



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNAM
TESIS DE MAESTRÍA

TÍTULO: Estudio de bioequivalencia de dos formulaciones de enrofloxacin después de su administración subcutánea en ganado bovino clínicamente sano en comparación con los productos de referencia.

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Elaborado por:

Francisco Varela Michel

Revisado por:

Luis Ocampo Camberos

María Josefa Bernad Bernad

René Rosiles Martínez

Miembros del Jurado:

Héctor Sumano López

Miguel Ángel Blanco Ochoa



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1 TÍTULO:	2
2 INTRODUCCIÓN:	2
2.1 ANTECEDENTES.....	2
2.1.1 Generalidades de la enrofloxacin.....	2
2.1.2 Farmacodinamia.....	3
2.1.3 Farmacocinética.....	6
2.1.4 Usos terapéuticos.....	9
2.1.5 Toxicidad/seguridad.....	10
2.1.6 Residuos.....	10
2.1.7 Interacciones.....	11
2.2 ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA.....	11
2.2.1 Aspectos Teóricos.....	11
2.2.2 Diseño de los estudios.....	12
2.2.3 Metodología de los estudios.....	13
2.2.4 Definición de los rangos de bioequivalencia.....	13
3 JUSTIFICACIÓN:	13
4 OBJETIVOS:	14
4.1 Objetivo Primario.....	14
4.2 Objetivos Secundarios.....	14
5 HIPÓTESIS:	14
5.1 H_0	14
5.2 H_1 :	14

6 MATERIAL Y MÉTODOS:	14
6.1 CALENDARIO.....	14
6.1.1 Fecha de realización.....	14
6.1.2 Calendario de eventos	15
6.2 PLAN DE ESTUDIO:.....	16
6.2.1 Grupos del Tratamiento.....	17
6.2.2 Fase experimental.....	17
6.2.3 Procedimientos de asignación aleatoria.....	17
6.3 PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIO.....	17
6.3.1 Animales de Prueba.....	17
6.3.2 Criterios de Inclusión.....	18
6.3.3 Criterios de Exclusión.....	18
6.3.4 Periodo de Aclimatación en los Animales de Prueba.....	18
6.3.5 Registro de personal y limitación de la información.....	19
6.4 REGISTRO DE PRODUCTO.....	19
6.5 MÉTODO ANALÍTICO PRIMARIO.....	19
6.6 MÉTODO ANALÍTICO COMPLEMENTARIO.....	22
6.7 Instalaciones para el estudio.....	25
6.8 Dieta.....	25
6.9 Administración de los medicamentos.....	25
6.10 Remoción de sujetos del estudio.....	26
6.11 Concurrencias/medicaciones concomitantes/terapias.....	26
6.12 Manejo general.....	26
6.13 Necropsia y disposición de sujetos muertos.....	26

6.14	ESPECIFICACIÓN DE VARIABLES.....	27
6.14.1	Exámenes físicos.....	27
6.14.2	Análisis de Enrofloxacin en el plasma.....	27
6.15	OBSEVACIONES.....	29
6.15.1	Examen clínico.....	29
6.15.2	Eventos Adversos al Fármaco (EAF)	29
6.16	Peso corporal.....	30
6.17	Patología.....	30
6.18	Análisis de datos.....	32
6.18.1	Definición de la unidad experimental.....	32
6.18.2	Descripción de la metodología estadística.....	32
6.18.3	Determinación del tamaño de muestra.....	32
6.19	Sitio de investigación.....	33
6.20	Colección y retención de datos.....	33
7	RESULTADOS:.....	36
6.21	CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS.....	36
7.1	MODELAJE COMPARTIMENTAL.	40
7.2	ANÁLISIS DE BIOEQUIVALENCIA.....	40
7.2.1	Parámetros farmacocinéticos determinantes de bioequivalencia.....	40
7.3.2.	Comparaciones por parejas hipotéticas.....	44
7.3.3	Decisión de Bioequivalencia.....	45
7.3	Tiempo al que se alcanza la Cpmax (Tmax)	46
8	DISCUSIÓN:.....	47
8.1	Buenas Prácticas Clínicas (BPC)	47
8.2	Ejecución del experimento.....	47
8.3	Análisis de los resultados.....	48

8.4	Estimación de la Bioequivalencia.....	48
8.5	Análisis gráfico.....	50
8.6	Relevancia Clínica.....	50
8.7	Seguridad de los productos.....	51

9 CONCLUSIONES:.....51

10 BIBLIOGRAFÍA:.....52

FORMA 1,	Eventos adversos al fármaco.....	54
FORMA 2,	Asignación de tratamiento.....	56
FORMA 3	Registro de peso y dosis.....	57
FORMA 4,	Registro de personal.....	58
FORMA 5,	Registro de producto: descripción.....	59
FORMA 6,	Registro de producto: inventario.....	60
FORMA 7,	Remoción de animales.....	61
FORMA 8,	Registro de alimento y agua.....	62
FORMA 9,	Examen post mórtem.....	63
FORMA 10,	Examen físico general.....	64
FORMA 11,	recolección de muestras de sangre.....	65
FORMA 12,	Examen clínico.....	67
FORMA 13,	Bitácora de visitas.....	68
FORMA 14,	Bitácora de comunicación.....	69
APÉNDICE 1:	Análisis factorial de Áreas Bajo la Curva.....	70
APÉNDICE 2:	Análisis factorial de Concentración Plasmática Máxima.....	70

TÍTULO:

Estudio de bioequivalencia de dos formulaciones de enrofloxacin después de su administración subcutánea, en bovinos adultos sanos, en comparación con el producto de referencia.

2 INTRODUCCIÓN:

La enrofloxacin es un medicamento muy popular en medicina veterinaria, debido a sus ventajas farmacológicas. Ante la producción de un genérico, es importante que se demuestre su similitud con el medicamento innovador, en términos estadísticos, mediante un estudio de Bioequivalencia.

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Generalidades de la enrofloxacin

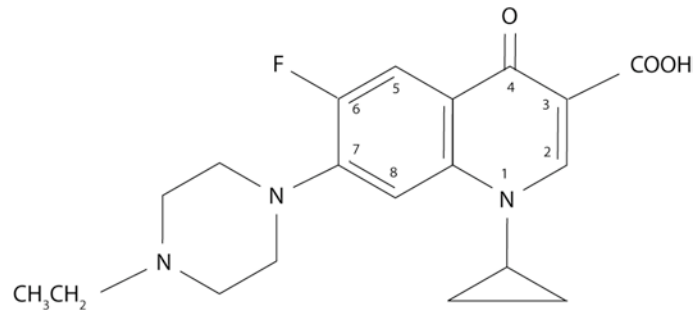
La enrofloxacin es un antimicrobiano que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas (FQ), siendo el primer fármaco de este grupo que se introdujo a la medicina veterinaria.

Las FQ son antibacterianos sintéticos que se introdujeron a la terapéutica a mediados de los años ochenta e inmediatamente se consideraron como los antimicrobianos “casi ideales”, cuyas ventajas principales incluyen su rápida acción bactericida contra una gran variedad de organismos clínicamente importantes, su gran potencia, seguridad, propiedades farmacocinéticas clínicamente ventajosas y la posibilidad de ser administradas por diversas vías, como oral (en tabletas y agua de bebida), intravenosa, intramuscular y subcutánea.^{1,2}

Las FQ tienen la misma estructura básica relacionada con el ácido nalidixico, que fue el primer compuesto de tipo 4-quinolona que salió al mercado en 1965; a partir de entonces se han diseñado más de 10,000 compuestos relacionados sustituyendo o agregando grupos a las moléculas básicas, lo que contribuye a las características fisicoquímicas de cada compuesto.^{1,2,3} Dichas diferencias repercuten en la liposolubilidad, volumen de distribución, absorción y velocidad de eliminación. La posición 1 es un nitrógeno en la estructura bicíclica aromática y, generalmente, tiene unido un grupo alquilo (ciclopropil en el caso de la enrofloxacin). En las posiciones 3 y 4 se encuentran grupos carboxilo y cetona, respectivamente, a los que se confiere importancia para la actividad antimicrobiana. Un factor relevante es la incorporación de un flúor en la posición 6, lo que aumenta considerablemente su eficacia contra gram negativos y positivos, además de que mejora la penetración tisular y reduce la toxicidad al sistema nervioso central. Las modificaciones en las posiciones 2, 5 y 7 alteran la farmacocinética de los compuestos.^{1,3} Por ejemplo se puede mencionar el caso de la enrofloxacin que sólo difiere de la ciprofloxacina en un grupo etilo presente en el anillo piperazinil de la enrofloxacin, lo que le confiere una mayor absorción oral, pero, disminuye su actividad contra el género *Pseudomonas*.² La figura 1 muestra la estructura de la enrofloxacin.

Las FQ más utilizadas en medicina veterinaria a nivel mundial son (en orden alfabético): amifloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, nicotinato de norfloxacina, orbifloxacina y sarafloxacina^{1,3}. Además de la enrofloxacina, han sido introducidas al mercado exclusivamente para su uso en medicina veterinaria la sarafloxacina, orbifloxacina, difloxacina, danofloxacina y marbofloxacina.²

- Figura 1. Fórmula desarrollada de la enrofloxacina:



- Fórmula condensada: $C_{19}H_{22}FN_3O_3$
- Peso molecular: 359.40
- Nombre químico: 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil) -6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolinocarboxílico.
- Descripción: Polvo cristalino amarillento o casi blanco.
- Propiedades fisicoquímicas: punto de fusión de 219 a 233 °C, ligeramente soluble en agua y estable en condiciones ordinarias.
- PKa: comportamiento anfotérico, se puede protonar en el grupo carboxilo y en la porción amina terciaria del anillo básico. El Pka para el grupo carboxilo es de 6.0 y para la amina de 8.8.
- DL50: 5,000 mg/kg por vía oral en ratas.^{1,4,5}

2.1.2 Farmacodinamia

La enrofloxacina, como las demás FQ, tiene como punto de acción primario la inhibición de la topoisomerasa II microbiana, también llamada ADN girasa. El cromosoma bacteriano es una molécula continua de una longitud de aproximadamente mil veces mayor a la de la bacteria que la contiene, por lo que es necesario realizar un “superenrollamiento” (en la dirección opuesta a la doble hélice de ADN) para que el ADN quede en una disposición muy densa. Las enzimas llamadas topoisomerasas participan en reacciones de enrollamiento de ADN; la topoisomerasa II consta de las subunidades A y B. En dicho proceso el ADN envuelve a la subunidad A mediante enlaces covalentes y otro segmento de ADN se une a partes donde los enlaces se rompen. Se postula que la ADN girasa participa en estos fenómenos de unión y ruptura, mismos que interrumpen las quinolonas mediante su unión al complejo ADN-ADN girasa. Se ha sugerido que las FQ tienen como un segundo blanco intracelular a la topoisomerasa IV que, a diferencia de la II, participa en el mecanismo de relajación del ADN que está siendo enrollado. Es posible que la topoisomerasa IV

sea el mecanismo principal contra algunos microorganismos gram positivos como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus spp.*²

