.2%. Las diferencias en la actividad de las enzimas aldehído oxidasa y xantina oxidasa, ambas posiblemente involucradas en el catabolismo de metotrexato a 7-OH-metotrexato, pueden explicar esta alta variabilidad interindividual. El tiempo en el que se alcanza la concentración máxima en plasma ($t_{m\acute{a}x}$) es 0.75-2.00 horas después de la administración oral, el grado de absorción no se ve alterado por los alimentos (van Roon & van de Laar, 2010)

El metotrexato tiene un volumen de distribución de 0.7 - 1.4 L / kg, lo que refleja la distribución intracelular, se transporta activamente a eritrocitos, glóbulos blancos, hepatocitos y sinoviocitos a través del transportador de folato reducido (RFC). Alrededor del 5 - 7% de la dosis de metotrexato se recupera como 7-OH-metotrexato en la orina, el cual es menos soluble en agua que el metotrexato, lo que puede contribuir a la nefrotoxicidad aguda debida a la precipitación en la orina ácida (van Roon & van de Laar, 2010). Los metabolitos aparecen en la orina del hombre 24 horas después de la

administración intravenosa de metotrexato. La formación de metabolitos de metotrexato en el hombre está relacionada con metabolismo durante el ciclo enterohepático (Han Wan, 1974).

La eliminación de metotrexato es trifásica, la primera vida media es de aproximadamente 45 minutos y refleja la fase de distribución, la segunda se debe principalmente a la depuración renal y es de aproximadamente 3.5 horas y la vida media terminal puede reflejar la circulación enterohepática de metotrexato y oscila entre 10 a 12 horas. La semivida terminal del metotrexato determina la gravedad de la toxicidad hematológica y gastrointestinal (PDR.Net, 2017).

El metotrexato, como antagonista del ácido fólico, bloquea la síntesis de purinas y pirimidinas mediante la inhibición de varias enzimas. La inhibición de la dihidrofolato reductasa (DHFR) que disminuye los niveles de tetrahidrofolato (THF), inhibición de la timidilato sintasa (TS) que interfiere con la síntesis de ADN e inhibición de la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótida (AICAR). El efecto sobre la biosíntesis de purina y pirimidina también es responsable de muchas toxicidades del metotrexato, incluida la supresión de la médula ósea, la toxicidad hepática y la estomatitis. Durante los últimos 20 años, se ha documentado que la administración de suplementos de ácido fólico (de 1 a 5 mg / día) ayuda a prevenir las toxicidades asociadas al metotrexato (Tian & N. Cronstein, 2007).

El metotrexato se ha utilizado para producir regresión en una amplia gama de condiciones neoplásicas incluyendo linfoma no Hodgkin, leucemias agudas, sarcomas ontogénicos y en tumores sólidos particularmente en glándulas mamarias, pulmón, cabeza, cuello, vejiga ovario y en carcinoma testicular (Regulating Medicines and Medical Devices, 2014). Su uso en pacientes con tumores cerebrales se limita principalmente al linfoma primario del sistema nervioso central (PCNSL), en el cual es la piedra angular de la quimioterapia (Danafar & Hamidi, 2016). Metotrexato como un fármaco antitumoral es eficaz como agente único o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos. Los avances en la terapia de metotrexato de enfermedades malignas han llegado a través del

desarrollo de diferentes regímenes de dosificación, ya sea solo o combinado con otros fármacos. Por lo tanto, el conocimiento sobre la farmacocinética de metotrexato después de diferentes vías de administración es invaluable y debería ser útil para desarrollar rutas óptimas y esquemas de dosificación (Han Wan, 1974).

El metotrexato, administrado por vía oral a dosis bajas con un régimen de dosificación semanal, ha mostrado tener eficacia y seguridad en el tratamiento de la artritis reumatoide, estudios prospectivos a largo plazo han demostrado tener eficacia sostenida, reducciones en la dosificación requerida de Corticosteroides y un descenso en la sedimentación globular de los pacientes (Kozloski, 1992). Más recientemente, se han comparado nuevos agentes de tratamiento con el metotrexato, incluidos los agentes biológicos, ya que cuando se comienza más temprano en el curso de la enfermedad, el metotrexato es casi tan efectivo como los modificadores de la respuesta biológica para el tratamiento de la artritis reumatoide. El metotrexato ahora se administra comúnmente en combinación con agentes biológicos u otros fármacos antirreumáticos. Se ha informado que las terapias de combinación tienen una mayor eficacia que cualquier agente único solo sin mayor toxicidad (Tian & N. Cronstein, 2007).

El metotrexato es la terapia sistémica más antigua y efectiva para la psoriasis y la artritis psoriásica (Lebwohl, 2005). En dosis bajas es una terapia inmunosupresora y antiinflamatoria establecida para la psoriasis generalizada y palmoplantar resistente al alquitrán, retinoides, psoralenos y luz ultravioleta. El fármaco también es eficaz en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide, la sarcoidosis o la enfermedad de Crohn.

Los problemas más importantes con la terapia a dosis bajas de metotrexato son: primero, inducir la remisión de la enfermedad o al menos disminuir sus síntomas a un nivel aceptable, segundo, alcanzar la dosis de mantenimiento más baja y tercero, mantener la remisión de la enfermedad durante un largo período sin toxicidad (Chládek, 2002).

El nombre sistemático de metotrexato es: (2S)-2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-il) metilmetilamino] benzoil] amino] ácido pentanodoico, la fórmula empírica de es: $C_{20}H_{22}N_8O_5$ y su peso molecular es de 454.43928 g/mol y su fórmula estructural es (PubChem, 2017):

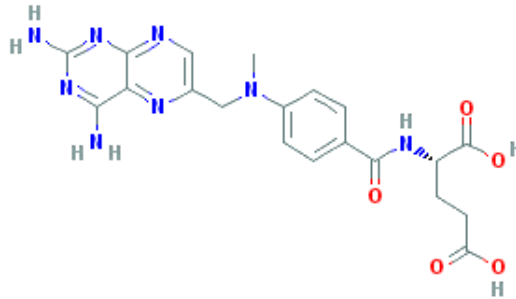


Figura 1. Metotrexato

La tabla 1 muestra los resultados farmacocinéticos de metotrexato en estudios que se han realizado, donde se demostró su bioequivalencia en sujetos hombres sanos (Approval Letter, 1997) y en pacientes con psoriasis (Regulating Medicines and Medical Devices, 2014), los diseños utilizados fueron de tipo abierto, aleatorizado, dosis única, cruzado, dos periodos y dos secuencias, en condiciones de ayuno, donde se tomaron muestras de sangre durante 24 horas en sujetos sanos y 48 horas en pacientes después de la administración del medicamento, con un periodo de lavado de al menos 5 días entre las sesiones. Los IC al 90% presentados en *Approval Letter 40-233* fueron para $C_{m\acute{a}x}$ 91.46 – 103.94, ABC_{0-t} 94.26 – 103.40 y ABC_{0-inf} 97.58 – 105.61 y los presentados en *Public Assessment Report* fueron para $C_{m\acute{a}x}$ 90.37 – 104.99, ABC_{0-t} 94.89 – 102.81 y ABC_{0-inf} 94.97 – 102.82. Los intervalos de confianza al 90% se encontraron dentro de los criterios de aceptación de 80.00 – 125.00%, con lo cual se demostró que las formulaciones evaluadas fueron bioequivalentes respecto al medicamento de referencia.

Tabla 1. Resultados de parámetros farmacocinéticos reportados en estudios de bioequivalencia en voluntarios sanos y pacientes.

	Prueba			Referencia		
	C_{máx}	ABC_{0-t}	ABC_{0-inf}	C_{máx}	ABC_{0-t}	ABC_{0-inf}
(Regulating Medicines and Medical Devices, 2014) 2.5 mg (n=24)	85.505 (16.91)	313.044 (66.18)	319.765 (67.1800)	87.998 (18.96)	316.101 (64.28)	322.786 (65.55)
(Approval Letter, 1997) 5 mg (n=26)	144.29 (34.61)	393.85 (99.99)	433.58 (95.14)	146.83 (29.38)	396.62 (93.09)	428.75 (95.08)
(Regulating Medicines and Medical Devices, 2014) 10 mg &	143.2245	616.1694	649.2756	146.8425	620.5333	657.6389

Media Aritmética (DE), C_{máx} (ng/mL), ABC (ng.h/mL), & Pacientes con psoriasis

4. JUSTIFICACIÓN

El problema actual para todos los involucrados con medicamentos genéricos, es saber si dos medicamentos tienen el mismo efecto terapéutico, especialmente si se tiene en cuenta las falsificaciones, las adulteraciones, la gran cantidad de medicamentos genéricos de dudosa calidad y otros problemas existentes, no sólo en nuestro país, sino a nivel internacional, especialmente en los países tercermundistas, es así, que la implementación de normativas de biodisponibilidad/bioequivalencia en todos los países de la región se hace inaplazable, a fin de garantizar la eficacia y seguridad de todos los medicamentos comercializados (Moreno, 2004).

México cuenta con la normatividad para establecer la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, con pruebas que demuestren que éstos son equivalentes con respecto al medicamento de referencia, para asegurar la validez de los estudios, es necesario que éstos se realicen de manera científica y técnica, así como con calidad y en apego a la regulación, por Terceros Autorizados específicamente para este propósito, que sean capaces de demostrar su competencia técnica y cumpliendo con lo establecido en la normatividad vigente y en las demás disposiciones jurídicas aplicables (NOM-177-SSA1-2013).

El estudio planteado pretende proporcionar información sobre el comportamiento farmacocinético y seguridad de metotrexato (producto de prueba), en voluntarios sanos, con la finalidad de poder contar con un producto genérico en el mercado a un menor costo para la población sin sacrificar el desempeño y efecto de que tiene el producto de referencia.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los estudios de Bioequivalencia, las normas que los regulan, los principios activos y formas farmacéuticas que los requieren, se han convertido en las últimas décadas en temas de discusión para las Autoridades Reguladoras a nivel mundial.

En México, se ha trabajado desde 1998 en sus normativas y guías para la realización de los estudios de Bioequivalencia, como una prueba de certificación de la equivalencia terapéutica para la intercambiabilidad del medicamento genérico con el innovador. De acuerdo a la normatividad vigente, todo producto que pretenda ser genérico intercambiable debe demostrar su calidad.

Por lo antes expuesto, es importante realizar estudios clínicos que estén sujetos a un protocolo de investigación, bajo los principios éticos y diseños experimentales adecuados, por la importancia de contar en el mercado con una alternativa de metotrexato a costo más accesible para la población que así lo requiera y que haya demostrado seguridad y eficacia a través de estudios clínicos.

6. HIPÓTESIS

H₀: El medicamento A (Referencia) y el medicamento B (Prueba) no son bioequivalentes.

H₁: El medicamento A (Referencia) y el medicamento B (Prueba) son bioequivalentes.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Determinar la biodisponibilidad de dos especialidades farmacéuticas de metotrexato, una de *referencia* (Medicamento A: Ledertrexate[®] de Wyeth, S.A. de C.V.) y otra de *prueba* (Medicamento B: metotrexato de Zurich Pharma, S.A. de C.V.), en sujetos sanos de sexo masculino, con la administración por vía oral, en condiciones de ayuno de una dosis de 2.5 mg (una tableta) de cada uno de los productos de estudio y establecer su bioequivalencia; como requisito para registro subsecuente como medicamento genérico por medio de las pruebas exigidas por la Normatividad Nacional (NOM-177-SSA1-2013).

7.2. Objetivos Particulares

- Determinar los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$, $ABC_{0\rightarrow t}$ y $ABC_{0\rightarrow\infty}$ del producto de referencia y el producto de prueba.
- Comparar estadísticamente los parámetros farmacocinéticos ($C_{m\acute{a}x}$ y ABC) del producto de referencia y el producto de prueba.

8. METODOLOGÍA

8.1. Etapa Clínica

8.1.1. Diseño Experimental y tipo de estudio

Se utilizó un diseño experimental, comparativo, dos periodos, dos secuencias, abierto, cruzado con bloques esquema A–B y B–A, aleatorio, longitudinal, comparativo, prospectivo y unicéntrico que se muestra en la figura 2, con un periodo de lavado de 7 días entre las 2 sesiones del estudio. Los grupos de tratamiento fueron balanceados, teniendo igual número de sujetos, los cuales fueron asignados en forma aleatoria a las secuencias de administración de medicamentos en estudio.

Es un estudio clínico Fase I de Biodisponibilidad, el diseño elegido fue el recomendado por la normatividad vigente y permitió controlar las variables confusoras: el estado de ayuno de 10 horas; la administración del tratamiento; volumen y tipo de líquido para la ingesta del medicamento; el horario, tipo y cantidad de alimentos; la ingesta de líquidos hasta antes del desayuno; actividad física restringida; posición en ortostatismo o sentados y acceso controlado a servicios sanitarios hasta que se alcanzó el tiempo indicado por la $t_{máx}$; exclusión de productos con cafeína y/o teofilinas, consumo concomitante de medicamentos, salvo prescripción médica por la presencia de eventos adversos.

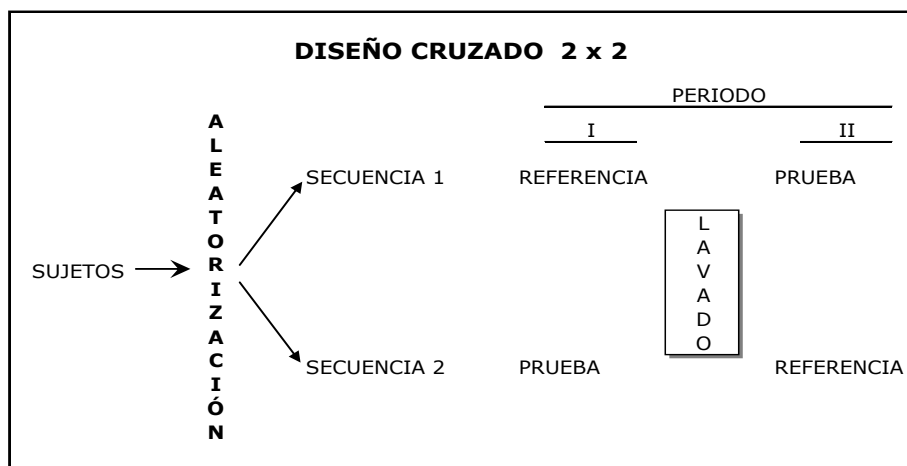


Figura 2. Diseño de estudio cruzado 2 X 2

8.1.2. Criterios de Inclusión

- ✚ Edad entre 18 y 55 años.
- ✚ Clínicamente sano.
- ✚ Firmar consentimiento voluntario de participación en el estudio (Anexo 3).
- ✚ Índice de masa corporal entre 18 y 27 Kg/m².
- ✚ Sin hallazgos anormales en la historia clínica.
- ✚ Signos vitales normales.
 - ✓ Frecuencia cardiaca entre 50 y 100 latidos por minuto
 - ✓ Frecuencia respiratoria entre 12 y 20 por minuto
 - ✓ Presión sistólica entre 80 y 129 mmHg
 - ✓ Presión diastólica entre 50 y 89 mmHg
 - ✓ Temperatura entre 36.0 y 37.0°C
- ✚ Electrocardiograma [ECG] normal o con variaciones sin relevancia clínica.
- ✚ Radiografía de tórax normal o con datos sin relevancia clínica fuera de campos pulmonares.
- ✚ Resultados de exámenes de laboratorio clínico dentro de los valores normales o con variaciones clínicamente no significativas en los siguientes:
 - ✓ Biometría Hemática Completa [BHC]: hematocrito y hemoglobina obligadamente por encima del límite inferior, el límite superior puede tener una variación de hasta un 15%. El resto de resultados incluyendo la fórmula blanca puede tener una variación de un $\pm 15\%$ si el sujeto está asintomático.
 - ✓ Pruebas de Función Hepática que incluyan: Bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, transaminasa glutámico Oxalacética, transaminasa glutámico pirúvica, proteínas totales, albúmina, globulina y relación albúmina/globulina. Bilirrubina total no mayor a 1.6 mg/dL, bilirrubina indirecta no mayor a 1.2 mg/dL ni bilirrubina directa mayor a 0.4 mg/dL. Las transaminasas y proteínas séricas pueden tener variaciones de hasta un 15% en el límite superior, el límite inferior no tiene restricciones para la inclusión de los sujetos. Valores superiores a dichas

cifras podrán considerarse sin significancia clínica solo si el resto de pruebas hepáticas son normales y no hay signos, síntomas o antecedentes personales de patología hepática.

- ✓ Química Sanguínea [QS] que incluya por lo menos: glucosa, urea, creatinina y ácido úrico. En sujetos asintomáticos sin antecedentes familiares de diabetes o insuficiencia renal se pueden incluir con un $\pm 15\%$ de variación en los valores.
- ✓ Ácido Fólico: dentro de rangos normales, el límite superior no tiene restricción para la inclusión de los sujetos.
- ✓ Perfil de Lípidos que incluya colesterol total y triglicéridos. En sujetos asintomáticos sin antecedentes familiares de dislipidemia, se pueden elegir con un 15% de variación en el límite superior. El límite inferior no tiene restricciones para la inclusión de sujetos.
- ✓ Examen general de orina [EGO]: en sujetos asintomáticos sin antecedentes de insuficiencia renal, se pueden elegir con variaciones dentro del $\pm 1\%$ en la densidad urinaria. El pH debe de estar entre 5 y 7. Puede incluirse con huellas de albúmina.
- ✓ Los sujetos que presenten algunos datos aislados que estén reportados como fuera de rango y que no estén relacionados entre sí, podrán ser incluidos en el estudio después de documentar que no tienen relación con signos y síntomas presentes al momento de la selección y que no tenga antecedentes personales de alguna enfermedad relacionada.
- ✚ Pruebas de bioseguridad con resultado negativo para detectar la presencia de virus de inmunodeficiencia humana [VIH], de Hepatitis B [VHB], de Hepatitis C [VHC] y prueba VDRL (Sífilis).
- ✚ Sujetos con resultado negativo en las pruebas de detección de drogas de abuso como: anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, metanfetaminas, morfina y tetrahidrocanabinoides.

