**RESOLUÇÃO-RE Nº 898, DE 29 DE MAIO DE 2003**

O Adjunto da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de

Vigilância Sanitária, no uso da atribuição, que lhe confere a Portaria

n.º 238, de 31 de março de 2003,

considerando o disposto no art.111, inciso II, alínea “a” § 3º

do Regimento Interno aprovado pela Portaria nº 593, de 25 de agosto

de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000,

considerando que a matéria foi submetida à apreciação da

Diretoria Colegiada, que a aprovou em reunião realizada em 6 de

março de 2003, resolve:

Art. 1º Determinar a publicação do "Guia para planejamento

e realização da etapa estatística de estudos de biodisponiblidade relativa/

bioequivalência” anexo.

Art. 2º Fica revogada a Resolução RE no 484, de 19 de

março de 2002.

Art. 3º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

DAVI RUMEL

ANEXO

GUIA PARA PLANEJAMENTO E REALIZAÇÃO DA ETAPA

ESTATÍSTICA DE ESTUDOS DE BIODISPONIBLIDADE

RELAT IVA/ BIOEQUIVALÊNCIA

1. Introdução

O objetivo deste guia é fornecer algumas recomendações

gerais para análise estatística nos estudos de biodisponiblidade relativa/

bioequivalência.

2. Planejamento

Um dos critérios para escolher um delineamento apropriado

é verificar se o delineamento selecionado pode identificar e isolar a

variabilidade inter-individual na análise de dados. Qualquer delineamento

que venha remover essa variação da comparação entre formulações

pode ser apropriado.

O planejamento experimental mais utilizado nos ensaios de

biodisponibilidade relativa/ bioequivalência é o cruzado (crosssover),

cujos detalhes serão discutidos nesse guia.

2.1 Período de eliminação (washout) e efeitos residuais (carry-

over effects)

É importante introduzir os conceitos de período de eliminação

e efeitos residuais num planejamento de estudo cruzado, pois a

presença de efeitos residuais tem um grande impacto na inferência

estatística de bioequivalência entre formulações.

O período de eliminação é definido como um intervalo de

tempo suficientemente grande entre dois períodos de administração

para que o efeito residual de uma formulação administrada num

período seja eliminado até o próximo.

O experimento cruzado deve ser usado quando não existe

efeito residual nos tratamentos. Se um fármaco tem uma meia vida

longa ou se o intervalo entre os períodos de tratamento é muito curto,

o efeito do mesmo pode persistir depois do fim de período de eliminação

(efeito residual). Neste caso, é necessário distinguir a diferença

entre o efeito do fármaco e os efeitos residuais. O efeito do

fármaco é aquele observado durante o período no qual ele é administrado.

2.2 Descrição do planejamento

O estudo cruzado é um planejamento de blocos aleatorizados

modificados nos quais cada bloco recebe mais de uma formulação de

um mesmo fármaco em períodos diferentes. Um bloco pode ser um

indivíduo ou um grupo de indivíduos. Os indivíduos em cada bloco

recebem uma seqüência diferente de formulações. As vantagens em

se utilizar esse planejamento para estudos de biodisponiblidade relativa/

bioequivalência são:

cada indivíduo serve como seu próprio controle, o que permite

uma comparação do indivíduo com ele mesmo, para as diferentes

formulações;

a variabilidade inter-individual é removida da comparação

entre formulações, o que torna o teste de diferença de tratamentos em

geral mais poderoso;

com uma aleatorização apropriada de indivíduos para a seqüência

de administração das formulações, o planejamento produz as

melhores estimativas não viciadas para diferença (ou razão) entre

formulações.

2.3 Considerações de um delineamento básico

Recomenda-se que um delineamento básico para um estudo

de biodisponibilidade in vivo deve considerar:

questões científicas a serem respondidas;

natureza do material de referência e a forma farmacêutica a

ser testada;

disponibilidade de métodos analíticos;

considerações do benefício do teste em seres humanos.