Para actuar, la enrofloxacin ingresa a la célula bacteriana principalmente vía porinas y a través de la membrana citoplásmica en dependencia de sus características fisicoquímicas, lo que resulta en una rápida acumulación intrabacteriana.³ La presencia de cationes y un pH bajo en el lugar de la infección afectan la actividad de la enrofloxacin; iones de aluminio, magnesio, hierro y calcio, pueden unirse al grupo carboxilo del compuesto con lo que disminuye su actividad.¹ Aunque en ensayos *in vitro* indican que las condiciones acídicas disminuyen la actividad de las FQ, es un factor difícil de establecer *in vivo*.⁶

La actividad bactericida de la enrofloxacin es dependiente de la concentración y la muerte de las bacterias ocurre dentro de los primeros 20 a 30 minutos de exposición.⁴ Las FQ se clasifican como bactericidas, pero, a diferencia de los β -lactámicos, su eficacia está relacionada, principalmente con la concentración plasmática máxima que logren, aunque también con el tiempo que permanecen por encima del valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).³

Este fármaco ha demostrado un notable efecto post-antibiótico (EPA), con duración de cuatro a ocho horas, contra bacterias gram-positivas y negativas y es activo en las fases estacionaria y de crecimiento de la replicación bacteriana, pero dicho efecto también es dependiente de la concentración.^{3,4} Para muchas bacterias, el EPA se evidencia hasta que se han alcanzado concentraciones de 10 a 20 veces mayores que la CMI, por lo que en organismos con alta CMI, como *Pseudomonas aeruginosa*, es poco probable que se presente el EPA, debido a las concentraciones insuficientes, sobre todo en los tejidos. De cualquier manera, la exposición a una concentración menor que la CMI, puede hacer que la bacteria, aunque no sea muerta, sea más susceptible a ser fagocitada.⁶

Espectro de actividad:

La enrofloxacin tiene excelente actividad contra especies y cepas de:

En general, las FQ tienen excelente actividad contra Enterobacterias y diversos patógenos gram negativos, como *Klebsiella sp.*, *E. Coli*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Haemophilus*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia* y *Vibrio*.⁶; de buena a moderada actividad contra los géneros: *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* y *Pseudomonas*; y mínima o nula actividad contra *Streptococcus* (particularmente del grupo D), *Enterococcus* y bacterias anaerobias.³

Al parecer, las células en crecimiento (que sintetizan más ADN girasa) son más susceptibles al efecto bactericida de las FQ, por lo que el uso de fármacos que inhiban el crecimiento de los microorganismos (p. ej. inhibidores ribosomales) puede afectar la eficacia de las FQ.⁶ Debido a esto, es importante definir si el sitio de infección mantiene condiciones anaerobias, ya que muchas bacterias, diagnosticadas en cultivos aerobios, son en realidad facultativas.⁶

Las FQ son más activas contra gram negativos en ambientes alcalinos (pH > 7.4), pero contra gram positivos el pH no influye. La susceptibilidad no es afectada por el tamaño del inóculo, excepto quizá, en *Pseudomonas* y *Enterococcus*.^{2,3} Las FQ exhiben una curva bifásica de dosis-respuesta, dado que son menos activas a concentraciones, tanto menores, como mucho mayores que las CMI.³

Las CMI de la enrofloxacin para la mayoría de los microorganismos gram-negativos son, generalmente, menores de 0.25 $\mu\text{g/mL}$ y casi nunca exceden el 1 $\mu\text{g/mL}$, esto se considera una acción potente si se compara con las CMI de 4 a 8 $\mu\text{g/mL}$ y 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$ de la amikacina y gentamicina, respectivamente.⁷ El cuadro 1 indica diferentes CMI en distintos patógenos aislados de animales.

Resistencia:

La principal desventaja de las FQ es la tendencia a favorecer la selección de bacterias resistentes si no se utilizan en condiciones óptimas.²

La resistencia a las FQ puede constar de tres mecanismos, que son, en orden de importancia: 1) permeabilidad disminuida de la pared celular bacteriana por alteraciones en los poros hidrofílicos; 2) una bomba que transporta a la FQ hacia fuera de la bacteria a medida de que el fármaco se aproxima o pasa a través de la membrana, por ejemplo, en bacterias gram positivas existe un mecanismo de bombeo, mediado por la proteína TetA; y 3) mutaciones en las topoisomerasas II ó IV que alteran el sitio de unión de las FQ.^{2,3}

La resistencia es mediada principalmente por mutaciones cromosómicas poco frecuentes (10^{-7} a 10^{-10}) y aunque en quinolonas más antiguas se ha encontrado resistencia mediada por plásmidos, este no es el caso de las FQ; además, en general, no se observa resistencia cruzada con ningún grupo de antimicrobianos, excepto entre las mismas FQ, sin embargo, algunas mutaciones que confieren resistencia a las quinolonas, simultáneamente pueden hacerlo para las cefalosporinas, tetraciclinas y cloranfenicol. Otras mutaciones que ocasionan resistencia a las FQ pueden causar hipersusceptibilidad a β -lactámicos, aminoglucósidos y novobiocina.³

Cuadro 1. Actividad microbiológica (CMI₉₀) de la enrofloxacina en patógenos comunes aislados de animales.²

Organismo	CMI ₉₀ (intervalo) ($\mu\text{g/mL}$)	Núm. de aislamientos
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0.12 - 0.5	349
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.12 - 0.25	202
<i>Staphylococcus aureus</i> ^b	$\leq 0.06 - 0.125$	811
<i>Staphylococcus aureus</i> ^c	$\leq 0.06 - 1.0$	79
<i>Staphylococcus spp.</i> ^c	$\leq 0.06 - 0.5$	175
<i>Streptococcus spp.</i>	$\leq 0.06 - 1.0$	129
<i>Enterococcus spp.</i>	1.0 - 2.0	59
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0.5	104
<i>Escherichia coli</i>	0.03 - 0.125	529
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.06 - 0.12	104
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^d	0.25	--
<i>Proteus spp.</i>	0.12 - 0.5	147
<i>Pasteurella multocida</i>	$\leq 0.016 - 0.125$	434
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.0 - 8.0	246
<i>Manhemia (Pasteurella) haemolytica</i>	0.03 - 0.06	283
<i>Haemophilus somnus</i>	0.03 - 0.06	223
<i>Salmonella spp.</i>	0.06 - 0.125	276
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	0.06	108
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	0.5 - 1.0	127

Complementado con datos de:

b: De Oliveira⁸

c: Salmon⁹

d: Boothe⁶

La resistencia puede ocurrir como una secuencia de mutaciones y con esto se puede incrementar el nivel de resistencia, por ejemplo, se ha observado que cepas resistentes de *E. Coli* con CMI > 8

$\mu\text{g/mL}$ generalmente tienen tres mutaciones por lo menos. Se ha encontrado resistencia mediada por plásmidos en cepas de *E. Coli* y *Klebsiella sp.*, pero no se ha determinado la importancia clínica de esto.¹

La resistencia se reporta más frecuentemente para *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus spp* en infecciones crónicas o en exposiciones crónicas a bacterias.¹

Se han documentado resistencias en medicina humana en cepas de organismos como *E. Coli*, *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* y en animales de compañía en cepas de *Staphylococcus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter*, *Proteus* y otras bacterias gram-negativas. Los organismos del género *Pseudomonas* son particularmente problemáticos debido a que se encuentran resistencias notables con mutaciones de un solo paso y a que, aparte de las FQ, existen pocas alternativas terapéuticas por vía oral para tratar estas infecciones. Diversos autores sugieren que el uso continuo de enrofloxacin en animales destinados al consumo humano representa un riesgo en salud pública debido a que organismos resistentes de géneros como *Salmonella* y *Campylobacter* pueden ser pasados a los humanos a través de la cadena alimenticia. Debido a lo anterior, las aprobaciones para el uso de FQ en animales para abasto son escasas y en los Estados Unidos de América está prohibido el uso alterno al recomendado en las etiquetas de productos con FQ.¹

2.1.3 Farmacocinética

2.1.3.1 Generalidades

Las características generales de las fluoroquinolonas incluyen: absorción oral variable, pero, buena (excepto en rumiantes y caballos), absorción parenteral completa, buena distribución a los tejidos, volumen de distribución de 2 a 4 L/kg por vías parenterales, baja unión a proteínas plasmáticas, metabolismo hepático principalmente por oxidación y desalquilación, y mecanismos de conjugación (sobre todo glucorónica) que pueden ser predominantes dependiendo del fármaco y la especie animal; posible circulación enterohepática, excreción renal por filtrado glomerular y posiblemente por secreción tubular, vida media de eliminación de 2 a 4 h en bovinos. El posible ciclo enterohepático es causa de confusiones durante los cálculos farmacocinéticos que asumen una proporcionalidad de la dosis.^{3,10}

Las más altas concentraciones se logran en la bilis, riñones, hígado, pulmones, y aparato reproductor (incluyendo la próstata y el líquido prostático). También se logran concentraciones terapéuticas en huesos, líquido sinovial, piel, músculo, humor acuoso, y líquido pleural. Se ha demostrado que la enrofloxacin se concentra en el líquido intersticial, hueso y piel con valores de 35 a 100% en relación con la concentración en el suero; mientras que en las secreciones bronquiales y la próstata superan al suero por el doble o triple, asimismo en perros, las concentraciones en bilis y orina, exceden de 10 a 20 veces las del plasma.^{1,2,3}

En el líquido cefalorraquídeo tan solo se logran niveles del 6 al 10% de los encontrados en el plasma, mientras que otras FQ alcanzan hasta un 25%.^{4,6}

La enrofloxacin se detecta en la leche rápidamente y en altas cantidades después de su administración, esto se debe quizá a que el fármaco se une a las proteínas de la leche y esto funciona como un reservorio. En bovinos, en dosis de 5 mg/kg la concentración en la leche es similar a la del plasma, con una concentración plasmática máxima (Cpmax) de 1.3 a 2.5 $\mu\text{g/mL}$, pero la concentración de su metabolito ciprofloxacina excede dichos valores. Sin embargo, la enrofloxacin no es efectiva en el tratamiento de mastitis, debido probablemente a factores que disminuyan la actividad del antibacteriano, como la acidez del medio o la quelación, curiosamente,

está aprobado su uso parenteral en el tratamiento de la mastitis bovina en varios países europeos.^{1,8,11}