8.1.3. Criterios de Exclusión

Los sujetos pudieron ser retirados del estudio, a consideración del investigador principal, por las siguientes razones:

- ✚ Si en opinión del investigador, la continuación en el estudio puede ser en detrimento de su salud.
- ✚ Presencia de signos y síntomas de hipotensión arterial que requieran tratamiento farmacológico.
- ✚ Síncope o choque.
- ✚ Reacción adversa severa.
- ✚ Evento adverso serio.
- ✚ Enfermedades o tratamientos concomitantes no permitidos en el protocolo.
- ✚ Indisciplina.
- ✚ Incumplimiento en la dieta.
- ✚ Pérdida de dos muestras dentro del periodo de absorción o alrededor de la $C_{máx}$.
- ✚ Si se presenta emesis y/o diarrea que se compruebe modifique la farmacocinética dentro del tiempo establecido por la $t_{máx}$.
- ✚ Los datos de los sujetos que presenten emesis y/o diarrea durante el transcurso del estudio de bioequivalencia deberán suprimirse del análisis estadístico si el vómito ocurre en o antes de dos veces el valor de la mediana de $t_{máx}$.
- ✚ Si alguno de los sujetos participantes durante el período de lavado llega a tomar bebidas alcohólicas, fumado tabaco, consumido bebidas o alimentos que contengan xantinas (café, té, cocoa, chocolate, mate, refrescos de cola, etc.), toronja, uva u otros frutos cítricos o consumido alimentos asados al carbón veinticuatro horas antes de ingresar a la fase de internamiento o ingerir drogas de las conocidas que puedan afectar los resultados del estudio.
- ✚ Sujetos con resultado positivo en las pruebas de detección de drogas de abuso como: anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, metanfetaminas, morfina y tetrahidrocanabinoides.

- ✚ Todos aquellos casos en que el investigador principal considere falta de apego al protocolo y que ponga en duda del resultado final.

8.1.4. Grupos de estudio

El estudio se diseñó solo para voluntarios hombres y sanos, se consideró la literatura internacional que hace referencia a estudios realizados en voluntarios sanos, donde las reacciones adversas presentadas no fueron severas y la frecuencia en relación al número total de sujetos por estudio fue baja, las mencionadas con base a la clasificación de la CIOMS son raras, muy raras o poco frecuentes. Los sujetos participantes en el estudio fueron sanos y la dosis que se administró fue baja en comparación con la dosis inicial que reciben los pacientes en tratamientos a largo plazo. La dosis recomendada para pacientes es semanalmente, el periodo de lavado en este estudio consideró una semana entre sesiones, esto con base a lo mencionado en la Información para prescribir (IPP, 2016): *“Los efectos tóxicos pueden estar relacionados en frecuencia y severidad con la dosis o la frecuencia de administración”*.

El estudio en sujetos sanos hombres fue para minimizar el riesgo teratogénico en las mujeres. El formato de consentimiento informado utilizado contiene de manera explícita los eventos adversos y la recomendación de evitar el embarazo en la pareja sexual durante un periodo de 3 meses posteriores a la última dosis.

8.1.5. Tamaño de la muestra

La NOM-177-SSA1-2013, establece que el tamaño de muestra para un estudio de bioequivalencia debe satisfacer el requerimiento en relación con una diferencia por detectar de $\pm 20\%$ respecto a la media del producto de referencia, asociado a un error de tipo I (α) de 0.05 y una potencia mínima de $(1-\beta)$ de 0.8 para este diseño.

Para ello se requiere conocer en valor del coeficiente de variación intrasujeto, el cual puede ser obtenido por información disponible en la literatura científica o proveniente de estudios pilotos o de bioequivalencia previamente realizados.

El tamaño de muestra para realizar este estudio de bioequivalencia se determinó empleando el reporte público número UK/H/5635/001/DC, en el cual se reportan resultados de un estudio de bioequivalencia con una dosis de 2.5 mg de metotrexato, del cual se calculó el CV intrasujeto del parámetro farmacocinético de $C_{m\acute{a}x}$.

Se empleó la ecuación de Chow & Wang para un diseño cruzado, con el valor de CV intrasujeto y una potencia de al menos 80% (Chow & Wang, 2001).

$$n \geq \left[t_{(\alpha, 2n-2)} + t_{(\beta, 2n-2)} \right]^2 \cdot \left(\frac{CV_{intra}}{\ln 0.8 - \ln \theta} \right)^2$$

A partir del IC al 90% del parámetro farmacocinético de $C_{m\acute{a}x}$ (0.9037 – 1.0499 con N =24) se determinó el CV intrasujeto de 15.21%, que sustituido en la ecuación anterior, proporcionó un tamaño de muestra 12 sujetos, se incluyeron 2 sujetos para evitar un desbalance la muestra por posibles abandonos de los sujetos, quedando el tamaño de muestra de 14 sujetos, de los cuales 7 tomaron el medicamento de prueba y 7 el medicamento de referencia, en cada periodo.

El CV intrasujeto de $C_{m\acute{a}x}$ se eligió porque presenta más variabilidad que el obtenido para ABC_{0-inf} de la misma referencia (0.9497 – 1.0282 con N =24) de 8.02%.

8.1.6. Aspectos éticos y/o legales

Este estudio cumplió con lo estipulado en los reglamentos actuales de investigación clínica incluyendo: las Guías de la *Buena Práctica Clínica* (GCP's), los principios éticos para investigaciones médicas en seres humanos de la *Declaración de Helsinki* emitidos por la 64ª Asamblea General de la *Asociación Médica Mundial*, Fortaleza, Brasil, octubre 2013, la *Ley General de Salud* y el *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*, así como las *Pautas Éticas Internacionales para la investigación biomédica en seres humanos*, preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2002.

De acuerdo a lo establecido en el *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*, en el Título Segundo, Capítulo I, Artículo 17, Fracción III y publicado en el *Diario Oficial* el 02 de Abril de 2014, este estudio se consideró como una investigación con riesgo mayor al mínimo.

8.1.7. Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación

Antes del inicio del estudio se obtuvo la aprobación por escrito del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación, quienes proporcionaron una lista de los miembros que los conforman, a solicitud del patrocinador del estudio o del investigador principal. Además del protocolo se autorizaron el Consentimiento Informado, el Compromiso de no embarazo y el Formato de Reporte de Caso. El protocolo o los documentos anexos no sufrieron modificaciones durante el estudio.

8.1.8. Aprobación por autoridades regulatorias

Este estudio se llevó a cabo bajo las disposiciones que determina la regulación establecida en la NOM-177-SSA1-2013 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y los requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas. Esto implica que el protocolo y los demás documentos anexos fueron aprobados por la autoridad regulatoria (COFEPRIS), además el estudio debe de registrarse en la plataforma electrónica del Registro Nacional de Ensayos Clínicos (RENEC) para su seguimiento.

8.1.9. Formato de consentimiento informado

El investigador principal o la persona designada, informó al sujeto de todos los aspectos pertinentes a la participación de éste en el estudio. El proceso para la obtención del consentimiento informado del sujeto fue de acuerdo con todos los requerimientos regulatorios aplicables. La persona que obtuvo el consentimiento, los testigos y el sujeto firmaron y colocaron la fecha en el *Formato de Consentimiento Informado* antes de que se realizara cualquier procedimiento del estudio. La decisión respecto a la participación del sujeto en el estudio, fue totalmente voluntaria. El investigador principal o la persona que obtuvo el consentimiento enfatizaron al sujeto que su consentimiento en relación a

la participación en el estudio, puede ser retirado en cualquier momento sin ninguna penalización o pérdida de los beneficios que de cualquier otra forma el sujeto posee.

8.1.10. Confidencialidad, responsabilidad, compensación e indemnización

La información recabada en este estudio fue intercambiada exclusivamente entre Zurich Pharma, S.A. de C.V., Bioanalit Laboratorios S.A. de C.V. y la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C. y será tratada de manera confidencial.

Los sujetos firmaron su formato de consentimiento informado, donde especifica que recibieron una compensación económica por su participación en el estudio. El patrocinador conforme a lineamientos regulatorios estuvo de acuerdo en pagar el tratamiento o indemnización que hubiese resultado de lesiones o enfermedades causadas por la participación del sujeto en el estudio hasta su resolución de acuerdo al criterio médico, lo cual no se presentó durante el estudio.

La *Secretaría de Salud*, el *Comité de Ética en Investigación* y el *Comité de Investigación* fueron los únicos organismos autorizados para revisar la documentación del estudio, (que incluye los datos de identidad de los sujetos participantes) y los documentos considerados confidenciales por la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C., Bioanalit Laboratorios, S.A de C.V. y Zurich Pharma, S.A. de C.V.

Los datos personales de los sujetos que participaron en el estudio son confidenciales y están protegidos por la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de Particulares, lo cual se encuentra señalado en nuestro AVISO DE PRIVACIDAD y se puede consultar en www.cecype.com.

8.2. Etapa analítica

La unidad analítica responsable desarrolló el protocolo analítico para la validación del método empleado en la cuantificación de la concentración de metotrexato en las muestras biológicas. Para el análisis de las muestras biológicas se utilizó un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría

de Masas (LC MS-MS), validado para cuantificar metotrexato en plasma humano en un rango de concentración de 1.00 a 160.00 ng/mL, el cual se estableció de acuerdo con los valores de $C_{m\acute{a}x}$ reportados en la literatura para la dosis empleada, por tal razón el límite superior de cuantificación se estableció de 160.00 ng/mL. El metotrexato y abacavir (estándar interno) fueron extraídos del plasma con metanol HPLC.

La relación entre la respuesta cromatográfica y concentración adicionada en la curva de calibración, fue ajustada a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación $1/x$. Donde la variable “y” es la respuesta analítica de la relación de áreas (metotrexato/abacavir) y “x” es la concentración nominal correspondiente de metotrexato.

El método utilizado fue validado de acuerdo a los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que debe incluir como mínimo para realizar pruebas de biodisponibilidad y bioequivalencia: selectividad, efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas, efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas, límite inferior de cuantificación, curva de calibración, precisión (repetibilidad, reproducibilidad), exactitud, a través de la evaluación de muestras control, estabilidad de la muestra, estabilidad a corto plazo, estabilidad a largo plazo, estabilidad de la muestra procesada, estabilidad del automuestreador, estabilidad ciclos de congelación-descongelación y estabilidad en solución.

8.3. Etapa Farmacocinética y Estadística

8.3.1. Análisis Farmacocinético

La unidad analítica responsable realizó los cálculos farmacocinéticos y estadísticos en apego a la NOM-177-SSA1-2013. Todos los cálculos se realizaron empleando las concentraciones a los tiempos de muestreo obtenidas dentro del laboratorio en el análisis de las muestras biológicas. Se consideraron las muestras de al menos 14 sujetos que cumplieron con los criterios previamente establecidos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron obtenidos ajustando los datos a un modelo no compartimental. La estimación de la concentración en muestras perdidas se obtuvo por interpolación cuando así se requirió. Todos los cálculos fueron realizados con el paquete estadístico Phoenix™ WinNonlin® versión vigente.

8.3.1.1. Área bajo la curva (ABC)

El área bajo la curva desde la administración hasta el último tiempo de muestreo “ t ” ($ABC_{0 \rightarrow t}$) se determinó por el método de los trapezoides.

El área bajo la curva desde el último tiempo de muestreo “ t ” hasta infinito ($ABC_{t \rightarrow \infty}$) se calculó dividiendo la concentración obtenida en el último tiempo de muestreo “ t ” y la constante de eliminación.

El área bajo la curva desde el tiempo de administración hasta infinito ($ABC_{0 \rightarrow \infty}$) se calculó sumando el $ABC_{0 \rightarrow t}$ y $ABC_{t \rightarrow \infty}$.

8.3.1.2. Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$)

La $C_{m\acute{a}x}$ se obtuvo como la concentración más alta observada dentro del intervalo de muestreo.

8.3.1.3. Tiempo al cual se observa la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$)

Se reportó como el tiempo al cual se observa la concentración máxima.

8.3.1.4. Constante de eliminación (k_e)

Se determinó como la pendiente a partir de la regresión logaritmo-lineal de la fase terminal de la gráfica de logaritmo de la concentración respecto al tiempo.

8.3.1.5. Vida media de eliminación ($t_{1/2}$)

La vida media de eliminación se determinó a partir del cociente del logaritmo natural de 2 y la k_e , mediante la siguiente ecuación.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e}$$

8.3.2. Análisis Estadístico

Todos los datos de los sujetos participantes fueron analizados e incluidos en el análisis estadístico, el cual consideró las muestras de 14 sujetos que cumplieron con los siguientes criterios establecidos:

- + Voluntarios aleatorizados.
- + A los que se administró el medicamento de estudio en ambos periodos.
- + Que hayan concluido el estudio.
- + Ningún voluntario se reemplazó del análisis estadístico.

Se podrán excluir voluntarios cuando:

- + Presenten concentraciones pre-dosis del fármaco en plasma. Si la concentración predosis es menor o igual al 5% del valor de $C_{máx}$ en un sujeto de investigación, se pueden incluir los datos del sujeto de investigación sin ningún ajuste en todas las mediciones y los cálculos farmacocinéticos. En los casos en que el valor de la concentración predosis sea mayor al 5% de la $C_{máx}$ se debe eliminar al sujeto de investigación de todas las evaluaciones del estudio (NOM-177-SSA1-2013).
- + El sujeto de investigación presente vómito o diarrea. Los datos de los sujetos de investigación que experimenten vómito o diarrea durante el transcurso del estudio podrán eliminarse del análisis estadístico si el vómito o diarrea ocurren antes de 2 veces la mediana del $t_{máx}$ en un periodo dado (NOM-177-SSA1-2013).
- + Presenten falta de concentraciones medibles o con concentraciones plasmáticas muy bajas para el medicamento de referencia. Se considerará que un sujeto de investigación tiene concentraciones muy bajas si el ABC es menor al 5% de la media geométrica el ABC del medicamento de referencia (debe ser calculada sin inclusión de los datos del sujeto de investigación con valores extremos) (NOM-177-SSA1-2013).

8.3.2.1. Análisis de Varianza

Se realizó un análisis de varianza a los parámetros farmacocinéticos de ABC y $C_{\text{máx}}$ transformados a escala logarítmica natural (Ln), evaluando las siguientes fuentes de variación:

- ✚ Secuencia de administración.
- ✚ Sujeto anidado en la secuencia de administración, denominada variabilidad inter-sujeto o residual inter-sujeto.
- ✚ Periodo de administración.
- ✚ Formulación.
- ✚ Error experimental, denominado variabilidad intra-sujeto o residual intra-sujeto.

El modelo estadístico empleado, aplicado a diseños cruzados de Bioequivalencia, es el siguiente expresado de forma lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + P_j + F_{(j,k)} + e_{ijk}$$

Y

$$S_{ik} = \text{Secuencia}_k + \text{Sujeto}(\text{Secuencia})_{i(k)},$$

Dónde:

Y_{ijk} = Es la respuesta del parámetro farmacocinético en el i-ésimo sujeto, j-ésimo periodo de la k-ésima secuencia, donde i (voluntario) = 1, 2, ..., n_k , j (periodo) = 1, 2 y k (secuencia) = AB, BA (usualmente A = medicamento de referencia y B = medicamento de prueba).

μ = Media del parámetro farmacocinético.

S_{ik} = Efecto aleatorio del i-ésimo sujeto en la k-ésima secuencia

P_j = Efecto fijo del j-ésimo periodo

$F_{(j,k)}$ = Efecto fijo de la formulación en el j-ésimo periodo en la k-ésima secuencia.

e_{ijk} = Error aleatorio de la observación Y_{ijk}

Las inferencias estadísticas de los efectos son evaluadas bajo los siguientes supuestos:

- 1.- $\{S_{ik}\}$ son normales independientes e idénticamente distribuidas con media 0 y varianza σ^2_s
- 2.- $\{e_{ijk}\}$ son normales independientes e idénticamente distribuidas con media 0 y varianza σ^2_e
- 3.- $\{S_{ik}\}$ y $\{e_{ijk}\}$ son mutuamente independientes.

Con la transformación logarítmica de los parámetros farmacocinéticos, el modelo lineal del diseño cruzado se evalúa como un modelo multiplicativo donde los supuestos estadísticos no se modifican.

El efecto de secuencia se evaluó usando la media de cuadrados del sujeto anidado en la secuencia como término de error. Todos los demás efectos se evaluarán contra el error residual (media de cuadrados del error).

En el informe final se reportó la tabla de ANADEV, donde se indicaron los valores de F para las fuentes de variación respectivas. Además, se indicó si la fuente de variación es significativa o no y se consideró un error tipo I (α) de 0.05.

Todos los datos de los sujetos participantes fueron analizados e incluidos en el análisis estadístico, los cuales cumplieron con los criterios previamente establecidos.