Além disso, algumas considerações específicas para um estudo

de biodisponiblidade relativa/bioequivalência são dadas a seguir.

2.3.1. Delineamento experimental

Para um estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência

(dose simples ou múltipla) deve ser adotado um delineamento do

tipo cruzado, a não ser que um delineamento paralelo ou algum outro

seja mais apropriado por razões científicas válidas. No caso de delineamento

paralelo, cada indivíduo recebe ao acaso somente uma das

formulações.

O planejamento adequado do experimento deve ter como

objetivo minimizar a variabilidade que pode advir de várias fontes:

variabilidade inter-individual.

variabilidade intra-individual.

efeito dos períodos, que pode ser causado por ação residual

de tratamentos precedentes;

erro experimental.

variabilidade associada a tratamentos diferentes, como administração

de produtos ou dosagens diferentes.

2.3.2. Aleatorização

Inferências estatísticas válidas são normalmente baseadas nas

suposições de que os erros do modelo empregado são variáveis aleatórias

independentemente distribuídas, o que pode ser assegurado

através da aleatorização. A forma de aleatorização é feita de acordo

com o delineamento a ser utilizado no estudo.

2.3.3. Cronograma de coleta

2.3.4. Período de eliminação

2.3.5. Número de voluntários

O número de voluntários sadios deverá sempre assegurar

poder estatístico suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados

do estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência.

2.4 Tipos de desenho

ESTA SEÇÃO DESCREVE OS DESENHOS COMUMENTE UTILIZADOS

NOS ESTUDOS DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA .

2.4.1. Delineamento cruzado para dois medicamentos (T =

teste; R = referência)

a) Delineamento cruzado 2x2

É um delineamento convencional não replicado com duas

formulações, dois períodos, duas seqüências, que pode ser representado

como segue:

Cada indivíduo é aleatoriamente alocado para a seqüência

RT ou TR em dois períodos. Isto é, indivíduos alocados na seqüência

RT (TR) recebem formulação R (T) no primeiro período de administração

e formulação T (R) no segundo. Os períodos são separados

por um período de eliminação adequado.

Aleatorização para um estudo cruzado 2x2 pode ser feita

através de tabelas de números aleatórios ou procedimentos de aleatorização

implementados em softwares estatísticos.

b) Delineamento cruzado replicado

Este delineamento é recomendado para estudos de biodisponibilidade

relativa/bioequivalência de produtos com fármacos de

alta variabilidade (coeficiente de variação intra-individual ≥30%),

incluindo aqueles que são de liberação imediata, liberação modificada

e outros produtos de administração oral.

Para este delineamento os mesmos lotes das formulações

teste e referência devem ser usados para a administração replicada.

Os períodos devem ser suficientemente espaçados para garantir a

inexistência do efeito residual.

Os desenhos cruzados replicados mais comumente usados

para comparar duas formulações são:

I. Delineamento com quatro seqüências e dois períodos (delineamento

de Balaam):

II. Delineamento com duas seqüências e quatro períodos:

III. Delineamento com quatro seqüências e quatro períodos:

IV. Delineamento com duas seqüências e três períodos

Um número maior de voluntários é recomendado para o

delineamento de três períodos, comparado com o delineamento de

quatro períodos, para poder alcançar o mesmo poder estatístico para o

teste.

c) Delineamento cruzado para três medicamentos (delineamento

de Williams com T1 = teste 1, T2 = teste 2, R = referência)

Para comparar três formulações de um fármaco, existem três

possíveis pares de comparações: formulação 1 versus formulação 2,

formulação 1 versus formulação 3 e formulação 2 versus formulação

3. Quando o número de formulações a serem comparadas é grande,

mais seqüências e conseqüentemente mais indivíduos serão necessários,

o que pode ser inviável. Um delineamento de uso prático

proposto por Williams (1949) possui propriedades de balanceamento

e requer poucas seqüências e períodos. Um delineamento é dito balanceado

se satisfaz as seguintes condições:

cada medicamento é aplicado somente uma vez em cada

voluntário;

em cada período, o número de voluntários que recebem

cada medicamento tem que ser igual;

o número de voluntários que recebem o medicamento i em

algum período seguido pelo medicamento j no período seguinte é o

mesmo para todo i≠j.