En becerros se han observado concentraciones de hasta tres veces las del suero en homogeneizados de tejidos a una hora de haberse administrado, y se mantuvieron por encima de la concentración sérica durante 12 horas. De acuerdo a las concentraciones de dichos homogeneizados, se puede establecer el siguiente orden: hígado \geq riñón > corazón > pulmón \geq bazo \geq pared intestinal > suero = músculo = linfonodos.³

Los parámetros farmacocinéticos de vida media y volumen de distribución son, más o menos, consistentes entre las diferentes especies de mamíferos. Las diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre las diferentes FQ no se han podido asumir como ventajas o desventajas clínicas.¹

En un estudio alométrico de la farmacocinética de la enrofloxacin entre especies, se encontró que la vida media de eliminación ($t_{1/2}$), el volumen de distribución en el estado estable ($V_{d(ss)}$) y la depuración sistémica (Cl) se asocian significativamente al peso corporal en el análisis entre diversas especies (mamíferos, aves, reptiles y peces), aunque la vida media analizada sólo en especies de mamíferos no tuvo esa asociación.¹⁰ En la literatura existen algunas discrepancias en los parámetros reportados y esto se puede deber a variaciones en las condiciones de los animales en que se realizaron los estudios, tales como: lactación, preñez, sexo, raza, edad, simultaneidad con la alimentación, etc.¹⁰ Se ha detectado que factores patológicos, como la fiebre o las endotoxinas pueden alterar las variables farmacocinéticas de la enrofloxacin, como es el caso de la vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$) y el Área Bajo la Curva (ABC), que se ven aumentadas, y la depuración (Cl), que se ve disminuida¹² en cabras, así como la marbofloxacin¹³, pero, en bovinos hay escasa información al respecto y es poco concluyente.¹⁴

Los pocos estudios que han analizado la administración subcutánea de enrofloxacin muestran una absorción casi completa. En algunos animales, se registró una absorción retardada, lo que produjo vidas medias más prolognadas en comparación con la vía IV, por ejemplo, en un estudio en bovinos, la vida media en la administración IV fue de 1.68 h y en la SC fue de 5.55 h, aún cuando la absorción fue extensa, en cuanto a cantidad.¹ El cuadro 2 muestra los parámetros farmacocinéticos obtenidos en distintos estudios en bovinos.

Cuadro 2 parámetros farmacocinéticos obtenidos en distintos estudios en bovinos.

Animales de estudio	de	Dosis estudiada (mg/kg)	$t_{1/2}$ (h)	Vd (area) (L/kg)	Cpmax ($\mu\text{g/mL}$)	ABC ($\mu\text{g.h/mL}$)	% F	Método
Becerros de día	1	2.5	6.61	1.70	Nd	13.94	Nd	HPLC
Becerros semana	1	2.5	4.87	2.61	Nd	6.73	Nd	HPLC
Vacas lactando		5.0	1.68 (IV) 5.9 (IM) 5.55 (SC)	1.63	0.73 (IM) 0.98 (SC)	7.42	82.0 (IM) 137.0 (SC)	HPLC
Vacas		2.5	2.82	2.98	Nd	5.28	Nd	HPLC
Bovinos adultos		5.0	2.3	1.65	0.73 (SC)	10.08	88.0 (SC)	HPLC
Bovinos ^b adultos		5.0	7.8 (SC)	Nd	0.7	8.4	Nd	HPLC
Bovinos adultos ^c		5.0	2.61	4.09	Nd	4.42	Nd	HPLC
Becerros		5.0	2.2	1.98	0.87 (SC)	7.99	97.0 (SC)	HPLC
Becerros ^b		5.0	3.6 (SC)	Nd	0.9	6.1	Nd	HPLC

$t_{1/2}$: Vida media de la fase terminal

Vd: volumen aparente de distribución, método de área

Cpmax: concentración plasmática máxima

ABC: área bajo la curva de concentración vs. Tiempo
% F: biodisponibilidad en porcentaje, en relación con la vía intravenosa
Nd: no determinado
IV: intravenosa
IM: intramuscular
SC: subcutánea
a: Adams¹
b: Prescott²
c: Varma¹⁵

Se sabe que las FQ pueden entrar a células fagocíticas y aún permanecer microbiológicamente activas.³ Las FQ logran grandes concentraciones en macrófagos y neutrófilos que pueden oscilar entre 4 y 10 veces mayores que la concentración plasmática. Dicha acumulación se debe probablemente a que las FQ son muy liposolubles y a la probable acción de mecanismos de transporte activo. Se dice que la alta concentración en los leucocitos podría contribuir al transporte del fármaco hacia tejidos infectados; en un estudio en perros con pioderma, se encontraron concentraciones de enrofloxacin en la piel afectada, significativamente mayores que en la piel sana de perros testigo.^{1,2}

En perros se ha visto que la enrofloxacin se concentra 10 veces más en los macrófagos alveolares que en el plasma, y que en dichas células puede llevarse a cabo una desalquilación que ocasiona una mayor acumulación de ciprofloxacina.¹⁶ En bovinos se ha observado una acumulación de FQ en polimorfonucleares de 4 veces más concentración que en el plasma, lo que se considera relativamente pobre si se compara con algunos macrólidos que superan hasta 20 veces la concentración plasmática,¹⁷ sin embargo, en el caso de los macrólidos se ha descrito una especie de secuestro del fármaco dentro de algunos organelos, mientras que las FQ se distribuyen en el citosol, donde son más disponibles para su efecto bactericida.¹⁶ Se ha sugerido que la enrofloxacin estimula el estallido respiratorio dentro de los polimorfonucleares.¹⁷

Por su capacidad para acumularse en fagocitos, el espectro antimicrobiano de la enrofloxacin se extiende a microorganismos intracelulares obligados de los géneros *Chlamydia*, *Rickettsia* y *Mycobacterium*, así como facultativos de los géneros *Salmonella* y *Mycoplasma*, además de *Staphylococcus aureus*.¹⁶

2.1.3.2 Parámetros farmacocinéticos para predecir la eficacia.

Hay evidencia que sugiere que concentraciones en el sitio de infección de 8 a 10 veces mayores que la CMI o cocientes ABC/CMI de 125 a 250, se asocian a una minimización del desarrollo de resistencia.^{1,3}

Dichos parámetros se basan en estudios *in vitro* o *in vivo* desarrollados en animales inmunosuprimidos o en estudios clínicos en seres humanos con enfermedades graves. Observaciones en medicina veterinaria revelan que generalmente se logra una buena proporción de curas sin haber satisfecho esos valores,¹ lo que puede estimular a pasar por alto la selección de resistencia.

2.1.3.3 Metabolismo.

El metabolismo de las FQ es variable, pero puede ser extenso. En general, en la fase I ocurre por hidroxilación y oxidación a oxoquinolonas. La enrofloxacin sufre N-desalquilación del grupo etilo del anillo de piperazina para formar ciprofloxacina. En bovinos se ha determinado que la proporción de ciprofloxacina en el plasma, después de la administración de enrofloxacin, llega a ser hasta del 25%,^{1,3} aunque hay un estudio que reporta la ABC de la ciprofloxacina en 83% con respecto a la enrofloxacin.¹⁵ Otro mecanismo es la oxidación del anillo de piperazina de la ciprofloxacina para formar oxociprofloxacina. Frecuentemente se lleva a cabo una glucuronidación,

principalmente en el ácido carboxílico en la posición 3. Los metabolitos oxidados siguen teniendo cierta actividad antibacteriana, mientras que los conjugados glucurónicos carecen de ella, por lo que, para el caso de la enrofloxacin, la ciprofloxacina es el único metabolito activo antibacteriano.^{1,3} En algunas ocasiones y en algunos tejidos, la concentración de ciprofloxacina es suficiente para ser terapéutica y, en esos casos, podría haber un efecto aditivo con la enrofloxacin.⁷

La presencia de la ciprofloxacina como metabolito activo puede causar errores de interpretación cuando se utilizan métodos microbiológicos de detección. Estudios en los que se comparó un método microbiológico con HPLC, demuestran que se puede sobreestimar el ABC hasta en un 70% y la C_{pmax} hasta 29 %¹

Hay autores que subrayan que en estudios farmacocinéticos de fases cruzadas es probable una interferencia debida a la posible inducción de sistemas metabólicos enzimáticos por la administración repetida de la enrofloxacin.¹⁸

2.1.3.4 Eliminación.

Tanto la enrofloxacin, como ciprofloxacina se eliminan por vía renal y no renal. Aproximadamente de 15 a 50% de estos fármacos se eliminan sin cambios en la orina.⁴ Los conjugados glucurónicos se pueden eliminar en la bilis o en la orina, dependiendo de la FQ y de la especie a la que se haya administrado. La enrofloxacin es eliminada principalmente en la orina. La eliminación renal es variable; en todas las FQ se realiza filtración glomerular y en menor grado secreción tubular, por el sistema de transporte de aniones orgánicos.^{1,3} Aunque se ha visto que el probenecid bloquea la secreción tubular de la ciprofloxacina,^{1,3} al parecer la administración simultánea de probenecid y enrofloxacin no altera las variables farmacocinéticas de la enrofloxacin o la ciprofloxacina.¹² Los pacientes con función renal severamente mermada pueden prolongar ligeramente la vida media y aumentar la concentración plasmática, sin que esto requiera de un ajuste de dosis.⁴

2.1.4 Usos terapéuticos.

La enrofloxacin es muy efectiva en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y puede ser útil en el tratamiento de neumonías y septicemias causadas por bacterias gram-negativas susceptibles (*E. Coli*, *Pasteurella* spp.), también para infecciones en la piel y tejidos blandos, incluso causadas por algunos gram-positivos aerobios. Las FQ son quizá los fármacos más efectivos en el tratamiento de prostatitis bacteriana crónica por gram-negativos. La enrofloxacin es efectiva en infecciones por *Mycoplasma* y, debido a su habilidad para penetrar a los fagocitos, es potencialmente valiosa para tratar infecciones por bacterias atípicas de los géneros: *Mycobacterium*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*; aunque hace falta mayor documentación al respecto en medicina veterinaria.²

Las FQ son muy activas cuando se prueban contra bacterias asociadas con la enfermedad respiratoria aguda en ganado bovino, como *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, en donde presentan CMI notablemente bajas. También tienen el potencial para ser eficaces contra gram-negativos que comúnmente causan enfermedades en estos animales, como *E. Coli* y *Salmonella* spp., pero, ya que las CMI son generalmente mayores, se requieren dosis más elevadas y mayores tiempos de retiro. Otras indicaciones podrían ser: metritis, conjuntivitis e infecciones por *Mycoplasma*, como neumonía u otitis media.