8.3.2.2. Hipótesis de la prueba

Se realizó la prueba t doble unilateral (Prueba de Schuirmann) con los datos obtenidos de la transformación logarítmica Ln de ABC y $C_{m\acute{a}x}$, mediante la evaluación del siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_{01}: \mu_P - \mu_R \leq \theta_1$$

$$H_{11}: \mu_P - \mu_R > \theta_1$$

Y

$$H_{02}: \mu_P - \mu_R \geq \theta_2$$

$$H_{12}: \mu_P - \mu_R < \theta_2$$

Bajo el supuesto estadístico de normalidad, los dos conjuntos de pruebas de hipótesis unilaterales se evalúan con dos pruebas t-unilaterales comunes. Así, se concluirá que μ_P y μ_R son equivalentes si:

$$\bar{Y}_1 = \frac{(\bar{Y}_P - \bar{Y}_R) - \theta_1}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \geq t_{(\alpha, n_1 + n_2 - 2)}$$

Y

$$\bar{Y}_2 = \frac{(\bar{Y}_P - \bar{Y}_R) - \theta_2}{\hat{\sigma}_d \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \geq -t_{(\alpha, n_1 + n_2 - 2)}$$

Dónde:

\bar{Y}_P = Estimador de μ_P

\bar{Y}_R = Estimador de μ_R

$\hat{\sigma}_d$ = raíz cuadrada del cuadrado medio del error del análisis de varianza

θ_1 = límite inferior de bioequivalencia, usualmente toma el valor de 0.8

θ_2 = límite superior de bioequivalencia, usualmente toma el valor de 1.25

$t_{(\alpha, n_1 + n_2 - 2)}$

= valor de distribución t de Student en la cola superior con probabilidad α y $n_1 + n_2 - 2$

Criterio de aceptación: La prueba t-doble unilateral de Schuirmann concluye a favor de la Bioequivalencia cuando el valor de $p < 0.05$ en las dos pruebas de hipótesis para los parámetros farmacocinéticos ABC_{0-t} y $C_{m\acute{a}x}$.

8.3.2.3. Intervalo de confianza clásico

Para determinar bioequivalencia se construyó el intervalo de confianza clásico al 90% para la diferencia entre los promedios de los medicamentos de prueba y de referencia. El intervalo de confianza clásico al 90% será calculado por medio de las siguientes ecuaciones:

$$IC_{Li\ 90\%} = (Y_P - Y_R) - \left[t_{(\alpha, n_1+n_2-2)} \times \sigma \times \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \right]$$

$$IC_{Ls\ 90\%} = (Y_P - Y_R) + \left[t_{(\alpha, n_1+n_2-2)} \times \sigma \times \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)} \right]$$

Dónde:

$IC_{Li\ 90\%}$ = Límite inferior del intervalo de confianza clásico al 90%

$IC_{Ls\ 90\%}$ = Límite superior del intervalo de confianza clásico al 90%

Y_P = Media del parámetro farmacocinético evaluado del medicamento de prueba

Y_R = Media del parámetro farmacocinético evaluado del medicamento de referencia

σ = Raíz cuadrada de la media de cuadrados del error del parámetro farmacocinético evaluado

$t_{(\alpha, n_1+n_2-2)}$ = Distribución t de Student con probabilidad α de 0.05 y $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

n_1 = Número de voluntarios en la secuencia 1

n_2 = Número de voluntarios en la secuencia 2

Los límites clásicos expresados como porcentajes a partir de datos transformados mediante el logaritmo natural son:

$$\%IC_{Li\ 90\%} = (e^{IC_{Li\ 90\%}}) \times 100$$

$$\%IC_{Ls\ 90\%} = (e^{IC_{Ls\ 90\%}}) \times 100$$

Criterio de aceptación: El intervalo de confianza clásico concluye a favor de la bioequivalencia si los límites calculados para los parámetros farmacocinéticos ABC_{0-t} y $C_{m\acute{a}x}$ están totalmente contenidos en el intervalo 80.00 – 125.00%.

8.4. Materiales

8.4.1. Etapa clínica

1. Medicamento de Prueba, Metotrexato de Zurich Pharma, S.A. de C.V.
2. Medicamento de referencia, Ledertrexate[®] de Wyeth, S.A. de C.V.
3. Tubos para muestra sanguínea con heparina de sodio 10 mL, BD Vacutainer[®].
4. Tubos para muestra sanguínea serología de 6 mL, BD Vacutainer[®].
5. Tubos para muestra sanguínea con EDTA 4 mL, BD Vacutainer[®].
6. Aguja para extracción de sangre, Precision Glide[™], BD Vacutainer[®].
7. Camisa porta agujas para extracción de sangre, Vacutainer[®] Brand
8. Torundas con alcohol
9. Catéter para terapia intravenosa 0.9 x 25 mm, BD Insyte[®]
10. Adaptador para múltiples muestras, BD PRN[®]
11. Jeringa estéril de plástico 3 mL, BD Plastipak[®]
12. Guantes látex, Ambiderm[®]
13. Torniquete
14. Alcohólimetro, Lifeloc[®] FC20
15. Kit de diagnóstico serológico de anticuerpos para *treponema pallidum*, Intec[®]
16. Prueba serológica para Hepatitis C, Instant-View[®]
17. Prueba serológica para HIV 1/2, Genie[™] BioRAD[®]
18. Prueba serológica para HBsAg, Instant-View[®]
19. Prueba en orina multi-drogas de abuso, Instant-View[®]
20. Balanza con estadímetro, Nuevo Leon[®]
21. Contenedor para RPBI 8.5 Lts. Grupo Ixion[®]
22. Contenedor para RPBI 1.8 Lts. Grupo Ixion[®]

23. Electrocardiógrafo Cardiotouch 3000, Bionet[®]
24. Esfigmomanómetro de mercurio, Riester[®]
25. Vaso para muestra clínica, GVS Medical[®]
26. Pipeta Pasteur desechable, sarstedt[®]
27. Criotubos contenedores
28. Centrífuga universal 320 r hettich zentrifugen[®]
29. - refrigerador tor-rey[®] r-16
30. - balanza ohaus[®]
31. - ultracongelador sanyo-vip series[®]
32. - deshumidificador westpointe[®]

8.4.2. Etapa analítica

1. Detector de masas (LC MS-MS) modelo G6460A, Agilent Technologies[®].
2. Software Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis Versión B.04.01
3. Metanol HPLC.
4. Columna C18
5. Ácido fórmico al 0.2%
6. Abacavir (estándar interno)
7. Ultracongelador a $-40 \pm 5^{\circ}\text{C}$, ThermoElectron Co.(Revco)
8. Ultracongelador a $-70 \pm 5^{\circ}\text{C}$, ThermoElectron Co.(Revco)
9. Balanza analítica Mettler Toledo[®]
10. Centrífuga Eppendorf[®]
11. Ultrasonido, Branson[®]
12. Sistema de filtración Millipore[®]
13. Sistema de purificación de agua, Millipore[®]
14. Campana extractora Wold[®]

15. Multi vortex analógico VWR[®]
16. Micropipeta 10 – 100 μ L y 100 – 1000 μ L, Eppendorf[®]
17. Repetidora de volumen manual HandyStep[®] Brand

8.4.3. Etapa estadística

1. Paquete estadístico Phoenix[™] WinNonlin[®] versión vigente.

9. RESULTADOS

9.1. Etapa clínica

Un total de 22 sujetos firmaron el formato de consentimiento informado, 20 cumplieron con los criterios de inclusión y ninguno de exclusión y de estos se seleccionaron 14 sujetos para participar en el estudio, los cuales dieron negativo a todas las pruebas realizadas, por lo que se consideraron aptos para incluirse en el estudio. Se determinó que todos los sujetos eran sanos basándose en los resultados de un examen físico detallado, electrocardiograma de 12 derivaciones, pruebas clínicas de laboratorio (hematología, química sanguínea y Uroanálisis), las tablas 2 y 3 muestran resultados fuera de rangos normales, los cuales fueron considerados sin relevancia clínica y no influyeron en la selección de los sujetos, las pruebas serológicas para determinación de HIV, hepatitis B y C, sífilis (VDRL) fueron negativas al igual que la determinación de drogas de abuso en orina, signos vitales normales durante la selección, ninguno de los sujetos participo en otro estudio clínico dentro de los 90 días previos al inicio del estudio y todos los sujetos seleccionados terminaron el estudio.

Tabla 2. Resultados de variaciones permitidas en el electrocardiograma de los sujetos incluidos

CASO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
02	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
03	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
04	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
05	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
06	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
08	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
09	Bradicardia sinusoidal e hipertrofia ventricular derecha	Sin relevancia clínica, sin datos de bajo gasto, el electrocardiograma no muestra ondas T invertidas profundas que pudiesen indicar una hipertrofia patológica. Exploración física normal.
10	Bradicardia sinusal, desviación eje correcta, hipertrofia ventricular derecha probable	Sin relevancia clínica ya que el sujeto no presenta datos de bajo gasto, asintomático, a la exploración física sin datos patológicos, el electrocardiograma sin ondas T profundas e invertidas que indiquen hipertrofia derecha patológica.
12	Bradicardia sinusoidal	Sin relevancia clínica, sujeto sin datos de bajo gasto, exploración física normal.
13	Bloqueo de bifurcación de paquete derecho incompleto	Sin relevancia clínica variación normal, sujeto sin presencia de arritmias a la exploración o ruidos cardiacos agregados, sin datos de bajo gasto cardiaco.

Tabla 3. Resultados de variaciones permitidas en el Laboratorio clínico de los sujetos incluidos

CASO	RESULTADOS
01	Examen general de orina con huellas de albúmina, hemoglobina libre ++, eritrocitos 8 por campo, cilindros hialinos +.
02	Examen general de orina con muy pequeño número de bacterias, mucina ++,
03	Ácido úrico 8.7 mg/dL. Examen general de orina con huellas de hemoglobina, 2 eritrocitos por campo.
04	Examen general de orina con oxalato de calcio +.
05	Examen general de orina con huellas de albúmina.
08	Examen general de orina con pH 8.0 y sales amorfas precipitadas ++.
11	Monocitos 11%, Triglicéridos 217 mg/dL, Bilirrubina total 1.9 mg/dL y bilirrubina conjugada 0.8 mg/dL.
12	Colesterol 234 mg/dL.
13	Monocitos 12% y vacuolización de monocitos +, Bilirrubina total 1.8 mg/dL y bilirrubina conjugada 0.7 mg/dL.
14	Triglicéridos 201 mg/dL, Examen general de orina con aspecto turbio y sales amorfas precipitadas +.

Los resultados demográficos (tabla 4) muestran que las edades fluctuaron entre 19 y 46 años de edad (promedio 27.29 años), peso entre 60 y 86.5 Kg (promedio 72.01 Kg), talla entre 1.53 y 1.83 m (promedio 1.69 m) y el índice de masa corporal entre 19.80 y 26.90 Kg/m² (promedio 25.09 Kg/m²), los datos de los sujetos seleccionados para el estudio se encontraron dentro de los parámetros establecidos en la normatividad mexicana para los estudios de bioequivalencia en humanos.

Tabla 4. Datos demográficos de los sujetos incluidos en el estudio de Metotrexato

Sujeto	Género	Edad (años)	Talla (m)	Peso (kg)	IMC (kg/m ²)
1	Masculino	25	1.73	80.50	26.90
2	Masculino	23	1.65	66.20	24.30
3	Masculino	29	1.80	86.50	26.70
4	Masculino	21	1.83	77.50	23.10
5	Masculino	33	1.56	65.30	26.80
6	Masculino	23	1.74	60.00	19.80
7	Masculino	28	1.70	75.00	26.00
8	Masculino	24	1.53	60.70	25.90
9	Masculino	31	1.68	75.50	26.80
10	Masculino	46	1.67	66.20	23.70
11	Masculino	34	1.74	73.00	24.10
12	Masculino	22	1.65	63.80	23.40
13	Masculino	19	1.71	78.80	26.90
14	Masculino	24	1.72	79.20	26.80
N		14	14	14	14
Media		27.29	1.69	72.01	25.09
Desviación Estándar		7.04	0.08	8.25	2.11
Error Estándar		1.88	0.02	2.20	0.56
Mínimo		19.00	1.53	60.00	19.80
Mediana		24.50	1.71	74.00	25.95
Máximo		46.00	1.83	86.50	26.90
CV%		25.81	4.79	11.45	8.40

Durante cada periodo del estudio los sujetos fueron internados alrededor de las 16:00 horas el día previo a la administración del medicamento, se realizó una revisión médica, determinación de drogas de abuso y prueba de alcohol en aliento, además de la verificación de los criterios de inclusión y exclusión, se proporcionó una cena, para después iniciar el ayuno nocturno a las 22:00 horas.

Al día siguiente, los sujetos fueron despertados a las 06:00 horas para su aseo personal, ingesta de 250 mL de agua, registro de signos vitales y la instalación de un catéter en una vena adecuada en el antebrazo. A las 08:00 horas se le administró el medicamento de prueba o referencia en forma aleatoria, con 250 mL de agua.

Las muestras de sangre (10 mL) fueron recolectadas en tubos con heparina sódica como anticoagulante en los tiempos 0.000 (pre-tratamiento, control) y 0.250, 0.500, 0.667,

0.833, 1.000, 1.250, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 4.000, 6.000, 8.000, 12.000, 16.000 y 24.000 horas después del tratamiento. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 x g por 15 minutos a 4°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) y el plasma resultante fue congelado a -40°C hasta su análisis.

Todos los sujetos permanecieron en ayuno durante 4 horas después de la administración del medicamento, después consumieron un desayuno, la comida y la cena se realizaron a las 8 y 11 horas posteriores a la administración del medicamento, las dietas que se proporcionaron a los sujetos, fueron iguales en cantidad y contenido a la administrada en el periodo previo. El agua estuvo permitida *ad libitum* salvo el periodo comprendido entre una hora antes de la administración de la dosis y el primer alimento.

La presión arterial sistólica y diastólica, pulso y temperatura fueron registrados antes de la administración del medicamento y durante el turno matutino, vespertino, nocturno y antes del egreso de los sujetos.

Los medicamentos que se administraron fueron: metotrexato (Ledertrexate[®]) tabletas de 2.5 mg (Producido por Excella GmbH, Alemania y distribuido por Wyeth, S.A. de C.V., Lote No. B031, caducidad Mayo 2017) y metotrexato tabletas de 2.5 mg (Zurich Pharma, S.A. de C.V., Lote No. LED-DU1502, caducidad Abril 2017).

Los sujetos fueron monitoreados cuidadosamente con respecto a la presencia de eventos adversos. Los eventos adversos se establecieron en términos de su seriedad, severidad y relación con el medicamento de estudio. El reporte de eventos adversos, se realizó a partir de la firma del *Formato de Consentimiento Informado* y hasta un periodo equivalente a siete vidas medias posteriores a la última toma del medicamento en estudio.

La formulación fue bien tolerada a la dosis administrada y no se observaron o notificaron reacciones adversas significativas, un total de dos eventos adversos fueron reportados durante el estudio, uno de ellos fue considerado probablemente relacionado con el medicamento de estudio (cefalea) y el otro evento adverso fue odontalgia, se consideró no relacionado al medicamento de estudio y se presentó durante el periodo de lavado.

9.2. Etapa analítica

Condiciones cromatográficas: Se usó una C18, flujo 0.20 mL/min, volumen de inyección 5 µL y fase móvil, una mezcla de ácido fórmico al 0.2% / metanol HPLC. Tiempo de retención para metotrexato 1.7 min y abacavir (estándar interno) 1.8 min.

Condiciones del espectrofotómetro de masas: Se aplicó ionización electrospray ion positivo, monitoreo de reacción múltiple (MRM); las transiciones monitoreadas fueron 455.2 -> 308.1 para metotrexato y 287.1 -> 191.1 para abacavir (estándar interno).

En la tabla 5 se muestran los resultados de la validación del método analítico, los cuales se encontraron dentro de las especificaciones requeridas, se demostró que el modelo es lineal ya que el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (r) se encuentran cercanos a 1.00 (Riu & Boqué, 2003) y el límite superior de cuantificación se estableció en 160.00 ng/mL, es selectivo a metotrexato en presencia de otros fármacos que pudieran estar presentes en plasma y al anticoagulante utilizado en este estudio, el efecto en la matriz biológica del analito y el estándar interno fue adecuado, ya que el coeficiente de variación (CV%) del factor de matriz normalizado calculado para las 6 fuentes de matriz biológica fue de 11.14%, dentro del criterio de aceptación. Además el método indica que el recobro del analito a partir de la matriz biológica es eficiente y esto nos indica la cantidad real del fármaco que se está analizando, con un porcentaje de recuperación para metotrexato de 105.83%, 103.60% y 110.20% para los tres controles. Se realizaron 4 corridas analíticas, el tiempo que permanecieron las muestras en congelación a $-70^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, desde el primer día de la toma de muestra hasta el último día de análisis fue de 21 días, por ello la estabilidad a largo plazo evaluada a 39 días cubrió el periodo de almacenamiento de las muestras biológicas, todos los niveles de concentración cumplieron con los criterios de precisión y exactitud ($\text{CV}\% \leq 15$ y la exactitud entre 85-115%) y para el nivel de concentración más bajo de la curva de calibración, límite de cuantificación ($\text{CV}\% \leq 20\%$ y la exactitud entre 80-120%), el límite inferior de cuantificación de metotrexato de determinó en 1.00 ng/mL, con una precisión de 105.37% para la repetibilidad y 99.62% para la reproducibilidad, la precisión intra-día para metotrexato mostró un coeficiente de variación de 2.85%, 2.06% y 1.34% para los

controles bajo, medio y alto respectivamente, mientras que la precisión inter-día presentó un coeficiente de variación de 4.09%, 3.11% y 2.91% para las mismas concentraciones.