Um delineamento de Williams é ilustrado como segue:

d) Delineamento cruzado para quatro medicamentos (delineamento

de Williams):

<!ID566036-3>

2.5 Seleção do delineamento experimental

Selecionar um delineamento apropriado ao planejar um estudo

de biodisponibilidade relativa/ bioequivalência é uma questão importante.

A resposta dessa questão depende de vários fatores, tais como:

número de formulações a serem comparadas;

características do fármaco e sua biodisponibilidade;

objetivo do estudo;

variabilidade inter e intra individuais;

duração do estudo e número de períodos empregados;

custo de adição de um voluntário relativo à adição de um

período;

taxa de desistência (dropout).

A análise dos dados, a interpretação dos resultados e a determinação

de bioequivalência entre as formulações, dependem diretamente

do delineamento selecionado. Portanto, todos os fatores

citados acima devem ser cuidadosamente avaliados para que um delineamento

apropriado seja escolhido.

3 Análise Estatística

3.1 Transformação logarítmica

3.1.1 Procedimento geral

Este guia recomenda que os valores dos parâmetros (ASC e

Cmax) sejam transformados usando logaritmo natural ou logaritmo

comum em base 10. A escolha de logaritmo natural ou comum deve

ser consistente e deve ser especificada no relatório de estudo.

A limitação do tamanho de amostra utilizada num estudo

típico de biodisponibilidade relativa/bioequivalência impede uma determinação

confiável de distribuição do conjunto de dados. Não é

recomendável testar normalidade de distribuição de erros depois de

transformação logarítmica, nem se deve utilizar normalidade de distribuição

de erros como uma razão para fazer análise estatística nas

escalas originais. Justificativas devem ser apresentadas no caso em

que se considera que é melhor realizar a análise estatística nas escalas

originais do que nas escalas logarítmicas.

3.1.2 Justificativas para utilização de transformação logarítmica

a) Justificativa em relação ao tratamento de dados

Em geral, uma comparação preliminar de interesse num estudo

de biodisponibilidade relativa/bioequivalência é a utilização da

razão ao invés da diferença, entre as médias dos parâmetros farmacocinéticos

(ASC e Cmax) dos dados do produto teste e de referência.

Usando transformação logarítmica, o modelo linear generalizado

empregado na análise de dados permite fazer inferências

estatísticas sobre a diferença entre duas médias na escala logarítmica,

as quais podem ser re-transformadas em inferências estatísticas sobre

a razão das duas médias na escala original (Schuirmann, 1989).

b) Justificativa em relação a farmacocinética

Westlake (1973, 1988) observou que um modelo multiplicativo

é adequado para medidas farmacocinéticas (ASC e Cmax) num

estudo de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Assumindo que

a eliminação do fármaco é de primeira ordem e somente ocorre a

partir do compartimento central, a seguinte equação é obtida após

uma administração extravascular (oral):

ASC0-∞= F.D/CL = F.D/(Vd.Ke),

onde: F é a fração absorvida, D é a dose administrada, e F.D é a

quantidade do fármaco absorvido. CL é o “clearance” de um dado voluntário,

o qual é o produto do volume de distribuição aparente (Vd) e da

constante de velocidade de eliminação (Ke). Portanto, o uso de ASC como

uma medida da quantidade de medicamento absorvido envolve um termo

multiplicativo (CL), o qual pode ser considerado como uma função do

voluntário. Por essa razão, Westlake mostra que o efeito de voluntário não

é aditivo se os dados são analisados na escala original.