Para la enrofloxacin los parámetros de susceptibilidad son los siguientes: susceptible = $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ y resistente = $\geq 4 \mu\text{g/mL}$, los valores comprendidos entre 1.0 y 2 $\mu\text{g/mL}$ se categorizan como “flexibles”, en razón de que se puede considerar a un microorganismo como susceptible

siempre que se apliquen modificaciones a la posología, tal y como lo recomienda el folleto inserto en el producto comercial.¹

Las dosis recomendadas en el cuadro 2 se basan en lograr un cociente $C_{pmax} : C_{MI}$ de, por lo menos 8 a 10. Se sugiere que se elija la dosis de acuerdo con la relativa susceptibilidad de los microorganismos a tratar, por ejemplo, para infecciones por especies de *Pasteurella* se puede utilizar la dosis más pequeña, mientras que en infecciones por *P. aeruginosa* se recomienda escoger las dosis más altas que siguen siendo seguras.¹

Aunque los valores bajos de CMI señalan gran potencia *in vitro*, esto siempre se debe interpretar en relación con las concentraciones que se logran en el suero y en los tejidos. Hay autores que sugieren que en los empaques comerciales se deberían incluir datos farmacocinéticos (C_{pmax} , ABC) y valores de CMI de patógenos específicos; para optimizar el uso de estos fármacos y prolongar su utilidad.²

En los Estados Unidos de América el uso de la enrofloxacin en ganado bovino está aprobado para tratar la “enfermedad respiratoria bovina” que está asociada a la acción de *Haemophilus somnus*, *Mannheimia (Pasteurella) Haemolytica* y *P. multocida*. La dosificación es flexible dado que se recomiendan desde dosis únicas de 7.5 a 12.5 mg/kg, hasta dosis diarias de 2.5 a 5 mg/kg por tres días. El periodo de retiro es de 28 días y no está aprobado su uso en ganado lechero.^{1,4}

2.1.5 Toxicidad/seguridad.

La topoisomerasa II en las células de los mamíferos sólo se inhibe hasta concentraciones de 100 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ lo que prácticamente nunca ocurre en un tratamiento, mientras que las bacterias se inhiben a concentraciones de 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$.^{1,7}

La toxicidad de las FQ es ligera a dosis terapéuticas y, generalmente, consiste de disturbios gastrointestinales, como náusea, vómito y diarrea. A concentraciones ligeramente elevadas es posible observar mareo, cansancio, cefalea o somnolencia.³ Se considera que las FQ no alteran en gran medida la microbiota gastrointestinal incluso en su administración oral.¹ Altas concentraciones séricas pueden producir excitación del SNC, por una probablemente inhibición del GABA, que se manifiesta en convulsiones, defecación, micción y emesis. En animales en crecimiento pueden observarse artropatías erosivas no-inflamatorias, quizá debido a la quelación con magnesio que inhibe la correcta formación de matriz cartilaginosa, siendo las ratas y perros las especies más susceptibles. Por esa razón, no se recomienda su administración en hembras gestantes, a menos que el beneficio sobrepase el riesgo.⁴ Esporádicamente se observa fotosensibilización con todas las FQ.³ En gatos se han observado cambios en la retina que pueden conducir a la ceguera. En seres humanos se han reportado tendinitis y ruptura de tendones.¹

En el caso de madres en lactación tratadas con FQ se debe considerar la posible toxicidad en animales alimentados de su leche, aunque algunos autores le restan gravedad a este tema. Debido a que las FQ son liposolubles y presentan baja unión a proteínas plasmáticas, existe una considerable difusión hacia la placenta, empero, no se han reportados efectos adversos en animales en gestación.¹

Se ha asociado una inflamación intersticial en las paredes tubulares renales con la precipitación de complejos de FQ. Otras toxicidades renales poco comunes incluyen: cristaluria, que puede producir uropatía obstructiva; y nefritis intersticial, que puede causar insuficiencia renal aguda,¹ por lo que se debe procurar una buena hidratación de los animales que reciban enrofloxacin.⁴

2.1.6 Residuos.

El límite máximo de residuos para enro en la unión europea es de 30 ng/g para riñón, hígado y músculo en cerdos, pollos y ganado vacuno y se calcula con la suma de residuos de enrofloxacin y ciprofloxacina, su principal metabolito.³

2.1.7 Interacciones.

2.1.7.1 Interacciones en general

Las interacciones de las FQ no son graves. Su absorción oral se ve disminuida drásticamente por antiácidos que contienen aluminio o magnesio y por sucralfato. La ranitidina disminuye la biodisponibilidad de algunas fluroquinolonas, probablemente porque el pH del contenido gástrico influye en la disolución. La enrofloxacin disminuye la depuración hepática e incrementa la vida media

de la teofilina y cafeína.³ Las FQ pueden exacerbar la nefrotoxicidad de la ciclosporina de uso sistémico. Ya que las FQ son relativamente de reciente uso, se espera que nuevas interacciones farmacológicas se descubran en el futuro.⁴ En relación al metabolismo, en un contexto veterinario, se podrían anticipar interacciones adversas con barbitúricos, cloranfenicol, ionóforos y rifampicina.²

2.1.7.2 Interacciones con antimicrobianos.

Algunos autores afirman que generalmente las combinaciones con otros antimicrobianos ni aumentan ni inhiben la acción de las FQ, incluso los bacteriostáticos. Entre los pocos reportes documentados se incluyen: sinergismo con beta-lactámicos contra *Staphylococcus aureus*, asociadas con beta-lactámicos o amikacina contra *Pseudomonas aeruginosa*,² antagonismo contra *Streptococcus* y *Enterococcus* en asociación con macrólidos o tetraciclinas, y antagonismo en todo caso asociado con el cloranfenicol;¹ de hecho, hay autores que no recomiendan su combinación en ningún caso con fármacos bacteriostáticos.⁷ Puede ocurrir sinergismo, aunque no predecible, contra algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, u otras Enterobacterias, en la combinación de enrofloxacin y aminoglucósidos, cefalosporinas de tercera generación y penicilinas de espectro extendido.⁴ En casos en que no se han documentado efectos sinérgicos con otros antimicrobianos, quizá podría existir un efecto aditivo, así como una ampliación del espectro de actividad.¹

Las indicaciones para administrar FQ en combinación con otros antibacterianos, pueden ser: a) infecciones polimicrobianas por anaerobios u otras bacterias resistentes a las FQ; b) para aumentar la eficacia en condiciones especiales, como enfermedades graves o infecciones en tejidos difíciles de penetrar; c) para prevenir la toxicidad de los fármacos usados; d) para reducir el riesgo de selección de resistencia. Sin embargo, se recomienda que las dosis utilizadas sean las mismas que se utilizan de manera independiente.⁶

2.2 ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA

2.2.1 Aspectos Teóricos:

Los estudios de bioequivalencia han tenido gran auge en México en los últimos años, y más aún, a partir de la emisión de la norma oficial mexicana (NOM) de emergencia publicada el 19 de marzo de 1998, complementada por la NOM del 26 de marzo del mismo año, que tiene como propósito establecer los medicamentos sujetos a bioequivalencia y los requisitos para operar como terceros autorizados para realizar pruebas de bioequivalencia en medicamentos de uso humano.¹⁹

La administración de alimentos y medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) estadounidense, en sus guías para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, establece que la

bioequivalencia es la ausencia de diferencia significativa en la velocidad y la cantidad a la que la sustancia activa, en productos equivalentes farmacéuticos, queda disponible en su sitio de acción, cuando son administrados a la misma dosis molar bajo condiciones similares en un estudio diseñado apropiadamente.²⁰ También se puede considerar a un producto como bioequivalente, en relación a un innovador, si la diferencia en la velocidad de absorción es intencional y no hay una diferencia significativa en la cantidad absorbida en los dos productos, cuando son administrados a la misma dosis molar bajo condiciones similares.²⁰

Para comprender lo que implica el término bioequivalencia, es necesario entender lo que es la biodisponibilidad; ésta se expresa en porcentaje, o bien en forma de cociente de la relación ABC_1/ABC_2 , siendo 1 un parámetro inferido en un ensayo de administración por vía IV y 2 en un estudio por cualquier vía extravascular; de manera que es una medida de la cantidad relativa de fármaco inalterado que llega a la circulación sistémica, así como de la velocidad a la cual esto ocurre. Por lo anterior, los estudios de biodisponibilidad determinan las propiedades de absorción y compararán la eficiencia de liberación de formas farmacéuticas a la liberación sistémica, así como de la vía de administración. Los factores que influyen en la biodisponibilidad son:

- Forma farmacéutica (inmediata o lenta).
- Vía de administración.
- Disolución de la forma farmacéutica y solubilidad del fármaco.
- Presencia de alimentos/fármacos u otras sustancias en el tracto gastrointestinal y la estabilidad del fármaco (administración enteral).
- Metabolismo del fármaco antes de alcanzar la circulación sistémica

Cuando se comparan ABC de ensayos de administración por la misma vía, siendo ésta extravascular, se suele llamar “estudio de biodisponibilidad relativa” y principalmente se determina el efecto de las diferencias de la formulación sobre la absorción del fármaco.

Cuando se habla de bioequivalencia se refiere a un estudio de biodisponibilidad comparativa en la cual se evalúa la eficiencia de absorción de productos equivalentes farmacéuticos: misma dosis, misma forma farmacéutica y misma sal; lo cual constituye el sustento de los medicamentos genéricos intercambiables. Si dos o más productos son bioequivalentes entre sí, deberían ser terapéuticamente equivalentes y pueden ser intercambiados por los profesionales del sector salud en su ejercicio profesional.^{19,22}

La importancia de los estudios de bioequivalencia para la aprobación de medicamentos genéricos estriba en que estos pueden diferir en forma, configuración, empaque, excipientes, y materia prima, que a su vez puede tener diferencias en el proceso de síntesis, tamaño de partícula, entre otros factores que en conjunto inciden en la liberación y absorción del fármaco.²²

Aunado a esto, existe una tendencia internacional para la armonización de estándares regulatorios que incidan en el proceso de aprobación de los fármacos, como es el caso de los estudios de bioequivalencia.²²

Actualmente, los temas principales en los que existe controversia científica relacionada con estos estudios, se pueden dividir en 10 categorías que son: 1) diseño del estudio, 2) metodología, 3) parámetros apropiados, 4) definición de rangos de bioequivalencia aceptables, 5) consideraciones estadísticas, 6) métodos en productos cuya absorción es muy variable, 7) estereoisomerismo, 8) fármacos con estrecho margen terapéutico, 9) fármacos de liberación controlada y 10) utilidad de los estudios *in vitro*.