Tabla 5. Resumen de la validación del método analítico para cuantificar metotrexato

LINEALIDAD			
MODELO: Modelo lineal, con ponderación 1/x R ² > 0.98 r > 0.99		RANGO DE CONCENTRACIÓN: 1.00 A 160.00 ng/mL	
SELECTIVIDAD			
El método es selectivo a metotrexato, Paracetamol, Ibuprofeno, Naproxeno, Heparina y EDTA			
FACTOR MATRIZ NORMALIZADO (Criterio de aceptación, el CV% no debe ser mayor al 15%)			
MUESTRA	FUENTE	RESULTADO	
Control Bajo y Control Alto	Seis fuentes de la matriz biológica (plasma humano). Mezcla de las 6 fuentes Plasma lipémico y Hemolizado	Promedio= 1.29 D.E. = 0.1432 CV% = 11.14	
RECOBRO			
MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/mL	% RECOBRO	
Control Bajo	3.00	105.83	
Control Medio	70.00	103.60	
Control Alto	125.00	110.20	
	Promedio	106.54	
	D.E.	3.36	
	CV%	3.15	
PRECISIÓN, REPETIBILIDAD (Criterio de aceptación CV% menor al 15%, % Exactitud 100 ± 15% y para el límite inferior de cuantificación CV% menor al 20%, % Exactitud 100 ± 20%)			
MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/mL	CV%	%Exactitud
Límite Inferior de Cuantificación	1.00	4.82	105.31
Control Bajo	3.00	2.85	95.43
Control Medio	70.00	2.06	97.25
Control Alto	125.00	1.34	100.34
Control Diluido (1:2)	250.00	2.73	93.03
Control Diluido (1:4)	250.00	1.67	98.23
PRECISIÓN, REPRODUCIBILIDAD (Criterio de aceptación CV% menor al 15%, % Exactitud 100 ± 15% y para el límite inferior de cuantificación CV% menor al 20%, % Exactitud 100 ± 20%)			
MUESTRA	CONCENTRACIÓN ng/mL	CV%	%Exactitud
Límite Inferior de Cuantificación	1.00	8.02	99.62
Control Bajo	3.00	4.09	91.57
Control Medio	70.00	3.11	98.15
Control Alto	125.00	2.91	98.58
ESTABILIDAD DE METOTREXATO			
Temperatura Ambiente	24 horas a 25°C ± 5°C		
Inyector Automático	24 horas a 10°C ± 2°C		
Ciclos congelación – descongelación	3 ciclos (- 70° C / 25° C)		
Estabilidad muestra procesada	72 horas a - 40°C		
Estabilidad a largo plazo	39 días a - 70°C ± 10°C		
Estabilidad de las soluciones stock de metotrexato y abacavir	45 días a - 40°C ± 10°C		

Los cromatogramas representativos de la selectividad del método analítico (Figuras 3 – 14), comprobaron que el método fue capaz de evaluar en forma inequívoca al metotrexato en presencia de los componentes que se pudieran estar presentes en la matriz biológica, tales como impurezas, productos de degradación, anticoagulantes y componentes de la matriz.

Blanco de Reactivos.

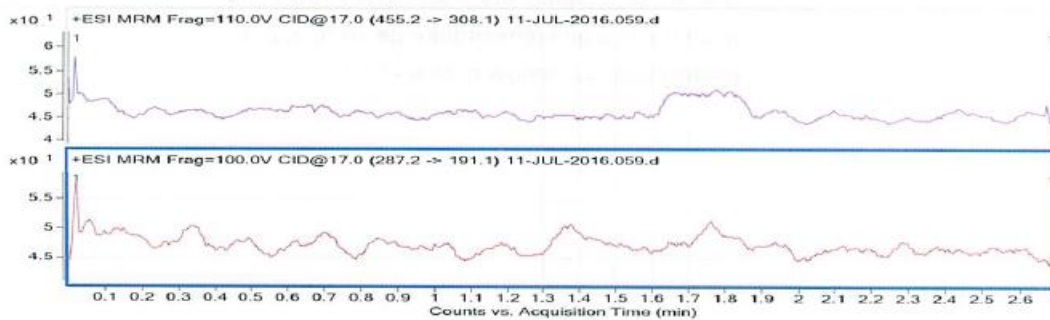


Figura 3. Blanco de reactivos

Mezcla de plasma de diferentes fuentes pre dosis FBM-11072016 (Blanco de plasma).

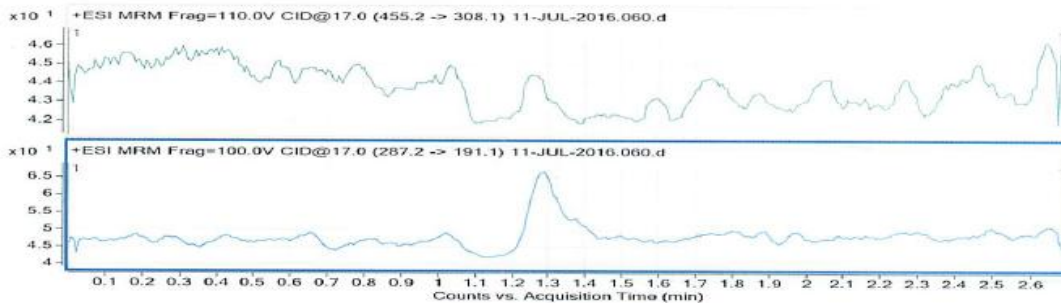


Figura 4. Mezcla de plasma de diferentes fuentes

Blanco de Plasma Lipémico (FBL-08072016).

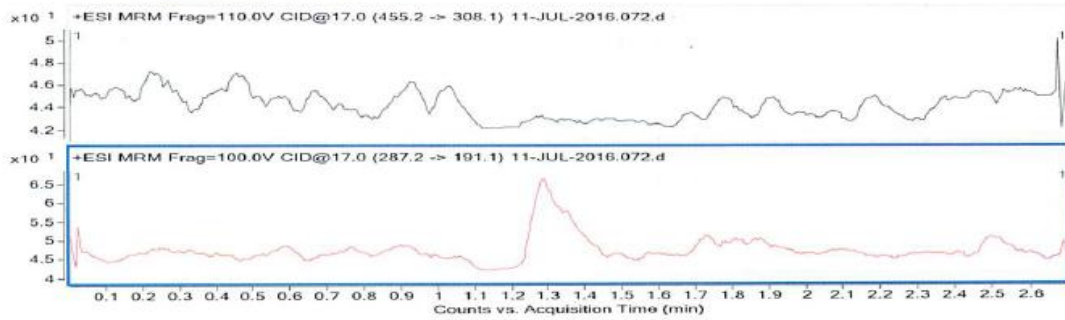


Figura 5. Blanco de plasma lipémico

Blanco de Plasma Hemolizado (FBH-08072016).

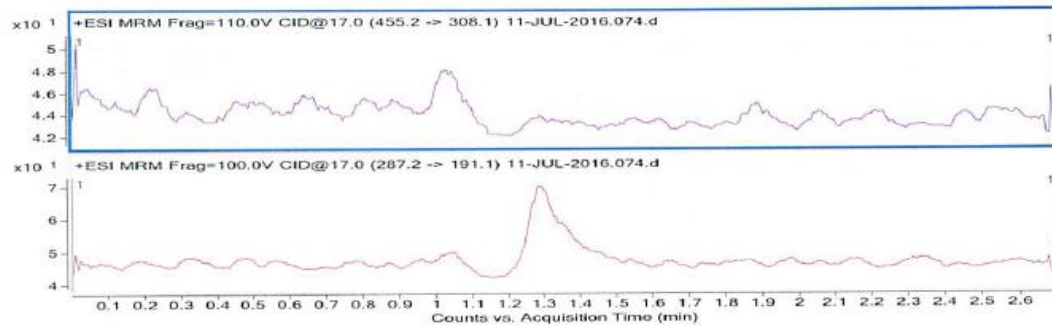


Figura 6. Blanco de Plasma Hemolizado

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Metotrexato

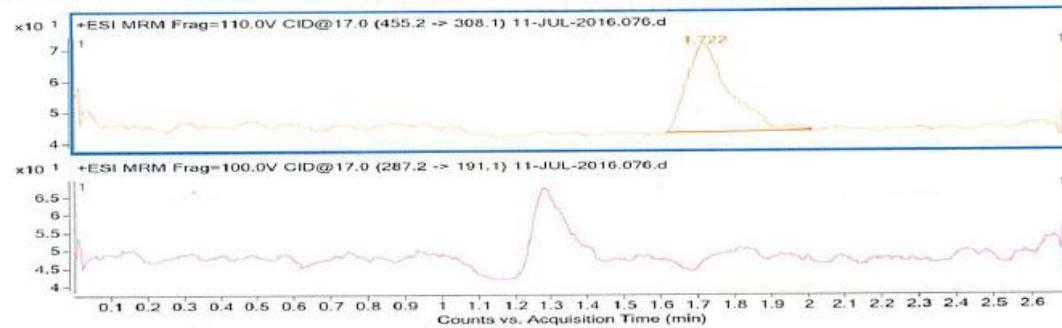


Figura 7. Mezcla de plasmas + metotrexato

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Abacavir (Estándar interno).

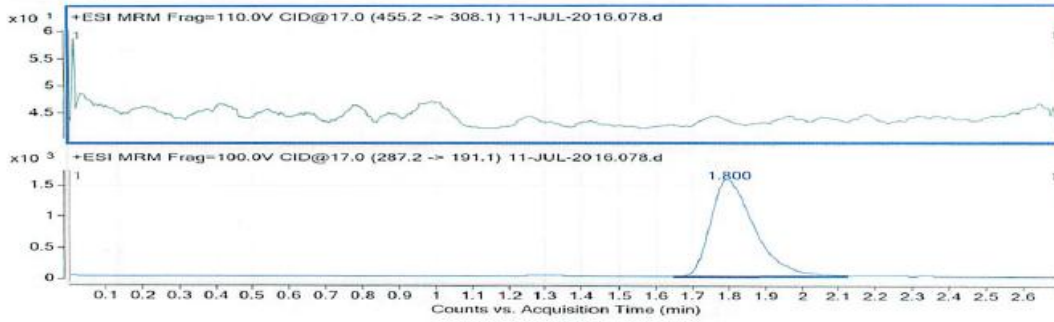


Figura 8. Mezcla de plasmas + estándar interno

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Metotrexato + Abacavir (Estándar interno).

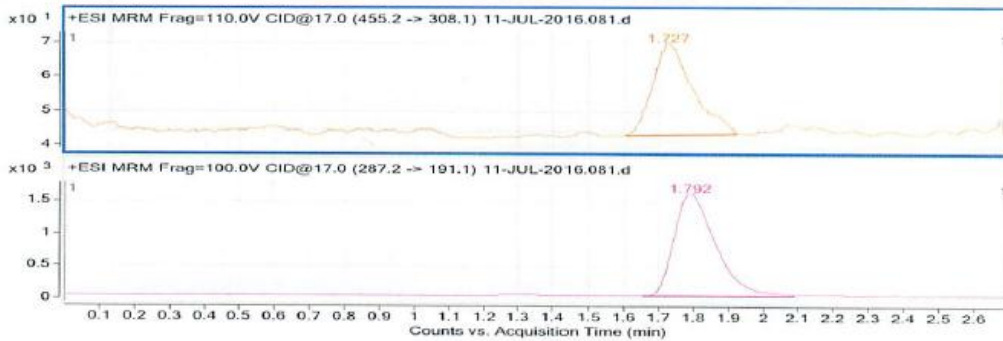


Figura 9. Mezcla de plasmas + metotrexato + estándar interno

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + EDTA.

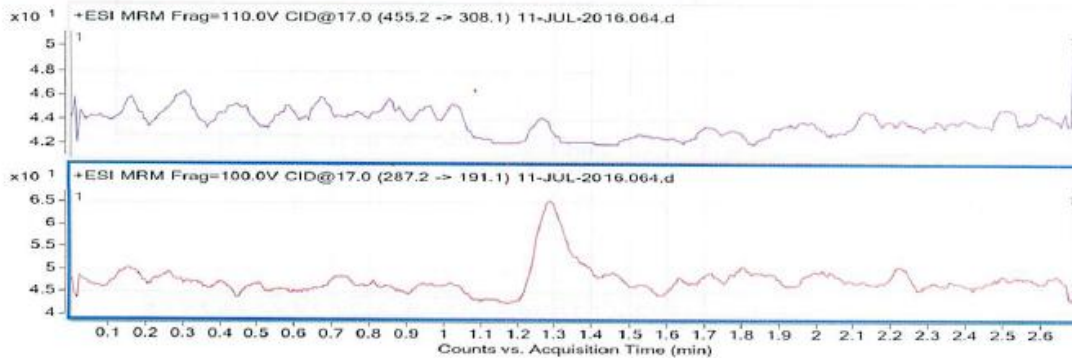


Figura 10. Mezcla de plasmas + Anticoagulante (EDTA)

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Heparina.

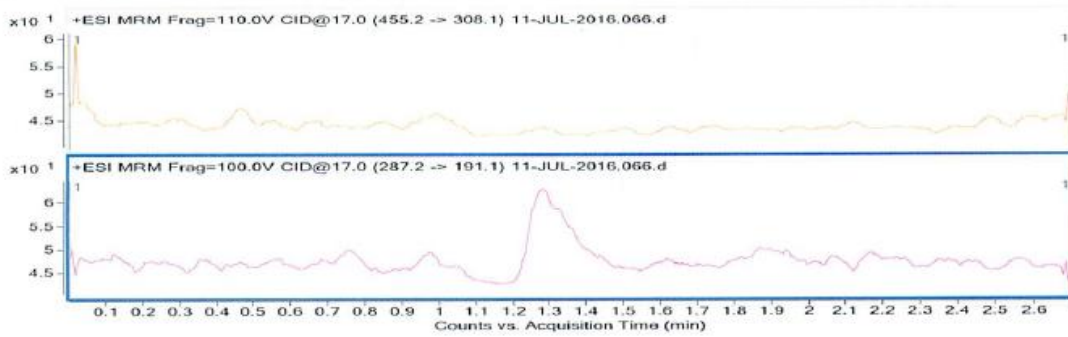


Figura 11. Mezcla de plasmas + anticoagulante (Heparina)

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-1510215 + Paracetamol.

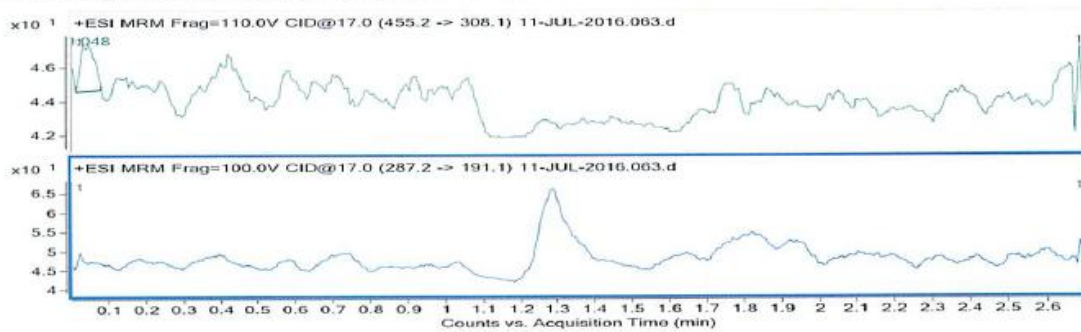


Figura 12. Mezcla de plasmas + fármaco (analgésico)

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Ibuprofeno.

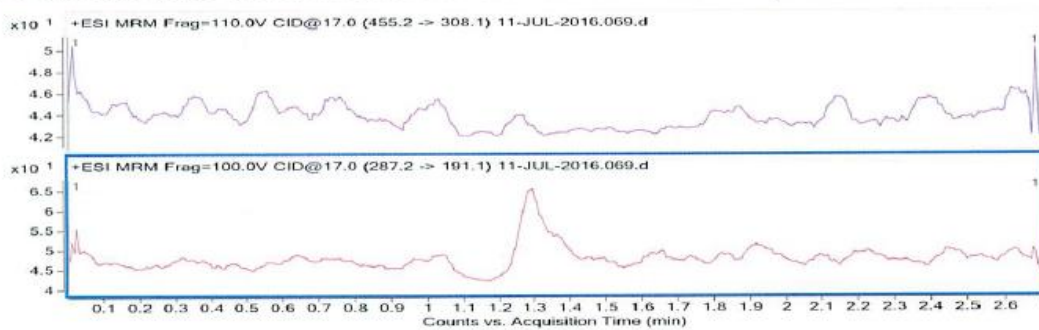


Figura 13. Mezcla de plasmas + fármaco (AINEs)

Mezcla de plasma de diferentes fuentes BCO PL FBM-11072016 + Naproxeno.