A transformação logarítmica da ASC resulta num tratamento

aditivo:

log ASC0-∞= log F + log D - log V - log Ke.

Argumentos semelhantes foram dados para Cmax.

3.2 Análise dos dados

Os métodos paramétricos de modelos lineares generalizados

são recomendáveis para a análise de medidas farmacocinéticas transformadas

em logaritmo num estudo de biodisponibilidade relativa/

bioequivalência. Uma análise de variância (ANOVA) deve ser empregada

nos parâmetros farmacocinéticos ASC e Cmax usando modelos

lineares generalizados. Modelos estatísticos apropriados de

acordo com o desenho escolhido no estudo devem ser empregados.

Por exemplo, para um estudo convencional do tipo cruzado 2x2, o

modelo estatístico normalmente inclui fatores de seqüência, voluntário

dentro de seqüência, período e tratamento. O resultado deve ser

representado como a seguir (tabela ANOVA):

Fonte Grau de liberdade

Quadrado

médio

Estatística F Valor de P

Seqüência 1 (1) Fr=(1)/(2)

voluntário

(seqüência)

N-2 (2)

Período 1 (3) Fp=(3)/(5)

Tratamento 1 (4) Ft=(4)/(5)

Residual N-2 (5)

Os efeitos de seqüência, de período e de tratamento devem

ser testados usando estatísticas Fr, Fp e Ft indicadas na tabela ANOVA,

respectivamente. Deve-se notar que a igualdade entre tratamentos

(inexistência de efeito de tratamento) não implica na bioequivalência

entre formulações. A construção do intervalo de confiança de 90%

para a diferença das médias deve ser baseada nas médias de mínimos

quadrados dos dados transformados em logarítmicos e no quadrado

médio residual dessa ANOVA. Os antilogaritmos dos limites de confiança

obtidos constituem o intervalo de confiança de 90% para a

razão das médias geométricas entre os produtos teste e referência. A

conclusão de bioequivalência média é alcançada quando este intervalo

de confiança está compreendido entre 80 e 125%. Este método é

equivalente ao procedimento de dois testes unicaudais correspondentes

à hipótese nula de bioinequivalêcia, com nível de significância

de 5%.

4. Efeito de seqüência

A presença de efeitos seqüênciais (residuais) no estudo deve

ser justificada. Para um estudo cruzado 2x2, a presença de efeitos

seqüenciais pode ser aceita se alguns critérios forem observados:

I) é um estudo de dose única;

II) estudo envolve somente voluntários sadios;

III) o fármaco não é uma substância endógena;

IV) um período de eliminação adequado foi estabelecido e as

amostras de pré-dosagem não apresentam qualquer nível de fármaco

detectável em todos os voluntários;

V) o estudo satisfaz todos os critérios científicos e estatísticos

(por exemplo, protocolo, validação, dados de concentração,

análise estatística, intervalo de confiança).

Sob outras circunstâncias, o estudo deve ser refeito.

5. Considerações de outliers

NO ESTUDO DE BIODISPONIBILIDADE RELATIVA/BIOEQUIVALÊNCIA

COM DESENHO CRUZADO, OS PONTOS DISCREPANTES SÃO DEFINIDOS COMO

AQUELES EM QUE ALGUNS VOLUNTÁRIOS (OUTLIERS) DIFEREM NOTAVELMENTE

DOS DEMAIS VOLUNTÁRIOS DO ESTUDO COMPARANDO PRODUTO TESTE

E REFERÊNCIA NO PRÓPRIO VOLUNTÁRIO. A EXISTÊNCIA DE UM OUTLIER

SEM VIOLAÇÃO DO PROTOCOLO PODE INDICAR UMA DAS SEGUINTES SITUAÇÕES:

A) FALHA DO PRODUTO: NESTE CASO, UMA RESPOSTA ANORMAL

PODE ESTAR PRESENTE TANTO PARA PRODUTO TESTE QUANTO PARA PRODUTO

REFERÊNCIA;

B) SUBPOPULAÇÃO: ISTO PODE OCORRER QUANDO UM INDIVÍDUO

REPRESENTA UMA POPULAÇÃO, NA QUAL A BIODISPONIBILIDADE DE DOIS

PRODUTOS É NOTAVELMENTE DIFERENTE DA MAIORIA DA POPULAÇÃO.