2.2.2 Diseño de los estudios

Las aproximaciones estadísticas tradicionales se diseñan para probar la hipótesis nula de igualdad, sin embargo, en el contexto de la bioequivalencia esto tiene desventajas, porque además de que es importante que en un estudio se utilice un tamaño de muestra adecuado y la conducción sea la apropiada para encontrar diferencias importantes, asimismo la detección de pequeñas diferencias puede carecer de importancia clínica. Actualmente se acepta que la hipótesis nula sea que los productos no son bioequivalentes (H_0 = bioinequivalencia) y que la hipótesis alternativa sea que los productos son bioequivalentes (H_1 = bioequivalencia). De esta manera, rechazando la hipótesis nula, en un nivel nominal del 5%, limita la probabilidad de error de tipo I (aceptar un producto como bioequivalente, cuando no lo es) y así limita el riesgo de los pacientes.

La mayoría de los estudios de bioequivalencia utilizan un diseño cruzado, porque generalmente existe gran variabilidad en la depuración entre individuos y normalmente la variación intra-individuo es menor. Sin embargo, los estudios paralelos (no cruzados) son apropiados si la vida media de eliminación de los fármacos es muy larga, si es muy difícil obtener perfiles farmacocinéticos, o si hay efectos farmacodinámicos residuales relevantes. En general, para la mayoría de los fármacos estudiados en seres humanos, los estudios son cruzados, a una sola dosis y en condiciones de ayuno.²¹

2.2.3 Metodología de los estudios

El tamaño de la muestra se puede estimar utilizando ecuaciones estándar que toman en cuenta α , β y la variabilidad. Los investigadores pueden realizar pruebas piloto para estimar la variabilidad, o bien, pueden apoyarse de datos en la literatura. Se ha llegado al consenso de que los estudios se deben realizar en sujetos sanos y bajo condiciones lo más posiblemente controladas, en cuanto a condiciones fisiológicas o de factores externos. Se recomienda que el muestreo se extienda hasta, por lo menos, tres veces la vida media de eliminación, en productos de liberación inmediata.²¹

2.2.4 Definición de los rangos de bioequivalencia

Para que se concluya que dos productos son bioequivalentes se requiere que el intervalo de confianza de 90% para el coeficiente (porcentaje) de la razón genérico/innovador, caiga dentro del intervalo de bioequivalencia de 0.80 a 1.25 (80% a 125%) basado en datos de transformación logarítmica de ABC y C_{pmax} . Es importante señalar que este intervalo es aceptado por autoridades estadounidenses, europeas y canadienses.²¹ La Secretaría de Salud en México establece un intervalo de 0.80 a 1.20 (80% a 120%) para datos crudos y de 0.80 a 1.25 (80% a 125%) para datos de transformación logarítmica.²³

3 JUSTIFICACIÓN:

Para demostrar la intercambiabilidad de dos medicamentos, se realizan estudios de bioequivalencia, los cuales describen la absorción del fármaco, en cuanto a cantidad y velocidad. Estos parámetros deben mostrar similitud dentro de ciertos criterios, y esto constituye la base científica más útil para



predecir la eficacia y la seguridad de un nuevo medicamento que, a su vez, ofrece más certeza al Veterinario en la terapéutica.

4 OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar la bioequivalencia de enrofloxacin en solución inyectable vía subcutánea (s.c.) en dosis única de dos formulaciones experimentales (o de prueba) en comparación con los productos innovadores (o de referencia), en bovinos adultos sanos.

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

4.2.1 Estimar los parámetros farmacocinéticos determinantes de bioequivalencia en bovinos adultos sanos de la enrofloxacin de formulaciones experimentales: “Prueba A” en dosis de 5 mg/kg y “Prueba B” en dosis de 5 mg/kg y 7.5 mg/kg.

4.2.2 Determinar la seguridad de los medicamentos, desde su aplicación, hasta las 120 horas posteriores.

5 HIPÓTESIS:

5.1 H_0 : Las formulaciones de enrofloxacin Prueba A y Prueba B no son bioequivalentes a los productos de referencia.

5.2 H_1 : Las formulaciones de enrofloxacin Prueba A y Prueba B son bioequivalentes a los productos de referencia.

6 MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio se realizó de acuerdo con las guías VICH GL9 de la FDA de Buenas Practicas Clínicas para la conducción de pruebas clínicas de productos veterinarios medicinales.

6.1 CALENDARIO:



predecir la eficacia y la seguridad de un nuevo medicamento que, a su vez, ofrece más certeza al Veterinario en la terapéutica.

4 OBJETIVOS:

4.1 OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar la bioequivalencia de enrofloxacin en solución inyectable vía subcutánea (s.c.) en dosis única de dos formulaciones experimentales (o de prueba) en comparación con los productos innovadores (o de referencia), en bovinos adultos sanos.

4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:

4.2.1 Estimar los parámetros farmacocinéticos determinantes de bioequivalencia en bovinos adultos sanos de la enrofloxacin de formulaciones experimentales: “Prueba A” en dosis de 5 mg/kg y “Prueba B” en dosis de 5 mg/kg y 7.5 mg/kg.

4.2.2 Determinar la seguridad de los medicamentos, desde su aplicación, hasta las 120 horas posteriores.

5 HIPÓTESIS:

5.1 H_0 : Las formulaciones de enrofloxacin Prueba A y Prueba B no son bioequivalentes a los productos de referencia.

5.2 H_1 : Las formulaciones de enrofloxacin Prueba A y Prueba B son bioequivalentes a los productos de referencia.

6 MATERIAL Y MÉTODOS:

Este estudio se realizó de acuerdo con las guías VICH GL9 de la FDA de Buenas Practicas Clínicas para la conducción de pruebas clínicas de productos veterinarios medicinales.

6.1 CALENDARIO:



6.1.1 Lugar y fecha de realización.

Este estudio se ejecutó en el Rancho CEPIPSA propiedad de la FMVZ-UNAM localizado en Topilejo Distrito Federal, México.

La fase animal del estudio se realizó entre el 29 de enero de 2003 (día - 7) y el 11 de marzo de 2003 (día 34).

6.1.2 Calendario de eventos (véase el cuadro 3)

Todos los grupos fueron clínicamente inspeccionados del Día - 7 al Día 34. Personal veterinario supervisó la prueba durante los días del muestreo. Para el caso de reacciones adversas en el sitio de la inyección se estuvo preparado para la toma de fotografías y para el llenado de la hoja de reacciones adversas (Forma 1).

Cuadro 3. CALENDARIO DE ESTUDIO

Fecha	Día de Estudio	Horas de Estudio	Aclimatación	Registro de Salud	Examen Físico	Peso	Elegibilidad	Tratamiento	Asignación de grupos	Tiempo de Espera	Muestras de Sangre
SECUENCIA 1											
29/ene/03	Día -7		•	•	•	•					
4/feb/03	-1	-24	•	•	•	•	•		•		
5/feb/03	0	0		•	•			•			•
5/feb/03		1									•
5/feb/03		1.5									•
5/feb /03		2									•
5/feb /03		3									•
5/feb/03		4									•
5/feb/03		6									•
5/feb/03		9									•
5/feb/03		12									•
5/feb/03		18									•
5/feb/03		24		•	•						•
6/feb/03	1	36									•
7/feb/03	2	48		•	•						•
8/feb/03	3	72		•	•						•
9/feb/03	4	96		•	•						•
10/feb/03	5	120									•
11/feb/03 al 4/mar/03	6 al 27									•	

Cuadro 5, Grupos SECUENCIA 2

Secuencia 2	Núm. de Animales	TRATAMIENTO			
		Producto de prueba	Vía	Dosis	Régimen
Grupo A	6	Referencia B	SC	5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/20 kg.
Grupo B	6	Referencia A	SC	5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/20 kg.
Grupo C	6	Referencia B	SC	7.5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/13.33 kg.
Grupo D	6	Prueba A	SC	5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/20 kg.
Grupo E	6	Prueba B	SC	5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/20 kg.
Grupo F	6	Prueba B	SC	7.5 mg/kg	Dosis simple 1 mL/13.33 kg.

6.2.2 Fase experimental:

Se condujo como ensayo de campo controlado en forma aleatoria y cruzado con dos fases.

6.2.3 Procedimientos de asignación aleatoria:

6.2.3.1 Asignación de animales a grupos del tratamiento:

Para la formación de los grupos, los 36 animales se distribuyeron al azar utilizando una tabla de números aleatorios en 6 grupos de 6 animales cada uno. Estos grupos se sortearon para el grupo de tratamiento y el grupo control.

6.2.3.2 Asignación de tratamiento a los grupos experimentales:

Éste fue de acuerdo con la formación de los grupos de manera aleatoria.

De acuerdo a la selección de grupos se indicó la correspondencia entre el número del animal y el producto a administrar (Forma 3).

6.3 PROCEDIMIENTOS DE ESTUDIO:

6.3.1 Animales de Prueba:

- Especie: Bos taurus

- Raza: Holstein
- Estado Fisiológico: Animales adultos sanos.
- Número de animales: 36

6.3.1.1 Fuente de animales: Los animales que integraron el estudio son propiedad del rancho CEPIPSA de la UNAM.

6.3.1.2 Método de la Identificación: Los animales fueron identificados por medio de aretes numerados y collares de plástico colocados antes del inicio del estudio.

6.3.2 Criterios de Inclusión:

- Animales clínicamente sanos, en buen estado corporal, machos y hembras.
- Animales de dos a seis años de edad.
- Animales que no tenían historia de haber sido medicados con quinolonas.
- Animales que no tenían historia de enfermedades de tipo recurrente.
- El peso inicial de los animales debió de ser entre 200 y 600 kg de peso.

6.3.3 Criterios de Exclusión:

- Animales con historia de haber sido medicados 28 días antes del inicio del estudio con quinolonas.
- Animales que se les haya administrado cualquier tipo de quimioterapia 56 días antes de iniciar el estudio.
- Hembras gestantes, o en etapa de lactación.

6.3.4 Periodo de Aclimatación en los Animales de Prueba:

6.3.4.1 Duración:

Los animales tuvieron un periodo de aclimatación del día -7 al día -1 antes del inicio de la prueba.