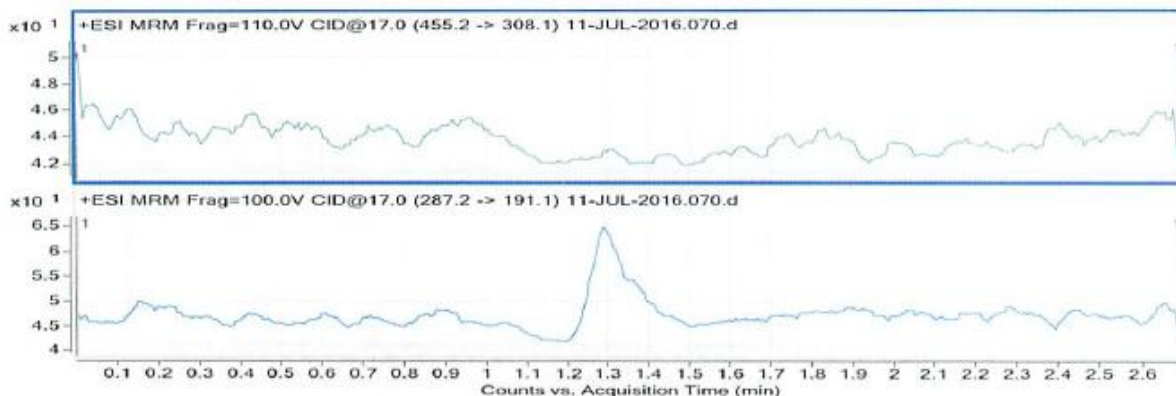


Figura 14. Mezcla de plasmas + fármaco (AINEs)

La figura 15 muestra la recta de calibrado para metotrexato, con 8 puntos experimentales junto con sus residuales para cada punto experimental. Con esto se estableció los límites de cuantificación para metotrexato de 1.00 a 1.60 ng/mL.

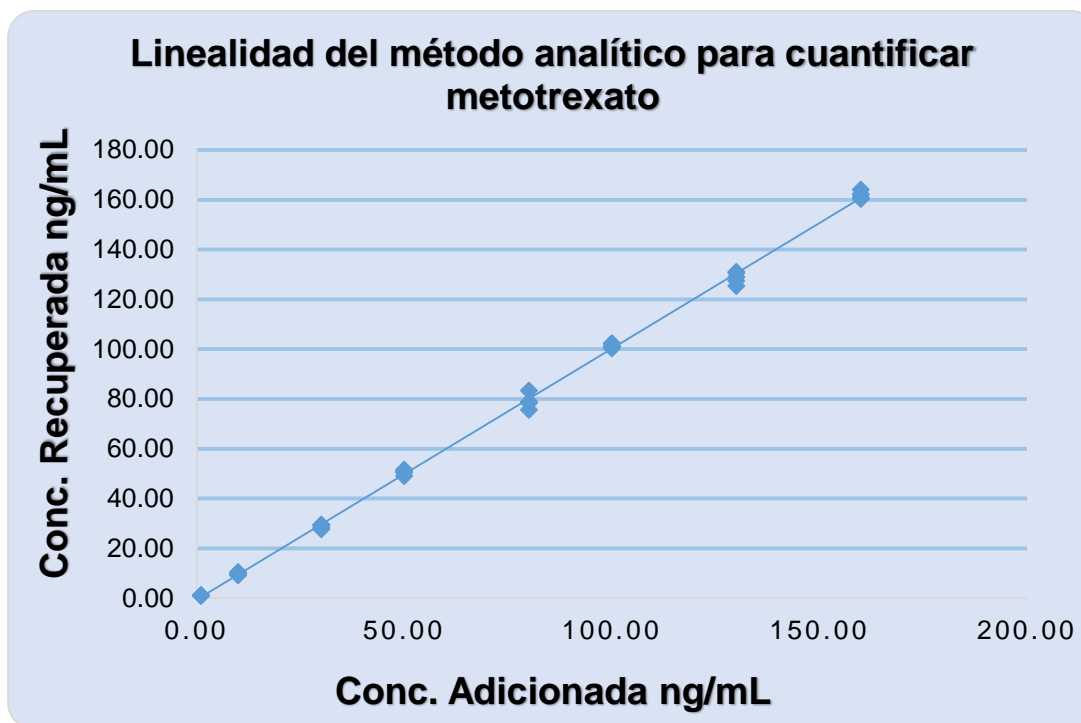


Figura 15. Calibración analítica para cuantificar metotrexato

Por los resultados obtenidos, el método analítico es selectivo, lineal, preciso y exacto, ya que los datos obtenidos cumplen con los criterios de aceptación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, por lo tanto, el método fue utilizado para cuantificar metotrexato en plasma humano para el estudio de Bioequivalencia.

La tabla 6 muestra las concentraciones plasmáticas de metotrexato con respecto al tiempo de muestreo de ambas formulaciones. Las concentraciones plasmáticas promedio de las muestras pre dosis fueron de “cero” para cada período, por ello se consideró que no existe cantidad remanente del fármaco (efecto residual) proveniente de la dosis administrada entre cada periodo y por lo tanto la fase de lavado fue adecuada.

Tabla 6. Concentraciones Plasmáticas de metotrexato tabletas de 2.5 mg (n=14)

FORMULA	TIEMPO (horas)	Conc. ng/mL	DS ng/mL	Min. ng/mL	Mediana ng/mL	Máx. ng/mL	CV%
A=Referencia-Ledertrexate®	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
A=Referencia-Ledertrexate®	0.25	17.55	13.27	2.75	13.64	41.32	75.64
A=Referencia-Ledertrexate®	0.50	49.69	37.58	2.08	43.98	131.43	75.62
A=Referencia-Ledertrexate®	0.67	63.35	37.43	8.21	64.21	118.45	59.10
A=Referencia-Ledertrexate®	0.83	66.59	37.53	11.06	67.91	115.01	56.36
A=Referencia-Ledertrexate®	1.00	65.58	31.56	16.45	77.26	100.46	48.13
A=Referencia-Ledertrexate®	1.25	63.00	24.37	14.89	66.68	105.38	38.68
A=Referencia-Ledertrexate®	1.50	57.97	19.43	13.02	61.28	80.73	33.52
A=Referencia-Ledertrexate®	2.00	47.85	17.99	10.77	47.46	82.46	37.60
A=Referencia-Ledertrexate®	2.50	40.61	15.04	9.13	39.30	70.21	37.05
A=Referencia-Ledertrexate®	3.00	32.64	10.92	8.91	30.71	53.68	33.46
A=Referencia-Ledertrexate®	4.00	25.63	11.52	6.99	23.40	49.81	44.96
A=Referencia-Ledertrexate®	6.00	12.00	5.57	3.15	10.58	25.01	46.41
A=Referencia-Ledertrexate®	8.00	6.54	2.83	2.27	6.03	13.57	43.25
A=Referencia-Ledertrexate®	12.00	2.14	0.73	1.07	1.98	3.27	34.13
A=Referencia-Ledertrexate®	16.00	1.10	0.10	1.00	1.12	1.19	8.72
A=Referencia-Ledertrexate®	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B=Prueba-metotrexato	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
B=Prueba-metotrexato	0.25	12.46	12.51	1.28	9.22	51.93	100.40
B=Prueba-metotrexato	0.50	51.76	19.67	19.02	57.04	91.83	38.00
B=Prueba-metotrexato	0.67	64.34	30.01	2.14	68.92	115.90	46.65
B=Prueba-metotrexato	0.83	69.51	31.25	2.26	77.87	108.67	44.96
B=Prueba-metotrexato	1.00	71.80	32.52	2.68	86.02	110.37	45.29
B=Prueba-metotrexato	1.25	65.45	27.88	9.44	72.79	97.83	42.60
B=Prueba-metotrexato	1.50	55.01	21.54	8.13	60.48	84.39	39.16
B=Prueba-metotrexato	2.00	44.82	16.53	9.50	49.93	66.82	36.89
B=Prueba-metotrexato	2.50	37.06	11.74	11.83	36.59	53.18	31.68
B=Prueba-metotrexato	3.00	34.26	15.13	11.70	32.51	74.22	44.17
B=Prueba-metotrexato	4.00	24.51	7.62	12.12	23.17	42.53	31.07
B=Prueba-metotrexato	6.00	13.15	7.56	5.68	11.21	36.80	57.48
B=Prueba-metotrexato	8.00	7.35	5.30	2.17	5.98	24.32	72.10
B=Prueba-metotrexato	12.00	2.82	1.93	1.24	2.43	7.87	68.25
B=Prueba-metotrexato	16.00	1.65	0.72	1.14	1.33	2.48	43.74
B=Prueba-metotrexato	24.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

DS= desviación estándar

La tabla 7 muestra los parámetros farmacocinéticos obtenidos para cada sujeto, tanto del medicamento de prueba como del medicamento de referencia.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos para cada sujeto de investigación

Sujeto	Tratamiento	t_{\max} (h)	C_{\max} (ng/mL)	ABC _{0-t} (h*ng/mL)	ABC _{0-∞} (h*ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)
1	B=Prueba-Metotrexato	3.00	74.22	230.98	235.96	2.59
1	A=Referencia-Ledertrexate®	0.83	115.01	246.69	250.89	2.91
2	B=Prueba-Metotrexato	1.00	70.71	151.46	156.61	1.65
2	A=Referencia-Ledertrexate®	2.00	78.91	240.14	245.43	2.17
3	A=Referencia-Ledertrexate®	0.50	25.18	70.57	76.54	3.88
3	B=Prueba-Metotrexato	1.00	43.89	190.34	203.65	3.25
4	A=Referencia-Ledertrexate®	0.67	117.96	274.22	278.84	2.85
4	B=Prueba-Metotrexato	1.00	101.08	271.01	276.39	3.27
5	B=Prueba-Metotrexato	1.25	93.73	288.90	298.47	2.49
5	A=Referencia-Ledertrexate®	0.83	101.85	252.27	257.52	2.15
6	A=Referencia-Ledertrexate®	1.25	105.38	258.69	262.22	2.03
6	B=Prueba-Metotrexato	1.00	110.37	265.39	269.27	2.17
7	A=Referencia-Ledertrexate®	4.00	49.81	233.90	241.72	2.11
7	B=Prueba-Metotrexato	1.25	81.16	240.36	248.63	2.62
8	B=Prueba-Metotrexato	1.00	89.10	200.51	216.01	2.09
8	A=Referencia-Ledertrexate®	1.00	100.08	235.06	241.06	2.37
9	B=Prueba-Metotrexato	0.67	115.90	242.23	247.07	2.36
9	A=Referencia-Ledertrexate®	0.50	131.43	274.31	285.18	2.97
10	B=Prueba-Metotrexato	1.00	62.41	290.10	302.53	2.56
10	A=Referencia-Ledertrexate®	2.00	82.46	307.86	317.49	2.17
11	A=Referencia-Ledertrexate®	1.00	94.50	257.90	262.88	2.17
11	B=Prueba-Metotrexato	1.00	92.26	283.30	287.75	1.97
12	A=Referencia-Ledertrexate®	1.25	69.37	323.09	326.93	2.24
12	B=Prueba-Metotrexato	6.00	36.80	277.42	286.10	2.43
13	B=Prueba-Metotrexato	0.83	92.94	269.37	272.76	1.79
13	A=Referencia-Ledertrexate®	0.67	64.09	152.71	161.10	1.85
14	A=Referencia-Ledertrexate®	1.00	91.60	270.59	276.83	2.19
14	B=Prueba-Metotrexato	1.00	86.91	238.42	243.49	2.17

En las figuras 16 y 17 se presentan las concentraciones plasmáticas promedio de metotrexato vs tiempo con datos sin transformar y transformados logarítmicamente. La concentración plasmática del fármaco del producto de prueba **metotrexato** y la obtenida con el producto de referencia **Ledertrexate®** son semejantes durante todo el perfil de concentración vs tiempo. Se aprecia que los errores estándar de ambos productos se sobrepone en la mayoría de los tiempos de muestreo, lo que pone de manifiesto cierta

similitud de las concentraciones alcanzadas entre el producto de prueba y el producto de referencia.

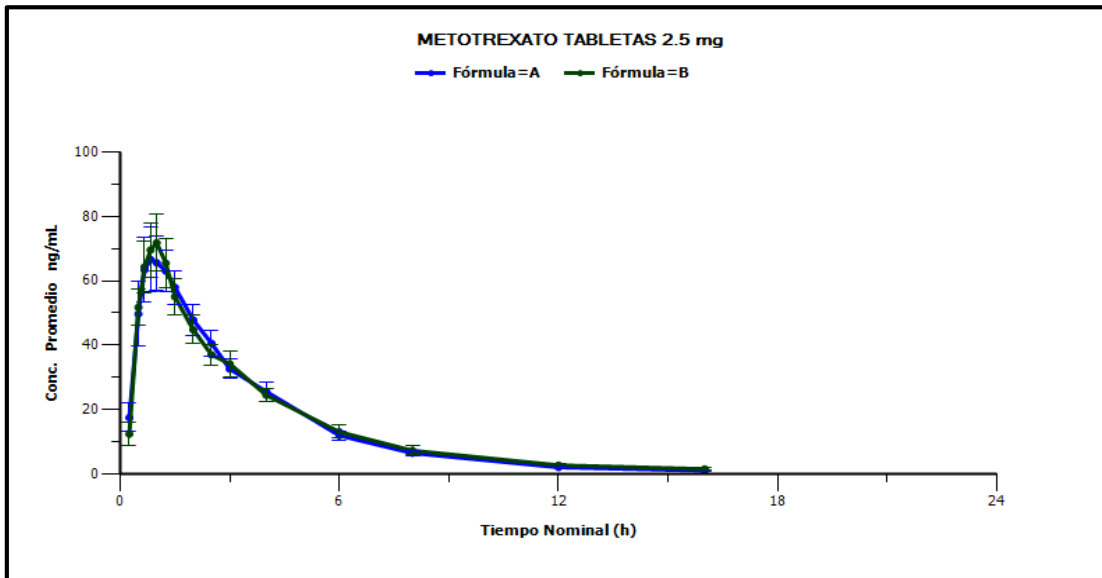


Figura 16. Perfil farmacocinético promedio de metotrexato en escala normal (dosis 2.5 mg). A=Referencia, Ledertrexate®, B = Prueba, metotrexato

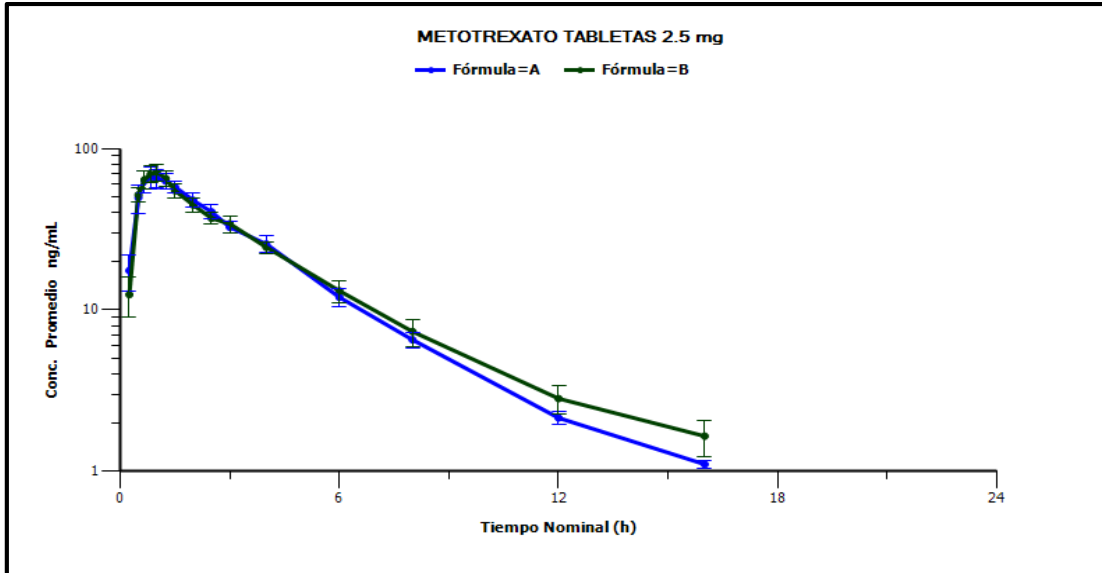


Figura 17. Perfil farmacocinético promedio de metotrexato en escala semilogarítmica (dosis 2.5 mg). A=Referencia, Ledertrexate®, B = Prueba, metotrexato

9.3. Etapa estadística

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de modelos no compartimentales (modelo independiente), que se muestran en la tabla 6. Al comparar la estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos se corrobora lo observado en el análisis gráfico (figuras 16 y 17), que la cantidad y velocidad de absorción del principio activo de ambas formulaciones son semejantes. La tabla 9 muestra el análisis estadístico se realizó con 14 sujetos de investigación ya que todos concluyeron el estudio. Se aprecia que tanto para la velocidad y magnitud de la cantidad de fármaco absorbido ($C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} , $ABC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ y K_e) se registran valores que tienden a la semejanza en ambos productos.