Devido esses fatos, em geral, a exclusão de outliers não é

recomendável, principalmente para desenhos não replicados.

6. O poder do teste e tamanho da amostra

O poder do teste de um estudo de biodisponibilidade relativa/

bioequivalência é definido como a probabilidade de aceitar a

bioequivalência entre produto teste e referência corretamente. Durante

a etapa de planejamento, uma das questões mais importantes é quantos

voluntários são necessários para obter um poder desejado (por

exemplo, 80%) estabelecendo bioequivalência entre duas formulações

dentro dos limites clinicamente importantes (por exemplo, 20% da

média do referência). Para responder essa questão, a metodologia

comumente utilizada é escolher um tamanho de amostra apropriado

através do cálculo da função do poder do teste baseado numa estimativa

de coeficiente de variação intra-individual obtida através da

literatura ou de um estudo piloto.

Na literatura, existem diversas maneiras para determinar o tamanho

da amostra. Neste guia, é apresentada uma fórmula aproximada

(Chow & Liu) para calcular o tamanho da amostra de um desenho cruzado

2x2 baseada na função de poder do teste por hipótese de intervalo de

Schuirmann. A determinação do tamanho da amostra para outros tipos de

desenho deve ser feita de maneira análoga.

Define-se a medida = T - R, ou seja, mede a verdadeira

diferença entre as médias do produto teste e referência. Num estudo

de bioequivalência média, considerando a regra de 20% com =0,2

R, para alcançar um poder de (1-) com nível de significância , o

tamanho da amostra para cada seqüência é:

a) no caso de = 0,

n ≥[t(, 2n-2) + t(/2, 2n-2)]2 (CV/20)2;

b) no caso de ≠0,

n ≥[t(, 2n-2) + t(, 2n-2)]2 [CV/(20-)]2,

onde = 100 x /R = 100 x (T - R)/ R.

Nas duas fórmulas apresentadas acima, CV representa o coeficiente

de variação intra-individual e t(a,b) representa o valor crítico

da distribuição t de Student, ao nível de significância a com b graus

de liberdade.

O total de voluntários necessários para um desenho cruzado

2x2 é:

N = 2n

Como o grau de liberdade (2n-2) apresentado na fórmula é desconhecido,

um procedimento iterativo é necessário para obtenção do valor

de n. Para ilustrar este procedimento, apresenta-se o seguinte exemplo.

Exemplo: Para conduzir um estudo de bioequivalência média

utilizando desenho cruzado 2x2 e a regra de 20% de diferença entre duas

formulações, deseja-se determinar o número de voluntários necessários

para obter um poder de 80% detectando uma diferença de 20% entre duas

formulações. Supondo que o CV neste exemplo é 20%.

Em primeiro lugar, considera-se o caso onde = 0,

I) começando com um chute inicial: n=12;

II) então, temos o grau de liberdade 2n-2=22;

III) utiliza-se = 0,05 e = 0,2, temos

t(0,05, 22) = 1,717 e t(0,1, 22) =1,321;

IV) n ≥(1,717 + 1,321)2 (20/20)2 ≈9,2;

V) agora use-se n = 10 como um valor inicial para próxima

iteração;

VI) 2n-2 = 18, t(0,05, 18) = 1,734 e t (0,10, 18) = 1,330;

VII) n ≥(1,734 + 1,330)2 (20/20)2 ≈9,4 ;

VIII) como essas duas iterações resultaram uma resposta similar

de 10 voluntários para cada seqüência, um total de 20 voluntários deve ser

necessário no sentido de obter um poder 80% para detectar uma diferença

de 20% entre duas formulações para o caso de = 0.