6.3.4.2 Medicación y/ o vacunación durante período de la aclimatación:

Los animales exclusivamente pudieron ser vacunados hasta 7 días antes del inicio de la prueba.

Los animales no recibieron ningún tipo de medicación durante la prueba.

6.3.4.3 Datos coleccionados de importancia antes de comenzar el estudio:

- Documentos de cada animal.
- Número de identificación y grupo.



6.3.5 Registro de personal y limitación de la información:

6.3.5.1 Se anotó la firma real e iniciales de todo el personal del sitio de investigación que participó en este estudio (forma 4).

6.3.5.2 Exento de limitación de información. No existió limitación de información a los participantes del estudio.

6.3.5.3 Método y procedimientos a ciegas:

Sólo aplicó en el caso del personal que analizó las muestras por el método microbiológico de detección. Se pusieron a disposición las muestras marcadas con un código al que el laboratorista no tuvo acceso.

6.4 REGISTRO DE PRODUCTO:

Se detalló toda la información descriptiva y de identificación de los productos a utilizar en la investigación en la forma 5, así como el inventario diario en la forma 6.

6.5 MÉTODO ANALÍTICO PRIMARIO:

Por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés):

6.5.1 Describe la medida analítica que se hace y se mencionan los objetivos protocolares.

La concentración de enrofloxacin en el plasma fue medida por el siguiente método:

6.5.1.1 Reactivos:

- Trietilamina
- Acido fosfórico
- Agua grado HPLC obtenida después de la purificación con sistema Mili-Q.
- Acetonitrilo grado HPLC.

Estándar:

- Se utilizó estándar de referencia de enrofloxacin y ciprofloxacina USP.

6.5.1.2 Soluciones:

- Solución de Referencia Madre de Enrofloxacin: Transferir a un matraz volumétrico de 50 mL, una cantidad exactamente pesada de estándar de referencia (W_1) equivalente a alrededor de $(0.025 \times 100/V)$ g de enrofloxacin, disolver con 25 mL de metanol con la ayuda de ultrasonido y llevar a volumen con agua grado HPLC.

- Soluciones estándares para la curva de calibración: Diluir las soluciones madre de enrofloxacin para obtener concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en una mezcla agua conteniendo 6.7% de Metanol/Ácido clorhídrico (98/2 v/v).
- Soluciones de plasmas cargados con estándares: Diluir las soluciones madre de enrofloxacin para obtener concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ en grado HPLC en plasma bovino completamente libre de enrofloxacin.
- Solución de Muestra: Por extracción en fase sólida (SPE), utilizar cartuchos de extracción Sep-Pak C18 (100 mg). Activar los cartuchos antes de su uso con 2 mL de metanol y posteriormente 2 mL de agua HPLC. Descongelar las muestras de plasma a temperatura ambiente y centrifugar durante 5 minutos. Transferir 0.5 mL del sobrenadante al cartucho de separación y pasar 0.5 mL de agua seguidos de 0.5 mL de acetonitrilo, eluir los compuestos de interés con 0.1 mL de una solución al 2% de ácido clorhídrico en metanol seguido por 1.4 mL de agua. Transferir la mezcla de los eluatos (1.5 mL) a viales para inyección en el cromatógrafo de líquidos.

6.5.1.3 Equipo:

- Sistema de bombeo Marca Hewlett Packard 1100 Núm. De Serie DE1606222.
- Automuestreador Marca Hewlett Packard 1100 Núm. De Serie DE91608113.
- Detector de arreglo de diodos (DAD) marca Hewlett Packard 1100 Núm. de Serie DE91605829.
- Sistema de integración HP Chemstation.
-

6.5.1.4 Columna Lichrospher 100 RP-18 (LichroCART Núm. de parte 799250D) 125 mm de longitud, 4 mm de diámetro interno, 5 μm de tamaño de partícula.

6.5.1.5 Procedimiento:

6.5.1.6 Inyectar 6 veces la preparación de referencia y verificar la repetibilidad de la respuesta. La desviación estándar relativa para las seis inyecciones deberá ser menor de 2%. Calcular el factor de simetría para el pico de Enrofloxacin.



6.5.1.7 Condiciones del HPLC:

- Fase Móvil:

SOLVENTE A: Mezcla 1:1 trietilamina 0.008M/Acido fosfórico 0.02M.

SOLVENTE B: Acetonitrilo.

Programar el siguiente gradiente:

Al inicio del gradiente pasar una mezcla 90:10 solvente A: Solvente B cambiar linealmente las proporciones de tal manera que al minuto 9 se alcance una proporción 69:31 Solvente A : Solvente B, mantener esta proporción durante 2 minutos y en un lapso de 0.5 minutos regresar a la proporción inicial mantener esta proporción por 3.5 minutos. El tiempo total de corrida es de 15 minutos.

- Velocidad de flujo: 1 mL/min.
- Longitud de onda de detección: 277 nm.
- Volumen de inyección: 100 μ l
- Tiempo de retención: Enrofloxacin 9 minutos y 10 minutos para ciprofloxacina aproximadamente.

6.5.2 Limite de Cuantificación:

El límite de detección es la concentración más baja a la cual se puede cuantificar el analito con certeza estadística, también suele llamarse “sensibilidad de la prueba”.

Al determinar el coeficiente señal-ruido comparando señales medibles de la muestra a concentraciones bajas del analito contra muestras blanco (plasma bovino, obtenido antes del estudio), se estableció que la concentración mínima a la cual el analito puede ser cuantificado con certeza es de 3 ng. El criterio de aceptación fue: un coeficiente señal/ruido mínimo de 10.

6.5.3 Referencias:

Manceau J, Gicquel M, Laurentie M, Sanders P. Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in animal biological fluids by high-performance liquid chromatography. Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999 Apr 16;726(1-2):175-84.

6.5.4 Especificación del plan analítico utilizado en el protocolo:

Las muestras se procesaron por medio de Cromatografía Líquida de Alta resolución (“HPLC” por sus siglas en Inglés), según la metodología validada por el laboratorio patrocinador.

6.5.4.1 Resumen del método:

El método analítico es un método por cromatografía en fase reversa con fase estacionario Lichrospher100 RP 18 de 12.5 cm por 4.0 mm, se utilizó como fase móvil una mezcla 1:1 (v/v) de Acido fosfórico 0.02 M:Trietanolamina 0.008 M y Acetonitrilo grado HPLC. El cromatógrafo se programó en un sistema de gradiente a una velocidad de flujo de 1 mL por minuto. La detección se realizó en el ultravioleta a una longitud de onda de 277 nm.

Previo al tratamiento de las muestras, éstas se centrifugaron durante 5 minutos a una velocidad de 2500 rpm. El tratamiento de las muestras de plasma se realizó utilizando extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos C18. Las curvas de calibración se prepararon el día de análisis, a partir de seis estándares en duplicado; se calcularon mediante análisis de regresión lineal por cuadrados mínimos. Las muestras se inyectaron al cromatógrafo en volumen de 100 µL. Las concentraciones de las muestras se obtuvieron interpolando las respuesta en la gráfica de la curva estándar utilizando la ecuación $y = mx + b$.

6.6 MÉTODO ANALÍTICO COMPLEMENTARIO:

6.6.1 Procesamiento de las muestras.

El procesamiento de los sueros se llevó a cabo mediante el método microbiológico de Bennet *et al.*,²⁴ que según Sumano *et al.*²⁵ es tan sensible como el uso de HPLC.

6.6.2 Método de Bennet et al.

Se preparó agar MacConkey (Bioxon)^a a razón de 50g/l., siguiendo las indicaciones que marca el producto.

6.6.3 Cultivo bacteriano.

Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (Colección de Cultivos de Tipo Americano, por sus siglas en inglés) 25922 de *Escherichia coli*.

6.6.4 Estándar bacteriano.

En un tubo de tapón de rosca se colocan 5 mL de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (resembrado 12 - 18 horas antes) de *Escherichia coli.*, por medio de los estándares de Mc

^a Becton Dickinson de México, SA de CV.

Farland^b se realizan los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland.

La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtiene por medio de un espectrofotómetro a una transmitancia del 60-65%, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^9 .

6.6.5 Preparación de las placas.

En un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, se colocan 300 mL de agar y se deja enfriar durante 10 minutos. Sobre el agar ya frío se colocaran 400 µl de la suspensión bacteriana y por medio de un hisopo estéril se distribuye homogéneamente sobre toda la placa.

6.6.6 Preparación de las diluciones.

Se pesan 20 g de estándar de enrofloxacin (98% de pureza), se colocan en un matraz y se afora a 100 mL con agua desionizada (para su disolución es necesario agregar 0.5 mL de una solución de 0.1 N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Se marcan 10 tubos de 5 mL del 1 al 10 y uno de 15 mililitros con el número 0, en el tubo numerado con el 0 se coloca 9 mL de agua desionizada y en los demás tubos se coloca 1 mL. Del matraz se toma 1 mL y se agrega en el tubo 0 se homogeneiza y de éste se toma 1 mL y se pasa al tubo 1 se homogeneiza, se toma 1 mL y se pasa al tubo 2 y así sucesivamente hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las diluciones descritas en el cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración de enrofloxacin en las diluciones preparadas para el método de análisis microbiológico.

No	Concentración (µg/mL)
Matraz	200
Tubo 0	20
Tubo 1	10
Tubo 2	5
Tubo 3	2.5
Tubo 4	1.25
Tubo 5	0.625
Tubo 6	0.3125
Tubo 7	0.15625
Tubo 8	0.078125
Tubo 9	0.0390625
Tubo 10	0.01953125

^b BioMérieux

6.6.7 Lectura de las placas.

Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocados se realizan a lo largo del refractario dos hileras de 10 pozos cada una. Colocando en cada pozo 100 μ l de cada una de las diluciones, realizándose por duplicado. Se elaboran 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 10 lecturas, se incuban durante 12 horas a 37 °C.

Una vez transcurridas de 12 - 18 horas, se efectúan las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo, por placa y por dilución.

6.6.8 Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición.

Se obtienen medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones, a partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin^c y Excel^d, se obtienen las gráficas en milímetros de halo de inhibición vs concentración con su respectiva regresión lineal.

6.6.9 Procesamiento de las muestras.

Se preparan las placas con la misma concentración bacteriana y del mismo modo en que se prepararon las placas para obtener el estándar, se preparan los pozos en la misma forma que los anteriores y en una misma placa se siembran 2 grupos EC y dos E, colocándose 100 μ l de muestra de plasma por pozo por tiempo, se incuban durante 12 a 18 horas y se realizan las lecturas de los milímetros de halos de inhibición, esto se repetirá 5 veces para cada uno de los 16 muestreos por tiempo por grupo.