Tabla 8. Resultados de los parámetros farmacocinéticos del medicamento de prueba y de referencia (n=14)

VARIABLE	FORMULA	Media Aritmética	DS	Min.	Mediana	Max.	CV%.	Media Geométrica
T_{máx} (h)	A=Referencia-Ledertrexate®	1.25	0.92	0.50	1.00	4.00	73.68	1.05
T_{máx} (h)	B=Prueba-metotrexato	1.50	1.41	0.67	1.00	6.00	93.85	1.22
C_{máx} (ng/mL)	A=Referencia-Ledertrexate®	87.69	28.61	25.18	93.05	131.43	32.63	81.81
C_{máx} (ng/mL)	B=Prueba-metotrexato	82.25	22.91	36.80	88.01	115.90	27.85	78.63
ABC_{0-t} (h*ng/mL)	A=Referencia-Ledertrexate®	242.71	63.21	70.57	255.09	323.09	26.04	230.51
ABC_{0-t} (h*ng/mL)	B=Prueba-metotrexato	245.70	41.27	151.46	253.81	290.10	16.80	242.02
ABC_{0-∞} (h*ng/mL)	A=Referencia-Ledertrexate®	248.90	63.11	76.54	259.87	326.93	25.36	237.29
ABC_{0-∞} (h*ng/mL)	B=Prueba-metotrexato	253.19	40.72	156.61	258.95	302.53	16.08	249.73
T_{1/2} (h)	A=Referencia-Ledertrexate®	2.43	0.54	1.85	2.18	3.88	22.11	2.39
T_{1/2} (h)	B=Prueba-metotrexato	2.39	0.47	1.65	2.39	3.27	19.87	2.34
Ke (1/h)	A=Referencia-Ledertrexate®	0.30	0.05	0.18	0.32	0.37	17.79	0.29
Ke (1/h)	B=Prueba-metotrexato	0.30	0.06	0.21	0.29	0.42	19.68	0.30

DS= desviación estándar ES= error estándar

Los histogramas correspondientes a los parámetros farmacocinéticos estudiados presentaron en general cierta tendencia central cercana al 0 para la diferencia y logaritmo del cociente y cercana a 1 para el cociente entre el medicamento de prueba y de referencia; lo anterior da cierto indicio de similitud entre los tratamientos evaluados (figura 18).

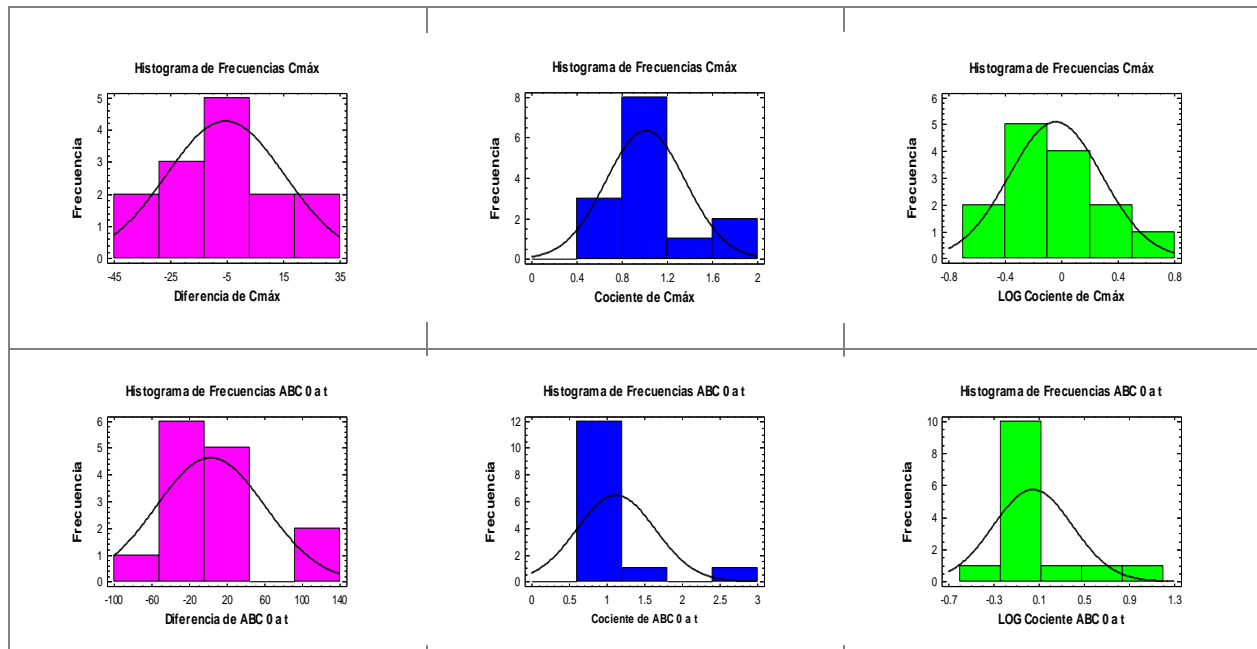


Figura 18. Histogramas de Frecuencia de la diferencia, cociente y logaritmo del cociente para los parámetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} de metotrexato.

9.3.1. Análisis de Varianza (ANADEVA)

La tabla 10 muestra el análisis de varianza para evaluar los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} , que aplicado para la evaluación de las fuentes de variación en el presente estudio de bioequivalencia cruzado 2x2, detectó que no existen efectos significativos ($p > 0.05$) en el período, ni en la secuencia, ni en la formulación con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ para los dos parámetros farmacocinéticos ($C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t}).

En cuanto al efecto de la secuencia anidada en el sujeto se observó que existe un efecto significativo en el parámetro de $C_{m\acute{a}x}$; esto no es de importancia debido a que sólo indica que cada sujeto es diferente.

Tabla 9. Análisis de Varianza para evaluar los parámetros $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t}

ANADEVA						
PARÁMETRO	FUENTE DE VARIACIÓN	g.l.	SS	MS	F	p
Ln $C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL)	SEC	1	0.2896	0.2896	1.2355	0.2881
	SEC*SUJETO	12	2.8123	0.2344	4.1965	0.0096
	FORMULACIÓN	1	0.0110	0.0110	0.1968	0.6652
	PERIODO	1	0.0361	0.0361	0.6458	0.4372
	Error	12	0.6702	0.0558		
Ln ABC_{0-t} (ng * h/mL)	SEC	1	0.0002	0.0002	0.0012	0.9731
	SEC*SUJETO	12	1.5496	0.1291	2.0271	0.1177
	FORMULACIÓN	1	0.0166	0.0166	0.2606	0.6189
	PERIODO	1	0.0368	0.0368	0.5771	0.4621
	Error	12	0.7645	0.0637		

g.l.= Grados de Libertad SS= Suma de Cuadrados del Error MS= Cuadrados Medios del Error F= F de Fisher p= p-value

Con los resultados del análisis de varianza, se estimó la variación inter e intrasujeto de los parámetros farmacocinéticos probados en población mexicana, mismos que se muestran en la tabla 11.

Tabla 10. CV% inter e intrasujeto obtenidos en población mexicana del estudio de bioequivalencia de Metotrexato vs. Ledertrexate®.

Parámetro	Ln ($C_{m\acute{a}x}$)	Ln (ABC_{0-t})
Var(SEC*SUJETO)	0.0893	0.0327
Var(Residual)	0.0558	0.0637
Intersujeto CV	0.3056	0.1824
Intrasujeto CV	0.2397	0.2565
% C.V.	23.97	25.65

Los resultados de la comparación de intervalos de confianza, así como de la prueba doble unilateral de Shuirmann, se muestran en la tabla 12, en la cual se observa como los parámetros evaluados cumplen con el criterio del 80 % - 125 % con datos transformados logarítmicamente para los intervalos de confianza clásicos; En cuanto a la prueba de

Schuirmann, los resultados mostraron una alta probabilidad de que los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} se encuentren dentro del intervalo planteado.

Con base en lo anterior, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los productos evaluados.

Tabla 11. Resultados de las pruebas estadísticas aplicadas a los parámetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} (nivel de confianza del 90%)

PARÁMETRO	Intervalo de confianza		“T” doble unilateral		Potencia
	Clásico		Schuirmann		
	IC 90 inf.	IC 90 sup.	p<80 %	p>125 %	p
Ln ($C_{m\acute{a}x}$)	81.9700	112.7013	0.0312	0.0062	0.7565
Ln (ABC_{0-t})	88.5748	124.4497	0.0073	0.0462	0.7066
Criterio	> 80	< 125	< 0.05	< 0.05	N.A,

10. DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que las dos formulaciones de metotrexato son bioequivalentes, la evidencia es que la estimación de los intervalos de confianza al 90% para $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t} se encuentran en rango de bioequivalencia de 80 a 125. (Tabla 12), que es utilizado por COFEPRIS y agencias internacionales, para aprobar la formulación genérica (NOM-177-SSA1-2013), dando como resultado los perfiles de concentración-tiempo superponibles entre las formulaciones de referencia y de prueba de metotrexato.

Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ y ABC determinados en el presente estudio fueron consistentes con los presentados en el Reporte Público para metotrexato (Regulating Medicines and Medical Devices, 2014), El fármaco en ese estudio fue igual al utilizado en el presente estudio.

El metotrexato se absorbió rápidamente después de una sola administración oral. En este estudio, el tiempo hasta la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$) varió entre 0.33 y 2.64 horas, lo que concuerda con lo que se ha informado previamente (Regulating Medicines and Medical Devices, 2014) (Kozloski, 1992). En pacientes pediátricos leucémicos metotrexato también parece ser dependiente de la dosis y se ha informado gran variabilidad (23-95%) (Vademécun, 2014), no comparable con los resultados obtenidos en el presente estudio en sujetos sanos, con una variabilidad intrasujeto alrededor del 25% que no es considerado como de alta variabilidad, Se ha reportado una diferencia de 20 veces entre los niveles pico superior e inferior y también se ha observado variabilidad interindividual en $t_{m\acute{a}x}$ (0.67 a 4 horas) luego de una dosis de 15 mg/m² (IPP, 2016). Del mismo modo, la vida media de la metotrexato fue ~ 3 horas (tabla 9), lo que coincide totalmente con los valores informados previamente de 3 a 4 horas después de una dosis oral (Approval Letter, 1997) (Regulating Medicines and Medical Devices, 2014). Por lo tanto, una semana fue suficiente y apropiada como lavado como se empleó en el presente estudio.

Los datos basados en el CV intrasujeto obtenido de la literatura ($C_{m\acute{a}x}$ 15.21 % y ABC_{0-inf} 8.02%) revelaron que un tamaño de muestra de 14 sujetos fue suficiente para los propósitos de este estudio, ya que se cumplió con el criterio establecido del intervalo de

confianza del 80-125%, más no así el de la potencia superior al 0.8, se estableció que los productos son bioequivalentes, ya que con esto se demuestra que no existe una diferencia mayor al $\pm 20\%$ entre los productos; anteponiendo la protección a los pacientes, sobre la protección al fabricante (Hoenig, 2001).

Como con cualquier ensayo clínico, el estudio actual tenía limitaciones que deberían considerarse. Este fue un estudio abierto, por lo que podría no abordar objetivamente los perfiles de eficacia y seguridad de las formulaciones probadas. Debido a que los datos solo se obtuvieron de sujetos sanos a los que se les administró una dosis única, la característica farmacocinética del metotrexato podría diferir en las poblaciones objetivo. Debido a los datos limitados, no podemos predecir la respuesta del medicamento en ningún momento después de dosis alternativas y / o intervalo de administración con el conjunto de datos presente.

El evento adverso de cefalea presentado por uno de los sujetos en el estudio fue considerado probablemente relacionado con el medicamento de estudio, ya que se encuentra reportado en la bibliografía con poca frecuencia.

Los resultados de este estudio, obtenidos de una muestra de voluntarios mexicanos sanos, podrían servir como referencia para futuros estudios controlados de metotrexato en la población hispana.

11. CONCLUSIONES

La caracterización de la biodisponibilidad a través de la determinación de los parámetros farmacocinéticos $C_{m\acute{a}x}$ y el área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo ABC_{0-t} , permitieron la comparación entre productos en términos de velocidad y grado de absorción respectivamente.

Los resultados de este estudio demostraron que no existe una diferencia estadística significativa en las pruebas aplicadas sobre los parámetros farmacocinéticos estudiados ($C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{0-t}), esto implica que la velocidad y el grado de absorción del producto de prueba es equivalente al que presenta el producto de referencia, de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013.

Ambas formulaciones fueron bien toleradas por todos los sujetos, no hubo ningún evento adverso inesperado. Ninguno de los cambios en los signos vitales durante el estudio se consideraron clínicamente importantes.

Por ello, se concluyó que metotrexato tabletas de 2.5 mg fabricado por Zurich Pharma, S.A. de C.V. y Ledertrexate® tabletas de 2.5 mg, fabricado por Excella GmbH (Alemania), acondicionado por Wyeth, S. A. de C.V., distribuido por Pfizer, S.A. de C.V., son medicamentos bioequivalentes.

12. PERSPECTIVAS

El estudio realizado servirá como referencia para futuros ensayos clínicos, ya que se muestra el comportamiento farmacocinético de metotrexato en población mexicana. Además de mostrar una metodología clínica y analítica robusta apegada a las Buenas Prácticas Clínicas y la Normatividad aplicable en territorio nacional e internacional.

El estudio de Bioequivalencia demuestra que los lotes comparados de referencia y de prueba son Bioequivalentes, pero no garantiza que los lotes de producción subsecuentes del producto de prueba mantengan sus estándares de calidad, esto es tarea de la verificación por COFEPRIS de los procesos subsecuentes y los resultados de uso en la clínica mediante estudios de Farmacovigilancia.

La disponibilidad de un producto genérico bioequivalente en el mercado facilita el cumplimiento de políticas en salud de disponibilidad de productos de calidad y bajo costo, en provecho de la economía de las instituciones de salud, y del paciente, así como la seguridad del producto.

13. REFERENCIAS

- ✚ Approval Letter. (November de 1997). Application Number 40-233. *Center for Drug Evaluation and Research*, 26-36.
- ✚ Chládek, J. (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis. *British journal of clinical pharmacology*, 54, 147-156.
- ✚ Chow, S.-C., & Wang, H. (2001). On Sample Size Calculation in Bioequivalence Trials. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 28(2), 155-169.
- ✚ Danafar, H., & Hamidi, M. (2016). Pharmacokinetics and Bioequivalence of methotrexate in Human Plasma Studied by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 11(2), 1-12. doi:10.17795/jjnpp-36758
- ✚ Escobar, L. (2016). Monitorización Terapéutica de Fármacos y Aspectos Prácticos de Farmacocinética. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(5), 605-614.
- ✚ Guinzberg, A. L. (Sep-Oct de 2011). Las Alternativas Farmacéuticas. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(5), 46-49.
- ✚ Han Wan, S. (1974). Effect of Route of Administration and Effusions on Methotrexate Pharmacokinetics. *Cancer Research*, 34, 3487-3491.
- ✚ Herring, C. (2016). Biostatistics. En L. Shargel, & A. B. Yu, *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics* (págs. 68-69). USA: McGraw-Hill.
- ✚ Hoenig, J. (2001). The Abuse of Power: The Pervasive Fallacy of Power Calculations in Data Analysis. *The American Statistician*, 55, 19-24.IPP. (2016).
- ✚ *Medicamentos PLM*. Recuperado el 01 de Julio de 2017, de http://www.medicamentosplm.com/Home/productos/ledertrexate_tabletas/131/101/45083/210
- ✚ Kozloski, G. D. (1992). The Effect of Food on the Absorption of Methotrexate Sodium Tablets in Healthy Volunteers. *Arthritis and Rheumatism*, 35(7), 761-764.
- ✚ Lebwohl, M. (2005). Psoriasis treatment: traditional therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(Suppl II), ii83-ii86. doi:10.1136/ard.2004.030791
- ✚ Longhi, M., Garnero, C., & Zoppi, A. (2015). Validación de métodos bioanalíticos. En I. Gonzalez Álvarez, M. Á. Cabrera Pérez, & M. Bermejo Sanz, *Metodologías Biofarmaceuticas en el desarrollo de medicamentos* (08/06/2015 ed.). Elche, España: Universidad Miguel Hernandez de Elche. Recuperado el 03 de Noviembre de 2017, de

<https://books.google.com.mx/books?id=Y4DXCQAAQBAJ&lpg=PT146&dq=factor%20de%20matriz%20normalizado&hl=es&pg=PT1#v=onepage&q=factor%20de%20matriz%20normalizado&f=false>

- ✚ Magazzini, L. (2001). Dynamic competition in pharmaceuticals. Patent expiry, generis penetration and industry structure. *The European Journal of Health Economics*, 5(2), 175-182.
- ✚ Moreno, L. (2004). Aspectos éticos de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia de productos farmacéuticos contenidos en las legislaciones de América Latina. *Acta Bioethica*, 10(2), 247-259.
- ✚ NOM-177-SSA1-2013. (s.f.). *Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.*
- ✚ PDR.Net. (2017). Recuperado el 29 de Octubre de 2017, de Prescriber's Digital Reference: <http://www.pdr.net/drug-summary/Trexall-methotrexate-3176.8345>
- ✚ PubChem. (2017). *National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*. Recuperado el 01 de julio de 2017, de <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126941#section=TopRegulating>
- ✚ Medicines and Medical Devices. (2014). *Methotrexate 2.5 mg tablets. Procedure No.: UK/H/5635/001-002/DC. UK licence No.: PL 36390/0174*. Recuperado el 23 de Noviembre de 2017, de Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency: <http://www.mhra.gov.uk/home/groups/par/documents/websiteresources/con525885.pdf>
- ✚ J., & Boqué, R. (2003). Calibración Lineal. *Técnicas de Laboratorio*(284), 676-680. Obtenido de <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/callin.pdf>
- ✚ Tian, H., & N. Cronstein, B. (2007). Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate: Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 65(3), 168-173.
- ✚ Vademécun, P. (2014). Recuperado el 23 de Noviembre de 2017, de <http://mx.prvademecum.com/producto.php?producto=1829>
- ✚ van Roon, E. N., & van de Laar, M. A. (2010). Methotrexate bioavailability. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 28(suppl. 61), 27-32.
- ✚ Zapater, P., & Horga, J. (1999). Bioequivalencia y genéricos. Los estudios de bioequivalencia. I. Una aproximación a sus bases teoricas , diseño y realización. *Revista de Neurología*, 29(12), 1235-1246. Recuperado el 3 de Noviembre de 2017, de <https://www.neurologia.com/articulo/99595>

14. ANEXOS

14.1. Anexo 1: Cronograma de Actividades

Etapa Pre-Clínica	Etapa Clínica			Etapa Post-Clínica
Actividad del Día -120 al 0	Día	Hora	Actividad	Actividad a partir del día 9
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elaboración de protocolo. ▪ Elaboración de resumen, cronograma, FCI y FRC. ▪ Autorización de protocolo. ▪ Autorización del Comité de Ética en Investigación y Comité de Investigación. ▪ Sometimiento a COFEPRIS. ▪ Aprobación de COFEPRIS. ▪ Recepción de medicamento. ▪ Programación. ▪ Selección de sujetos. 	0	A partir de las 16:00 horas	Internamiento.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Seguimiento clínico de los sujetos. ▪ Cierre de FRC's. ▪ Entrega de muestras a la Unidad Analítica. ▪ Elaboración del Informe Clínico. ▪ Fase analítica. ▪ Informe final. ▪ Cierre del estudio. ▪ Solicitud de autorización para destrucción de muestras biológicas.
	SESIÓN 1			
	01	06:00 horas	Toma de 250 mL de agua.	
		Entre 06:30 y 07:30 horas	Aplicación de catéter y muestra 0.	
		08:00 horas	Toma del medicamento.	
		08:15 horas	Inicio de toma de muestras.	
		20:00 horas	Muestra de las 12.0 h.	
	02	00:00 horas	Muestra de las 16.0 h.	
		08:00 horas	Muestra de las 24.0 h.	
		Aproximadamente a las 10:00 horas	Alta temporal, cita abierta.	
	Período de Lavado – 7 días			
	07	A partir de las 16:00 horas	Internamiento.	
	SESIÓN 2			
	08	06:00 horas	Toma de 250 mL de agua.	
		Entre 06:30 y 07:30 horas	Aplicación de catéter y muestra 0.	
		08:00 horas	Toma del medicamento.	
		08:15 horas	Inicio de toma de muestras.	
		20:00 horas	Muestra de las 12.0 h.	
	09	00:00 horas	Muestra de las 16.0 h.	
		08:00 horas	Muestra de las 24.0 h.	
Aproximadamente a las 10:00 horas		Alta definitiva, cita abierta.		