Agora considera-se o caso de = 0,05 R,

I) começando com um chute inicial: n=14;

II) então, temos o grau de liberdade 2n-2=26;

III) utiliza-se = 0,05 e = 0,2, temos

t(0,05, 26) = 1,706 e t(0,2, 26) = 0,856;

IV) n ≥(1,706 + 0,856)2 [20/(20-5)]2 ≈11,66;

V) para próxima iteração, utiliza-se n = 12 como um valor inicial;

VI) 2n-2 = 22, t(0,05, 22) = 1,717 e t (0,20, 22) = 0,858;

VII) n ≥(1,717 + 0,858)2 [20/(20-5)]2 ≈11,79;

VIII) portanto, um total de 24 voluntários deve ser necessário

no sentido de obter um poder 80% para detectar uma diferença

de 20% entre duas formulações para o caso de = 0,05 R.

A tabela a seguir apresenta o total de tamanho da amostra

necessário para alcançar um poder desejado para um desenho cruzado

2x2 de diversas combinações entre e CV.

7. Outras considerações

O critério da bioequivalência média é recomendado para uma

comparação entre as medidas farmacocinéticas de interesse na maioria

dos estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. Entretanto,

na literatura, existem os critérios de bioequivalência individual

e populacional que também podem ser muito úteis em algumas

circunstâncias.

A bioequivalência média focaliza-se somente na comparação

das médias populacionais de medidas farmacocinéticas de interesse e

não nas variâncias dessas medidas. Este método não leva em consideração

a variância associada à interação entre indivíduos e formulações,

ou seja, a variação entre as médias dos produtos teste e

referência devido às diferenças existentes entre os indivíduos. Já os

critérios de bioequivalência individual e populacional incluem as

comparações além das médias, as respectivas variâncias associadas às

medidas farmacocinéticas de estudo. O critério da bioequivalência

populacional avalia a variabilidade total das medidas de interesse. O

critério de bioequivalência individual engloba a variabilidade intraindividual

dos produtos teste e referência, bem como as interações

entre indivíduos e formulações.

Hauck & Anderson (1992) apresentam considerações e comparações

dos três tipos de bioequivalência, bem como as indicações

para a construção dos intervalos de confiança.

8. Referências Bibliográficas

Chow, S.C.; Liu, J-P. Design and Analysis of Bioavailability

and Bioequivalence Studies. New York: Marcel Dekker. 2000

Diletti, E.; Hauschke, D.;Steinijans, V.W. Sample Size Determination

for Bioequivalence Assessment By Means of Confidence

Intervals, Int. J. Clin. Pharmacol. Therap., 29:1-8. 1991

Guidence for industry - Statistical Approaches to Establishing

Bioequivalence

U.S. Department of Health and Human Services; FDA -

CDER, January 2001.

Hauck, W.W.; Anderson, S. Types of Bioequivalence and

Related Statistical Considerations. Int. J. Clin. Pharmacol. Therap.,

30:181-7, 1992.

Liu, J-P. Use of the Repeated Crossover Designs in Assessing

Bioequivalence, Stat. Med., 14:1067-78, 1995.

Schuirmann, D.J. Treatment of Bioequivalence Data: Log

Transformation, in Proceedings of Bio-International' 89 - Issues in the

Evaluation of Bioavailability Data, Toronto, Canada, October 1-4,

159-61, 1989.

Westlake, W.J. The Design and Analysis of Comparative

Blood-Level Trials, in Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences,

Dosage Form Design and Bioavailability (J.Swarbrick, ed.), Lea

and Febiger, 149-79, 1973.

Westlake, W.J. Bioavailability and Bioequivalence of Pharmaceutical

Formulations, in Biopharmaceutical Statistics for Drug

Development (K.E.Peace, ed.), Marcel Dekker, Inc., 329-52, 1988.