6.6.10 Procesamiento de los resultados.

De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se extrapolaron en la gráfica de concentración vs halo de inhibición obteniéndose así la concentración de enrofloxacin en μ g/mL de cada una de las muestras de suero. Los valores obtenidos en μ g/mL se procesaron con el programa pKanalist para obtener los siguientes valores farmacocinéticos de los dos grupos: $T_{1/2\beta}$ (vida media de la fase de eliminación) C_{pmax} (Concentración plasmática máxima) T_{max} (tiempo al que se alcanza la C_{pmax}) y ABC (área bajo la curva).

^c Microcal Origin versión 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.



6.7 Instalaciones para el estudio.

El rancho contaba con corrales divididos en pasillo de alimentación y echaderos en sombra, en forma de cubículos de acceso libre. Además existe una manga de manejo que contiene una báscula electrónica en su transcurso y desemboca en dos prensas de manejo para facilitar la manipulación de los animales.

6.8 Dieta:

6.8.1 Formulación de la dieta:

6.8.1.1.1 Alimento principal:

- Heno de avena.
- Ensilado de maíz.

6.8.1.1.2 Premezclas de Vitaminas

6.8.1.1.3 Premezcla de minerales (generalmente , cada dos o tres semanas, dependiendo de los perfiles bioquímicos en muestreos representativos).

6.9 Administración de los medicamentos:

6.9.1 Régimen de dosificación (dosis, frecuencia, y duración).

La administración fue a un solo tiempo por fase. De acuerdo a los diferentes grupos la dosis fue de 5 mg/kg de peso ó de 7.5 mg/kg de peso.

6.9.2 Vía de administración.

Subcutánea en la parte lateral derecha del cuello.

6.9.3 Período de retiro (Grupo de referencia).

Se recomienda un periodo de retiro de 28 días de productos cárnicos.⁴

6.9.4 Período de retiro propuesto (Grupo de prueba).

Igual que el producto de referencia: 28 días.

^d Microsoft Excel. 1985-2003

6.10 Remoción de sujetos del estudio:

6.10.1 Criterios de remoción de un sujeto del estudio: (Forma 7)

Cualquier animal podía ser eliminado del estudio si se determinaba que:

- 1) No cumplía con los criterios de la inclusión.
- 2) No había cooperación con procedimientos del estudio.
- 3) Si se encontraba alguna reacción adversa seria, lesión, o enfermedad.
- 4) Si moría espontáneamente o se le aplicaba eutanasia.

6.10.2 Procedimientos para la remoción de un sujeto del estudio:

A la discreción del director del estudio y monitor del estudio, se eliminaría algún animal del estudio si cualquiera de los criterios de la Forma 7 aplicaba.

6.10.3 Destino de animales removidos del estudio:

La disposición de cualquier animal removido del estudio fue de acuerdo al sitio de investigación ya que podían ser retenidos para otra investigación, o vendidos.

6.11 Concurrencias/medicaciones concomitantes/terapias:

No aplicaban durante el estudio.

6.12 Manejo general:

Se proporcionó la dieta básica de un alimento comercial no medicado disponible para el mantenimiento. La ración no se ajustó durante el estudio, excepto durante la manipulación intermitente individual y el encierro que ocurría durante los procedimientos del estudio; se proporcionó alimento una vez al día *Ad libitum* para el mantenimiento de peso y condición corporales durante todo el estudio.

Los animales tuvieron un periodo de espera del alimento de 6 horas antes del tratamiento y 3 horas después del tratamiento; y agua una hora antes y una hora después del tratamiento. (Forma 8).

6.13 Necropsia y disposición de sujetos muertos: (forma 9)



La rutina del examen post mórtem se realizaría en cualquier animal participante del estudio que muriera espontáneamente o que se le aplicase eutanasia en la realización del estudio. La necropsia incluiría un examen completo de tejidos con cambios patológicos. (Forma 9).

6.14 Especificación de variables:

6.14.1 Exámenes físicos

6.14.1.1 Examen general

Se realizó un examen físico general para determinar la salud general de los animales en el día -1 realizado con base en los puntos incluidos en la Forma 10.

6.14.2 Análisis de Enrofloxacin en el plasma:

6.14.2.1 Colección de muestras y proceso:

Se coleccionaron las muestras de sangre (Forma 11) para el análisis in vitro y cuantificación de enrofloxacin.

Las muestras de sangre fueron colectadas de cada animal según el calendario de eventos establecido:

Antes del tratamiento:

Día - 7 (29/ene/03).

SECUENCIA 1:

Horas después de tratamiento:

Día 0: 1,1.5, 2, 3, 4, 6,9,12,18 y 24 horas (5-6/feb/03), día 1: 36 horas (6/feb/03) día 2: 48 horas (7/feb/03), día 3: 72 horas (8/feb/03), día 4: 96 horas (9/feb/03), día 5: 120 horas (10/feb/03).

SECUENCIA 2:

Horas después de tratamiento:

Día 29 a 1, 1.5, 2, 3, 4, 6,9,12,18 y 24horas (6-7/mar/023), día 30 a 36 horas (7/mar/03) día 31: 48 horas (8/mar/03), día 32: 72 horas (9/mar/03), día 33: 96 horas (10/mar/03), día 34: 120 horas (11/mar/03).

Para cada animal, se colectó un volumen suficiente de sangre, en dos tubos con heparina de 10 mL de capacidad, para obtener por lo menos 5 mL de plasma en cada tubo; se colectó por punción en la vena yugular.



El proceso de cada muestra de sangre incluyó la centrifugación (1500 r.p.m. durante 10 minutos) y separación del plasma para ser transferido a tubos de polipropileno (viales resistentes a la congelación) bien identificados, y el plasma de cada muestra se guardó por duplicado. El proceso de separación se ejecutó antes de transcurridas 2 horas después de la colecta de sangre; mientras que la congelación del plasma a -20°C podía hacerse hasta 6 horas después, siempre que se hubiera conservado en un ambiente con temperatura menor a 30°C .

6.14.3 Identificación, almacenamiento y transporte de la muestra:

Durante el procesamiento de las muestras, éstas se etiquetaron con el número del estudio, fecha y tiempo de colección.

Las muestras se transportaron al laboratorio por una compañía de envíos comerciales que entregó la muestra directamente al laboratorio. Se cuidaron las condiciones de almacenamiento y refrigeración de la muestra para su envío por lo que fueron acondicionadas en un paquete adecuado para mantener sus condiciones hasta la llegada al laboratorio; posteriormente se congelaron -20°C , para asegurar su viabilidad hasta el momento de su análisis.

6.14.4 Análisis

Las muestras se verificaron al momento de su recepción en el laboratorio y se anotaron las condiciones de la recepción:

Los métodos analíticos deben de estar documentados totalmente y validados antes del inicio del análisis, para demostrar una linealidad aceptable encima de la concentración entera sin extrapolación, precisión, reproductibilidad, exactitud, especificidad, sensibilidad (límite de cuantificación), recuperación, y estabilidad del analito en la matriz del blanco bajo almacenamiento en intervalos del estudio. La preparación y almacenamiento del proceso de muestras analíticas estuvieron acordes con el método. Los estándares y controles se pueden preparar para analizar en cada corrida para asegurar el método analítico completo, preparación de la muestra, extracción, limpieza y análisis del instrumental según criterios aceptables, como se indicó en la precisión y determinaciones de la exactitud.

6.14.5 Almacenamiento a largo plazo:

Las muestras se almacenarán en congelación a -20°C , bajo el resguardo del laboratorio por un tiempo de por lo menos 6 meses.

6.15 OBSERVACIONES:

6.15.1 Examen clínico.

Se realizó el examen clínico de todos los animales del estudio en forma diaria durante todo el estudio, incluyendo la revisión de apariencia general, conducta, actitud, y apetito. También en el día 0, se evaluó la salud del animal cada hora por 6 horas después del tratamiento. Se registraron los hallazgos como "normal" o "anormal.". En caso de ser necesario, se registraría la temperatura rectal, frecuencias respiratoria y cardiaca, además de otros parámetros necesarios para evaluar y justificar la "anormalidad" en forma apropiada. (Forma 12).

6.15.2 Efectos adversos del fármaco.

Para cada animal se buscó observar los signos de eventos adversos del fármaco (EAF) cada hora por 6 horas después del tratamiento. Dentro de las primeras 24 horas después del tratamiento si se detectase un EAF, se determinaría si era necesaria la aplicación de algún tratamiento debido a esta reacción; el director del estudio informaría del EAF al monitor del estudio, particularmente en el evento de una reacción seria, de frecuencia rara o muerte, aun cuando el evento no pareciese estar relacionado con el producto en prueba. El director del estudio documentaría la Forma 1 y describiría la reacción, la severidad, la terapia concomitante y procedimientos (examen físico, pruebas de laboratorio, etc.), y explicaría su teoría del EAF, como sigue:

6.15.2.1 Severidad de Eventos Adversos al Fármaco (EAF):

1= Suave

Pequeño o ninguna incomodidad.

Signos intermitentes o continuos.

Observación de las funciones no entorpecidas. *

No arriesga significativamente la salud.

Terapia y/o procedimiento clínico no necesario.

2= Moderado

Un poco de incomodidad.

Signos intermitentes o continuos.

Observación de las funciones moderadamente entorpecidas. *

No arriesga significativamente la salud.

Terapia y/o procedimiento clínico puede ser necesario.

3= Severo

Incomodidad Severa

Signos continuos.

Observación de las funciones severamente entorpecidas. *

Significativamente arriesga la salud.

Terapia y/o procedimiento clínico indispensable.

* Comparado a los hallazgos del día - 1 en el examen físico.

Relación de EAF en prueba

1= Desconocido

2= No relacionado: Claramente preexistente o causado por un evento específico extraño, sin otro factor causal evidente.

3= Posible: Posible asociación del fármaco, como sugirió por tipo, tiempo curso, y relacionado: con EAF a dosificar y eventos externos; puede seguir un modelo de respuesta por el administrar el fármaco, pero se podía haber producido por el estado clínico del animal y/o otro terapia.

4= Probable: Posible asociación del fármaco, como sugirió por tipo, tiempo curso y relacionado: con EAF sigue un modelo de respuesta para la administración del fármaco. (Incluye dosis excesiva.).

6.16 Peso corporal:

Se determinó el peso como parte general del examen físico (Forma 10) realizado en el día- 7, el día -1 y el día 34. De acuerdo con el peso del día -1 se calculó la dosificación de los productos de prueba y del grupo control (Forma 2).

Se determinó el peso en una báscula que se evaluó y aceptó previamente.