14.2. Anexo 2: Horario de toma de muestras

Metotrexato

Primera y Segunda Sesión	Día	Actividad	Hora Programada	Tiempo Programado
	Día 0 y 07	INGRESO	16:00	-16.000
		CENA	21:00	-11.000
		INICIO DEL AYUNO / REPOSO	22:00	-10.000
	Día 01 y 02	ASEO PERSONAL	06:00	-2.000
		MUESTRA DE SANGRE 0	06:30	-1.500
		ADMINISTRACION DEL MEDICAMENTO	08:00	0.000
		MUESTRA DE SANGRE 01	08:15	0.250
		MUESTRA DE SANGRE 02	08:30	0.500
		MUESTRA DE SANGRE 03	08:40	0.667
		MUESTRA DE SANGRE 04	08:50	0.833
		MUESTRA DE SANGRE 05	09:00	1.000
		MUESTRA DE SANGRE 06	09:15	1.250
		MUESTRA DE SANGRE 07	09:30	1.500
		MUESTRA DE SANGRE 08	10:00	2.000
		MUESTRA DE SANGRE 09	10:30	2.500
		MUESTRA DE SANGRE 10	11:00	3.000
		MUESTRA DE SANGRE 11	12:00	4.000
		DESAYUNO	12:00	4.000
		MUESTRA DE SANGRE 12	14:00	6.000
MUESTRA DE SANGRE 13		16:00	8.000	
COMIDA	16:00	8.000		
MUESTRA DE SANGRE 14	20:00	12.000		
CENA	21:00	13.000		
Día 02 y 09	MUESTRA DE SANGRE 15	00:00	16.000	
	MUESTRA DE SANGRE 16	08:00	24.000	

14.3. Anexo 3: Formato de Consentimiento Informado
FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Estudio prospectivo, aleatorizado, abierto, cruzado, comparativo para establecer en sujetos sanos la bioequivalencia de Metotrexato, tabletas de 2.5 mg: Metotrexato de Zurich Pharma, S.A. de C.V. vs Metotrexato, tabletas de 2.5 mg: Ledertrexate® de Wyeth, S.A. de C.V.”

Investigador Principal: Méd. Amilcar Esquivel Aguilar

Sub-investigador Clínico: Méd. Maria Magdalena Valencia Gutiérrez

Personal Médico: Méd. Karina Vargas Tinoco
Méd. Ruby Lemus Piña

Sitio: **Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C.**
Fray Bernardino de Sahagún № 101, Fraccionamiento Mirador del Punhuato,
C.P. 58249. Morelia, Michoacán, México. Tel.: +52 (443) 323-2828.

Comité de Ética en Investigación: Dra. Anel Gómez García
Presidente del Comité
Tel. +52 (443) 323-2828 Ext. 121
Dictamen CONBIOÉTICA: 16-CEI-002-20160601
Registro en COFEPRIS: 13 CEI 16 053 048

Comité de Investigación: Dr. Jorge Antonio Cabrera Hidalgo
Presidente del Comité
Tel. +52 (443) 323-2828 Ext. 121
Registro en COFEPRIS: 16 CI 16 053 026

Empresa Contratante: **Zurich Pharma, S.A. de C.V.**

Nombre del sujeto: _____

Este documento se llama “*Formato de Consentimiento Informado*”. Contiene una explicación completa del estudio al cual usted está invitado a participar, así como una sección de consentimiento la cual usted deberá firmar si decide participar en este estudio.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C.
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SIN AUTORIZACIÓN
Fray Bemardino de Sahagún № 101, Fracc. Mirador del Punhuato, C.P. 58249. Tel. +52 (443) 323-2828, Fax +52 (443) 323-2900
Isidro Huarte № 442, Col. Centro, C.P. 58000. Tel. +52 (443) 313-4727. Morelia, Michoacán, México.
www.cecype.com cecype@cecype.com

NATURALEZA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Este estudio clínico se realiza para analizar la similitud de dos medicamentos que contienen Metotrexato (utilizado en pacientes con artritis reumatoide, cáncer y enfermedades de la piel), uno desarrollado por Zurich Pharma, S.A. de C.V., Metotrexato (tabletas de 2.5 mg), como medicamento de prueba y el otro desarrollado por Wyeth, S.A. de C.V., Ledertrexate® (tabletas de 2.5 mg), como medicamento de referencia, en sujetos sanos de sexo masculino tratados con dosis única de 2.5 mg (una tableta).

DURACIÓN ESPERADA DEL ESTUDIO Y NÚMERO DE SUJETOS QUE SE ESPERA QUE PARTICIPEN

Se incluirán a 14 hombres en este estudio. Usted estará en el estudio durante aproximadamente 2 semanas. Este es el único sitio de investigación donde se llevará a cabo este estudio.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Determinar la biodisponibilidad de dos especialidades farmacéuticas de Metotrexato, una de *referencia* (Medicamento A: Ledertrexate® de Wyeth, S.A. de C.V.) y otra de *prueba* (Medicamento B: Metotrexato de Zurich Pharma, S.A. de C.V.), en sujetos sanos de sexo masculino, con la administración por vía oral, en condiciones de ayuno de una dosis de 2.5 mg (una tableta) de cada uno de los productos de estudio y establecer su bioequivalencia; para registro como medicamento genérico por medio de las pruebas exigidas por la Normatividad Nacional.

ASIGNACIÓN ALEATORIA AL MEDICAMENTO DE ESTUDIO

Cuando ingrese a la clínica, se le asignará un número consecutivo en orden ascendente comenzando desde el número 1 y hasta el último caso (14). A cada uno de estos números corresponderá una de las secuencias A-B o B-A de una lista de aleatorización generada previamente en el programa www.randomization.com.

DECLARACIÓN DEL USO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas que serán tomadas en el estudio, no serán utilizadas para la producción de líneas celulares o inmortales, ni para estudios genéticos o de ADN; y serán obtenidas, almacenadas y procesadas en la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C. antes de ser enviadas a la unidad analítica Bioanalit Laboratorios, S.A. de C.V.

DESCRIPCIÓN Y DISEÑO DEL ESTUDIO

Para el desarrollo de este estudio se elaboró una propuesta experimental en un documento que se denomina *protocolo*, que fue sometido a revisión y aprobado por un *Comité de Ética en Investigación* y un *Comité de Investigación* conforme a lo que establece la *Ley General de Salud* y el *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud* a fin de poder llevarlo a cabo en sujetos sanos.

Cuando usted firma este *Formato de Consentimiento Informado*, acepta regresar para sus citas. Se le solicitará cumplir con el calendario de visitas y los procedimientos explicados en este *Formato de Consentimiento Informado*. El solo hecho de que acepte participar en el estudio no garantiza su inclusión en el mismo. La inclusión en este estudio dependerá de los requerimientos del estudio y el médico determinará si usted es elegible. Si usted no es elegible a participar en este estudio, el médico le informará la razón.

Antes de que usted pueda iniciar el estudio, el médico o el personal del estudio hablarán con usted sobre el mismo. Usted deberá firmar este *Formato de Consentimiento Informado* antes de que el médico o el personal del estudio puedan empezar el periodo de selección para ver si usted califica para ser incluido en éste. Se le proporcionará una copia de esta información antes de que inicie cualquier procedimiento del estudio.

Para determinar si usted califica para este estudio, le serán practicadas las siguientes pruebas y procedimientos de selección:

Selección

El personal médico autorizado de la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C., le hará un interrogatorio sobre su historial médico y una exploración física para registrarlo en un *Expediente Clínico* junto con los estudios de laboratorio clínico, electrocardiograma y radiografía de tórax. Los estudios de laboratorio que se harán a partir de una muestra de su sangre incluirán a las pruebas de VIH (SIDA), las de hepatitis B y C y prueba de VDRL (sífilis), biometría hemática completa, química sanguínea, determinación de ácido fólico y pruebas de funcionamiento del hígado y del riñón. A partir de una muestra de orina se le hará un examen general de orina y prueba para detectar drogas de abuso. Estos estudios tienen por objeto establecer su estado de salud, ya que es un requisito de inclusión para participar en el estudio el que se le considere clínicamente sano y sin evidencia de enfermedad seria o que afecte los objetivos del estudio. Estos estudios de laboratorio tienen una vigencia máxima de tres meses.

Etapas del estudio

Será internado en 2 ocasiones por periodos de 42 horas aproximadamente, con intervalo de 7 días en el área de vigilancia médica no hospitalaria de la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C.

Primer internamiento

El internamiento se iniciará a partir de las 16:00 horas, el personal médico lo revisará de nuevo para confirmar su estado de salud. Se le hará una prueba en orina para detección de drogas de abuso como marihuana, cocaína, benzodiazepinas, anfetaminas o metanfetaminas, morfina o heroína, y una prueba de alcohol en aliento. A las 21:00 horas, recibirá una cena ligera y se le mantendrá en ayuno hasta el inicio de la toma de muestras en la mañana del día siguiente del internamiento.

Después de consumir los alimentos de la cena iniciará su descanso a partir de las 22:00 horas. Al día siguiente será despertado a las 06:00 horas para el aseo personal, ingesta de 250 mL de agua, el registro de signos vitales y la instalación en el antebrazo de un catéter que permanecerá dentro de la vena para la obtención de las muestras de sangre durante 25 horas. A las 08:00 horas se le administrará el medicamento de prueba o referencia que en forma aleatoria (por azar) le asignen en cada una de las 2 sesiones conforme al diseño del estudio, con 250 mL de agua.

Las tomas de sangre se harán en base a un horario ya definido, con un total de 17 muestras viables y un volumen final por sesión de aproximadamente 170mL de sangre extraída. Como comparación, en una donación de sangre se extraen de 450 a 500 mL de sangre. Estas maniobras con el catéter por veinticinco horas pueden ser molestas y tienen el riesgo de producir dolor o inflamación de la vena donde se colocó el catéter o de favorecer una infección. El dolor o la percepción de la maniobra y el ver la extracción de sangre, pueden inducir mareo desde leve hasta un desmayo en algunos sujetos muy susceptibles o sin experiencia previa en estudios similares.

Para la extracción de las muestras frecuentes, se empleará la técnica de instalar un catéter dentro de la vena y colocar un adaptador para múltiples tomas, los que serán lavados con una solución anticoagulante después de cada obtención de la muestra de sangre correspondiente con el fin de evitar que se tape por un coágulo. En cada toma se descartará el volumen inicial y después se tomará la muestra de aproximadamente 10 mL de sangre. El horario de obtención de las muestras será el siguiente: 06:30, 08:00, 08:15, 08:30, 08:40, 08:50, 09:00, 09:15, 09:30, 10:00, 10:30, 11:00, 12:00, 14:00, 16:00 y 20:00 y 00:00 horas, el día que salga de la clínica una muestra a las 08:00 horas, las muestras de sangre son después de la ingesta del medicamento en estudio. En el caso de que el catéter se obstruya o sea desplazado del interior de la vena, usted podrá decidir si un nuevo catéter estéril le será instalado en otro sitio o si las muestras son tomadas por punción directa.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

Durante este periodo le tomarán los signos vitales y debe referir cualquier síntoma o molestia relacionada con el estudio. Después de la muestra de 08:00 horas del día que egresa de la clínica, se le retirará el catéter y será dado de alta aproximadamente a las 10:00 horas.

En este día de toma de muestras (durante el internamiento), recibirá un desayuno ligero a partir de las 12:00 horas, la comida a partir de las 16:00 horas y la cena a partir de las 21:00 horas en cantidad y tipo uniforme a lo largo del estudio.

Durante el tiempo que esté internado en la clínica, usted estará bajo la vigilancia de un médico en cada uno de los turnos.

Periodo de lavado

Durante los 7 días de intervalo entre cada uno de los 2 internamientos, tendrá si es necesario, asistencia médica y estará en contacto con el responsable clínico del estudio cuando tenga alguna molestia o evento indeseable.

Segundo internamiento

Igual que el primer internamiento pero después de 7 días.

Después de esta visita, cualquier molestia que se presente en el transcurso de una semana deberá comunicarla al responsable clínico del estudio, ya sea vía telefónica o acudiendo a la Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C.

Los horarios especificados en este *Formato de Consentimiento Informado* están basados en el protocolo clínico del estudio y pueden sufrir adelanto o retraso (de hasta una hora aproximadamente) de acuerdo al margen establecido en el protocolo.

Las muestras de sangre que se le tomarán en el estudio podrían no ser analizadas por la unidad analítica dependiendo del desarrollo en el análisis de las muestras biológicas.

RESTRICCIONES DEL ESTUDIO / RESPONSABILIDADES DEL SUJETO

Desde su inclusión en el estudio y hasta la conclusión del mismo, se comprometerá a no consumir medicamento alguno, fumar, beber alcohol o consumir bebidas o alimentos que contengan xantinas (café, té, cocoa, chocolate, mate, refrescos de cola, etc.), toronja, uva u otros frutos cítricos, alimentos asados al carbón o drogas de abuso como marihuana, cocaína, benzodiazepinas, anfetaminas o metanfetaminas, morfina o heroína.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

El día del internamiento evitará consumir chicles, caramelo macizo tipo halls, enjuagues bucales, atomizador bucal o el uso de bálsamos labiales, con la finalidad de que no interfiera en el resultado de la prueba de alcohol en aliento.

En caso de que así suceda, a la brevedad se lo deberá informar al responsable del estudio, quien a su vez decidirá la acción a seguir.

Es su responsabilidad asistir a todas las visitas del estudio, así como notificar a los médicos del estudio, cualquier molestia o eventualidad que le ocurra durante el desarrollo del mismo.

POSIBLES BENEFICIOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

La participación en este estudio no implica beneficios directos para usted, más que el conocer su estado general de salud, pero permitirá en su conclusión establecer si el producto en desarrollo cumple con los requisitos para poder ser empleado por los médicos como una alternativa más barata en pacientes con artritis reumatoide, cáncer y enfermedades de la piel. Esto implica disponer en el mercado de un producto de menor costo, con acción y calidad como la del medicamento de referencia, conforme a los lineamientos de política en salud del gobierno federal.

RIESGOS POTENCIALES Y POSIBLES MOLESTIAS

Por los procedimientos a los que será sometido, este proyecto se considera de riesgo mayor que el mínimo, principalmente porque puede presentar dolor, mareo o desmayo durante las maniobras para colocar la sonda o catéter dentro de la vena. También puede ocurrir inflamación de la vena con el catéter (flebitis) o de infección por la permanencia del catéter. Por otro lado, la exposición aguda o prolongada a cualquier medicamento puede desencadenar eventos indeseables relacionados a su mecanismo de acción o a respuestas de toxicidad indirecta como reacciones de sensibilización o alergias, que pueden requerir atención médica y cuyos costos serán cubiertos por el patrocinador del estudio, siempre y cuando estos eventos adversos sean atribuibles a los medicamentos en estudio o a los procedimientos necesarios para su realización.

Usted recibirá sólo una dosis del medicamento durante cada una de las dos etapas del estudio, por lo que la posible aparición de un efecto indeseable es sumamente reducida. Sin embargo, se le hace saber que cuando el medicamento se utiliza en dosis repetidas como sucede en la práctica médica habitual cuando es usado como tratamiento, las reacciones adversas por el uso de Metotrexato son:

Infecciones	Poco frecuentes	Infecciones oportunistas, incluyendo infecciones fatales.
	Rara	Infección generalizada a todo el cuerpo.
	Frecuencia indeterminada	Infecciones pulmonares, incluyendo neumonía, reactivación de la infección de hepatitis B, empeoramiento de la infección de hepatitis C.
Tumores benignos y malignos (incluyendo quistes y pólipos)	Poco frecuentes	Tumor maligno de ganglios linfáticos.
Trastornos sanguíneos y del sistema linfático	Poco frecuentes	Anemia, disminución de la producción de sangre, disminución de las plaquetas.
	Muy raras	Anemia por desarrollo incompleto o defectuoso de eritrocitos.
	Frecuencia indeterminada	Alteraciones de los ganglios linfáticos, disminución de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas en la sangre, disminución de neutrófilos en la sangre, aumento de eosinófilos en la sangre.
Trastornos del sistema inmune	Poco frecuentes	Reacciones alérgicas severas.
	Muy raras	Disminución de los anticuerpos.
Trastornos del metabolismo y nutrición	Rara	Diabetes.
Trastornos psiquiátricos	Raras	Alteración del humor, disfunción del habla y funciones generales transitorias.
Trastornos del sistema nervioso	Frecuentes	Adormecimiento de partes del cuerpo.
	Poco frecuentes	Dolor de cabeza y parálisis de un lado del cuerpo.
	Raras	Adormecimiento, trastornos del lenguaje incluyendo dificultad para articular palabras o comunicarse, alteraciones cerebrales.
Trastornos de la visión	Raras	Visión borrosa y cambios visuales.
	Muy raras	Inflamación y lagrimeo de los ojos, ceguera transitoria o pérdida de la vista.
Trastornos cardiacos	Raras	Disminución de la presión arterial.
	Muy raras	Acumulación de líquido o inflamación en la capa externa del corazón.
Trastornos de las venas	Rara	Eventos por taponamiento de una arteria por un trombo puede ser cerebral o en otra parte del cuerpo
	Muy rara	Inflamación de las venas

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

Trastornos respiratorios o del tórax	Poco frecuentes	Inflamación de los pulmones incluyendo la muerte, acumulación de líquido en los pulmones.
	Raras	Inflamación de la faringe, engrosamiento del tejido pulmonar.
	Muy raras	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
	Frecuencia indeterminada	Inflamación de los alveolos de los pulmones
Trastornos gastrointestinales	Poco frecuentes	Falta de apetito, diarrea, Infamación de la cavidad bucal, vómito, inflamación del páncreas.
	Raras	Inflamación del intestino, ulceración gastrointestinal y hemorragia, Inflamación de las encías, sangre en las heces.
	Muy rara	Vómito de sangre.
Trastornos del hígado	Poco frecuentes	Elevación de las enzimas del hígado
	Raras	Inflamación del hígado, cirrosis, Intoxicación del hígado.
	Muy raras	Disminución de la albúmina (proteína) en la sangre.
	Frecuencia indeterminada	Insuficiencia del hígado.
Trastornos en piel y tejido subcutáneo	Poco frecuentes:	Caída de cabello, machas en la piel, ampollas y lesiones en la piel.
	Raras	Acné, moretones, manchas en la piel, salpullido, bolas en la piel, erosión dolorosa de lesiones en la piel, intolerancia a la luz, cambios de coloración, comezón, ulceración de la piel, ronchas.
	Muy raras	Lesiones en la piel con pus, aparición de varices pequeñas como arañas.
Trastornos de músculos y huesos	Raras	Dolor de articulaciones y músculos, osteoporosis, fracturas por aumento de presión del hueso
Trastornos renales y urinarios	Poco frecuentes	Alteraciones severas en los riñones o insuficiencia renal.
	Rara	Ardor al orinar.
	Muy rara	Aumento en la sangre de urea y creatinina, inflamación de la vejiga, sangre en la orina.
	Frecuencia indeterminada	Eliminación de proteínas en la orina
Embarazo	Poco frecuentes	Defectos en el feto.
	Rara	Aborto.
	Frecuencia indeterminada	Muerte del feto.
Trastornos generales	Muy raras	Muerte súbita.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

La clasificación de la CIOMS (*Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas*, entidad en la esfera de la OMS, *Organización Mundial de la Salud*) de las reacciones adversas al medicamento en función de la frecuencia, es la siguiente:

- ✦ **Muy frecuente o muy común:** Se producen con una frecuencia mayor o igual a 1 caso cada 10 pacientes que entran en contacto con el medicamento. Se expresa $\geq 1/10$.
- ✦ **Frecuente o común:** Se producen con una frecuencia mayor o igual que 1 caso cada 100 pacientes que entran en contacto con el medicamento, pero menor que 1/10. Se expresa $\geq 1/100$ y $< 1/10$.
- ✦ **Infrecuente o poco común:** Se producen con una frecuencia mayor o igual a 1 caso cada 1,000 pacientes que entran en contacto con el medicamento, pero menor de 1/100. Se expresa $\geq 1/1,000$ y $< 1/100$.
- ✦ **Rara:** Se producen con una frecuencia mayor o igual a 1 caso cada 10,000 pacientes que entran en contacto con el medicamento, pero menor que 1/1,000. Se expresa $\geq 1/10,000$ y $< 1/1,000$.
- ✦ **Muy rara:** Se producen con una frecuencia menor de 1 caso de cada 10,000 pacientes que entran en contacto con el medicamento. Se expresa $< 1/10,000$.

Las medidas de seguridad a seguir consisten desde la vigilancia médica estrecha hasta la salida del sujeto del estudio para su atención hospitalaria especializada. Si durante el desarrollo de este estudio, percibe alguna molestia similar o diferente a las señaladas, es indispensable que de inmediato la reporte al médico responsable del estudio.

PRECAUCIONES GENERALES

Por seguridad de usted, **NO DEBE CONSUMIR NINGÚN MEDICAMENTO** por lo menos una semana antes del estudio y hasta una semana después de que termine, esto con el fin de evitar alguna interacción del fármaco del estudio con el que usted pudiera consumir, es de suma importancia que ante cualquier malestar informe al Investigador Principal o personal del estudio.

No debe consumir ninguno de los siguientes tipos de medicamentos:

Antiinflamatorios no esteroideos: Naproxeno, Indometacina, Paracetamol, Meloxicam, Piroxicam, etc.

Salicilatos: Aspirina, Disprina, etc.

Antibióticos: Penicilina, Trimetoprin-Sulfametoxazol, Ciprofloxacino, Levofloxacino, etc.

Vitaminas: Suplementos alimenticios.

Si tiene alguna duda sobre un medicamento, consulte con el personal del estudio antes de que decida tomarlo.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

CONSIDERACIONES SOBRE EL EMBARAZO DE SU PAREJA

Si usted tiene una vida sexual activa con una pareja no esterilizada (que pudiera quedar embarazada), debe aceptar evitar su embarazo por lo menos **tres meses** después de la última dosis del medicamento en estudio.

Además, se compromete a que de cumplir los requisitos de inclusión en el estudio, usted o su pareja usarán cualquiera de los siguientes métodos anticonceptivos aceptables:

- Método anticonceptivo de barrera: condón femenino, condón masculino, esponja, diafragma o capuchón cervical.
- Dispositivo intrauterino (DIU): DIU de cobre.
- Dispositivo intrauterino más método anticonceptivo de barrera: DIU de cobre más condón masculino.

CONFIDENCIALIDAD

Su nombre y datos personales de la investigación clínica serán confidenciales y estarán protegidos por la Ley Federal de Protección de Datos Personales en Posesión de Particulares, lo cual se encuentra señalado en nuestro AVISO DE PRIVACIDAD y usted puede consultarlo en www.cecype.com, aunque en caso de: auditorías, inspecciones, presencia de eventos adversos serios, verificaciones de los datos del estudio o verificación de los datos clínicos, los investigadores autorizados, el personal de los *Comités de Ética en Investigación y Comité de Investigación*, así como personal de la *Secretaría de Salud de México* y personal autorizado del patrocinador en turno, tienen el derecho de revisar su expediente. La privacidad y confidencialidad de los expedientes y su contenido están protegidas por ley; sin embargo, la información científica derivada de los resultados obtenidos de este estudio puede ser publicada con la obligación de mantener su identificación de manera confidencial.

Todos los datos que proporcione o que se obtengan de los laboratorios serán registrados y entregados al patrocinador del estudio y siempre, tanto su identidad como los resultados serán considerados confidenciales y aunque éstos se emplearán como información del estudio, ésta se mantendrá de forma confidencial.

COMPENSACIÓN POR SU PARTICIPACIÓN

Usted recibirá al término de las sesiones experimentales contempladas en este estudio, una compensación económica de \$2,150.00 (Dos mil ciento cincuenta pesos 00/100 M.N.).

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

Adicionalmente si tiene buena conducta, atiende las indicaciones del personal responsable del estudio, mantiene un comportamiento respetuoso, se hará acreedor a un estímulo económico adicional de \$250 (doscientos cincuenta pesos 00/100 M.N.). A la cantidad que resulte de la suma de la compensación y el estímulo por buena conducta, se le descontarán los impuestos correspondientes, por lo que, si la fase clínica del estudio se lleva a cabo en fin de semana, la cantidad que usted recibirá podrá ser desde \$1,847.43 (un mil ochocientos cuarenta y siete pesos 43/100 M.N.) y hasta \$2,081.43 (dos mil ochenta y un pesos 43/100 M.N.). En caso de que la fase clínica del estudio se lleve a cabo entre semana se agregará un estímulo adicional de \$100.00 (cien pesos 00/100 M.N.) por cada sesión, en este caso la cantidad que usted recibirá menos impuestos podrá ser desde \$2,034.63 (dos mil treinta y cuatro pesos 63/100 M.N.) y hasta \$2,268.63 (dos mil doscientos sesenta y ocho pesos 63/100 M.N.).

Este pago le será entregado en un cheque personal al finalizar el estudio (incluyendo las muestras ambulatorias). En caso de que no se haga acreedor al estímulo económico por buena conducta el cheque se le entregará tres días hábiles después de la última visita del estudio. Si usted es retirado del estudio por mala conducta, incumplimiento de sus responsabilidades o si usted decide retirar su consentimiento y no termina todas las sesiones descritas en este Formato de Consentimiento Informado, se le dará un pago proporcional al tiempo que usted haya participado en el estudio.

PAGO AL PERSONAL DEL ESTUDIO

La Clínica de Enfermedades Crónicas y de Procedimientos Especiales, S.C. le está pagando al médico y personal del estudio por su trabajo en este estudio.

PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO Y RETIRO VOLUNTARIO

La decisión para participar en este estudio es absolutamente voluntaria, es decir, usted es libre de elegir si participa o no en él. No habrá ningún menoscabo o pérdida de sus beneficios asistenciales si decide no participar.

Antes de tomar su decisión, la persona a cargo de la investigación le dará la oportunidad de realizar cualquier pregunta que usted tenga al respecto del estudio. No firme este *Formato de Consentimiento Informado* a menos que reciba respuestas satisfactorias a sus inquietudes y dudas respecto al estudio.

El confirmar su participación voluntaria en el estudio no lo obliga a mantenerse en él; de esta manera, usted puede revocar su consentimiento y retirarse del estudio en cualquier momento, en dicho caso sólo se le pedirá que informe los motivos de su decisión al sub-investigador clínico o al médico en turno, quien le dará las indicaciones a seguir para su seguridad.

Por otro lado es necesario informarle que, el investigador principal, también puede suspender su participación en el estudio, si es evidente que esto es para su beneficio, como puede ocurrir en el caso de presentar reacciones adversas al medicamento y en tal situación no perderá su compensación económica. Otro motivo para la suspensión de su participación en el estudio, es el no cumplimiento con las visitas programadas del estudio, así como un comportamiento inadecuado durante las sesiones de internamiento.

INDEMNIZACIÓN Y GASTOS ADICIONALES

Si usted presentara algún evento médico, el patrocinador está de acuerdo en pagar el tratamiento que resulte de lesiones o enfermedades causadas por su participación en el estudio, hasta su resolución de acuerdo al criterio de los médicos del estudio. El patrocinador también está de acuerdo en reparar o compensar algún daño ocasionado por su participación en el estudio. El patrocinador no pagará daños por negligencia del sujeto, conductas irresponsables o condiciones médicas que no se relacionen con el estudio.

NUEVA INFORMACIÓN QUE SE GENERE DURANTE LA INVESTIGACIÓN

Todo medicamento está en un proceso permanente de evaluación para ampliar la información de su utilidad o de sus riesgos, tanto por la experiencia clínica como por investigaciones específicas. Si nueva información del medicamento de estudio, se genera durante el desarrollo del mismo, ésta le será comunicada de inmediato.

PERSONAS DE CONTACTO

Las personas a cargo de este estudio son el investigador principal y el sub-investigador clínico nombrados al inicio de este documento. Cuando usted tenga necesidad de información adicional, puede comunicarse con ellos a los teléfonos: 323-2828 durante las horas de oficina y en horario nocturno al teléfono 044 (443) 128-2725 en caso de emergencia médica. Dirección de contacto: Fray Bernardino de Sahagún № 101, Fraccionamiento Mirador del Punhuato, C.P. 58249. Morelia, Michoacán, México.

Asimismo, las personas de contacto de los comités que aprobaron dicho estudio y con los que puede comunicarse al teléfono 323-2828 ext. 121 en caso de cualquier duda sobre la conducción del mismo son la presidente Dra. Anel Gómez García del *Comité de Ética en Investigación* y el presidente Dr. Jorge Antonio Cabrera Hidalgo del *Comité de Investigación*. Dirección: Fray Bernardino de Sahagún № 101, Fraccionamiento Mirador del Punhuato, C.P. 58249. Morelia, Michoacán, México.

CONSENTIMIENTO

Al firmar este *Formato de Consentimiento Informado*, usted confirma que:

1. Leyó o le leyeron en su totalidad y le explicaron en español este *Formato de Consentimiento Informado* en el que se describe el estudio de investigación clínica con el medicamento descrito (Metotrexato).
2. Tuvo la oportunidad de preguntar al investigador o personal designado, todas las dudas relacionadas con el estudio y que ha recibido respuestas que considera satisfactorias a sus dudas y cuestionamientos.
3. Tiene en su poder un duplicado firmado de este Formato de Consentimiento Informado.
4. No está participando en este momento en ningún otro estudio de investigación clínica.
5. Entiende perfectamente los objetivos del estudio, los procedimientos y maniobras a que será sometido, así como los riesgos y beneficios de éste. Por tal motivo, otorga libremente su consentimiento para participar en el estudio contenido en este formato bajo las condiciones que se le fueron descritas.
6. Autorizó que sus resultados de laboratorio vigentes puedan ser utilizados para su participación en otros estudios.
7. Entiende que puede rehusarse a continuar en el estudio o retirarse de éste, en cualquier momento, sin detrimento de su vigilancia médica.

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.

Página 13 de 15

CRONOGRAMA DE TOMA DE MUESTRAS

Metotrexato

Primera y Segunda Sesión	Día	Actividad	Hora Programada	Tiempo Programado
	Día 0 y 07	INGRESO	16:00	-16.000
		CENA	21:00	-11.000
		INICIO DEL AYUNO / REPOSO	22:00	-10.000
	Día 01 y 08	ASEO PERSONAL	06:00	-2.000
		MUESTRA DE SANGRE 0	06:30	-1.500
		ADMINISTRACION DEL MEDICAMENTO	08:00	0.000
		MUESTRA DE SANGRE 01	08:15	0.250
		MUESTRA DE SANGRE 02	08:30	0.500
		MUESTRA DE SANGRE 03	08:40	0.667
		MUESTRA DE SANGRE 04	08:50	0.833
		MUESTRA DE SANGRE 05	09:00	1.000
		MUESTRA DE SANGRE 06	09:15	1.250
		MUESTRA DE SANGRE 07	09:30	1.500
		MUESTRA DE SANGRE 08	10:00	2.000
		MUESTRA DE SANGRE 09	10:30	2.500
		MUESTRA DE SANGRE 10	11:00	3.000
		MUESTRA DE SANGRE 11	12:00	4.000
		DESAYUNO	12:00	4.000
		MUESTRA DE SANGRE 12	14:00	6.000
MUESTRA DE SANGRE 13		16:00	8.000	
COMIDA	16:00	8.000		
MUESTRA DE SANGRE 14	20:00	12.000		
CENA	21:00	13.000		
Día 02 y 09	MUESTRA DE SANGRE 15	00:00	16.000	
	MUESTRA DE SANGRE 16	08:00	24.000	

SECCIÓN DE FIRMAS

_____	_____	_____
Nombre del sujeto	Fecha	Firma o huella
_____	_____	
Dirección del sujeto	Teléfono	

_____	_____	_____
Nombre del testigo № 1	Fecha	Firma o huella
_____	_____	
Dirección del testigo № 1	Parentesco con el sujeto	

_____	_____	_____
Nombre del testigo № 2	Fecha	Firma o huella
_____	_____	
Dirección del testigo № 2	Parentesco con el sujeto	

_____	_____	_____
Personal delegado para obtener el consentimiento	Fecha	Firma

Versión 2.0 del 28 de Junio de 2016, basado en el protocolo versión 2.0 del 28 de Junio de 2016.