6.17 Patología:

6.17.1 Examen post mórtem.

Se realizaría un examen rutinario post mórtem (Forma 9) en cualquier animal que muriese en el periodo del estudio en forma espontánea o en caso de que se le aplicase eutanasia. La necropsia incluirá un examen completo de los cambios patológicos encontrados.

6.17.2 Colección de la muestra y proceso.

En caso de ser necesario el director del estudio podría enviar muestras de los tejidos incluidos en el cuadro 7 para su correcto diagnóstico, coleccionadas, procesadas y empaquetadas en formol al 10 % ó en un conservador similar (Forma 9).

Cuadro 7, tejidos a considerar para envío de muestras para histopatología.

Glándula pituitaria	Médula espinal lumbar
Glándula Tiroides	Ojos
Glándula paratiroides	Pulmones
Gandulas adrenales	Glándula mamaria
Páncreas	Hígado
Ovarios	Riñón
Útero	Vejiga urinaria
Testículos	Corazón
Próstata	Aorta
Epidídimo	Arteria y vena mesentéricas
Vesícula seminal	Hueso (fémur)
Pene	Médula ósea (fémur)
Cordón espermático	Bazo
Timo	Estómago
Nódulos linfáticos cervicales	Duodeno
Nódulos linfáticos mediastínicos	Yeyuno medio
Nódulos linfáticos mesentéricos	Íleon
Cerebelo	Colon
Cerebro	Ciego
Médula espinal lumbar	Músculo esquelético
Médula espinal cervical	Otro
Médula espinal torácica	Otro

6.17.3 Identificación, almacenamiento a corto plazo, y transporte de muestras.

Los contenedores de las muestras se etiquetarían con las codificaciones apropiadas para su envío al laboratorio con el número de correspondiente por un animal, además de proporcionar el número del estudio, número del asunto, tipo de espécimen, fecha de colección, y tipo de muestras.

Las muestras pudieron ser almacenadas en un cuarto frío antes de ser transferidas al laboratorio de diagnóstico. Las muestras se transportaron al laboratorio por una compañía de envíos comerciales que entregó la muestra directamente al laboratorio. Se cuidaron las condiciones de almacenamiento y refrigeración de la muestra para su envío por lo que fueron acondicionadas en un paquete adecuado para mantener sus condiciones hasta la llegada al laboratorio.

6.17.4 Análisis de la muestra.

El tejido se sujetaría a una evaluación histopatológica convencional por un Veterinario patólogo certificado.

6.18 Análisis de datos:

6.18.1 Definición de la unidad experimental.

Cada animal incluido se consideró como una unidad estadística.

6.18.2 Descripción de la metodología estadística:

Los parámetros a medir para cada muestra son área bajo la curva (ABC), la concentración máxima en el plasma (Cpmax) y el tiempo de la concentración máxima, definido como el tiempo de la primera ocurrencia de Cpmax, (Tmax). Antes del análisis de los datos de ABC, y Cpmax, los valores se transformaron a números logarítmicos naturales para obtener una distribución normal y ayudar a estabilizar la varianza. La comparación entre grupos fue por:

- Análisis de la Varianza para cada parámetro, por fase, para todos los grupos.
- Comparación de medias con prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).
- Análisis de la Varianza del diseño factorial con pruebas para los efectos de producto, fase y secuencia, para cada comparación hipotética.
- Intervalos de confianza (90 %) para cada parámetro: Para establecer una bioequivalencia deberá caer en el límite establecido de 80 a 125% para el coeficiente de los promedios.

Cabe señalar que, para un gran número de fármacos, se ha adoptado el límite de bioequivalencia de 80 a 120%, para datos crudos y de 80 a 125 % para datos logarítmicos naturales; generalmente basándose en el criterio clínico de que a los productos que tienen valores de biodisponibilidad que se salen de este rango, se les debe negar el acceso al mercado.^{20,26}

6.18.3 Determinación del tamaño de muestra.

El punto de medición primario de este análisis es el ABC 0-t ($\mu\text{g.h/mL}$), a partir de la cual se estima la bioequivalencia, mediante el rechazo de la hipótesis nula de desigualdad: “H₀: Las formulaciones de enrofloxacina Prueba A y Prueba B no son bioequivalentes a los productos de referencia”.

Los supuestos fueron: a) la igualdad en el número de observaciones, b) distribuciones normales e independientes y c) desviaciones estándar iguales.

Además se utiliza un nivel de significancia de 5 % (prueba de dos colas), una diferencia significativa de ± 20 % a partir de la diferencia obtenida en el intervalo de confianza, y una potencia de 90 %, además de un estimado de las desviaciones estándar obtenidas en estudios previos de farmacocinética de enrofloxacin.

El tamaño de muestra determinado para este análisis es de 12, lo cual se logra al utilizar los resultados de dos grupos de 6 bovinos después del cruzamiento de grupos en dos fases.

6.19 Sitio de investigación:

El ensayo y colección de muestras de sangre se llevaron a cabo en instalaciones de la FMVZ de la UNAM Rancho CEPIPSA, en Topilejo Distrito Federal, México.

Los análisis farmacocinéticos fueron llevados a cabo en la Unidad Analítica del laboratorio Patrocinador del Estudio. Por su parte, los análisis microbiológicos se realizaron en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ de la UNAM.

6.20 Colección y retención de datos:

Se coleccionaron todos los datos brutos, recolectados, archivados, y retenidos de acuerdo a las versiones actuales de facilidad de la prueba y procedimiento estándar de laboratorio, también de acuerdo a este protocolo y a los requisitos de regulación aplicables.

6.20.1 Colección:

Se grabaron datos de la investigación en tinta en libros de registro y/ o en las formas provistas en este protocolo y/ o por los laboratorios analíticos. Se incluyó una copia verdadera de archivos de la prueba y laboratorios analíticos con los datos crudos. Como parte de los datos crudos, registro de visita (Forma 13), correspondencia en papel o correo electrónico, y se documentaron las conversaciones telefónicas al estudio, incluyendo el tiempo y fecha de la comunicación (Forma 14), su propósito, el nombre y resumen.

6.20.2 Atribuciones:

Se firmaron con iniciales de entradas de los datos (o firma) y datado por la fabricación individual las entradas. Una persona no podría firmar o indicar las iniciales por otra persona. Si una persona hacía las observaciones y otro tomaba las anotaciones de los datos, se indicaba esto en la forma.



Cada persona escribió las iniciales o firmó de la misma manera cada tiempo para asegurar la credibilidad. El director del estudio firmó y fechó las formas para documentar su repaso de los datos del estudio.

6.20.3 Originalidad y exactitud:

Los datos de este estudio fueron las primeras observaciones verdaderas registradas, son los primeros registros de entrada de la información obtenida. Se registraron los datos inicialmente en un libro de registros o en las formas de registro, en lugar de por transcripción en papel, o en archivos, en casa. No se aceptaba ninguna repetición en cualquier registro de marcas.

6.20.4 Contemporánea

Se registraron los datos al tiempo de observación, en lugar de volver más tarde y anotar en el libro de registro o formas de los datos.

6.20.5 Legibilidad:

Los registros de los datos fueron legibles y anotados por un medio permanente, tinta en archivos escritos (negra preferentemente), y formatos inalterables por archivos electrónicos.

6.20.6 Corrección

Cualquier cambio en un dato de registro, cuando fue necesario, se hizo con una línea sola dibujada por la entrada errónea original legible. Se prohibió el uso de líquido corrector para sobrecribir en el documento. El dato correcto al lado del dato erróneo se anotó con una explicación breve (o referencia de la codificación, con una nota en el pie de página) seguido de las iniciales de la persona. Si una porción de los datos crudos necesitaba ser copiada o transcrita por cuestiones de legibilidad, se transferiría toda información de esa porción de los datos crudos (incluso la hoja original) y la razón de la copia o transcripción, explicando en un memorándum firmado por el director del estudio. En tal caso los datos crudos, la copia o transcripción de los datos crudos se guardarían junto a los archivos del estudio y el memorándum.

6.20.7 Archivo y retención

Una fotocopia completa y exacta de todo el archivo será retenida para el sitio de investigación y el laboratorio analítico por lo menos dos años después de realización del estudio. Todos los datos originales coleccionados y archivos en relación con el estudio, se archivarán indefinidamente o por



un período específico. Se retienen los archivos, pero no se limita al protocolo, enmendaduras, y declaraciones de desviación; personas claves, comunicaciones de personal (en sitio, libro de teléfono, correspondencia, impreso/ electrónico); artículo de prueba y control; horario del estudio; identificación animal, calificación, e inhabilitación; asignación aleatoria; medicaciones concurrentes y terapia; exámenes, observaciones, y medidas; colección de la muestra, proceso, empaquetamiento, etiqueta, y embarque; exámenes post mórtem; evaluación del laboratorio y análisis de muestras; disposición de animales y muestras; y una copia de todo informe.

7 RESULTADOS:

7.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS

En los cuadros 8,9 10 y 11 se presentan los valores promedio de las concentraciones de todos los productos a cada tiempo de muestreo, tanto por el método de análisis Microbiológico, como por el método de análisis por HPLC; cada cuadro va seguido por su gráfica correspondiente (figuras 2,3 4 y 5).

Cuadro 8. Fase 1, Método Microbiológico.. Concentraciones plasmáticas promedio de enrofloxacin obtenidas después de la administración de los seis diferentes tratamientos. Para los tratamientos Prueba A, Prueba B, Referencia A y Referencia B, la dosis fue de 5mg/kg; mientras que para los tratamientos Prueba B2 y Referencia B2, la dosis fue de 7.5mg/kg.

PROMEDIOS FASE 1 MICROBIOLÓGICO	GRUPO (Tratamiento) (concentración en µg/mL)					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Prueba B2)	D (Referencia B)	E (Referencia A)	F (Ref. B2)
Tiempo (h)						
0	0,004	0,037	0,007	0,018	0,030	0,023
1	0,292	0,313	0,638	0,098	0,418	0,066
1,5	1,594	0,713	0,970	0,278	0,689	0,394
2	1,402	0,696	1,077	0,202	0,997	0,670
3	1,740	1,442	1,503	1,224	1,443	0,918
4	2,038	1,725	2,158	1,356	1,647	1,300
6	0,819	1,814	2,142	1,895	1,855	2,028
9	0,593	1,217	2,117	1,108	1,397	1,993
12	0,112	0,535	1,178	0,456	0,570	1,538
18	0,025	0,092	0,223	0,142	0,143	0,368
24	0,022	0,034	0,028	0,061	0,048	0,086
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
48	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
96	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

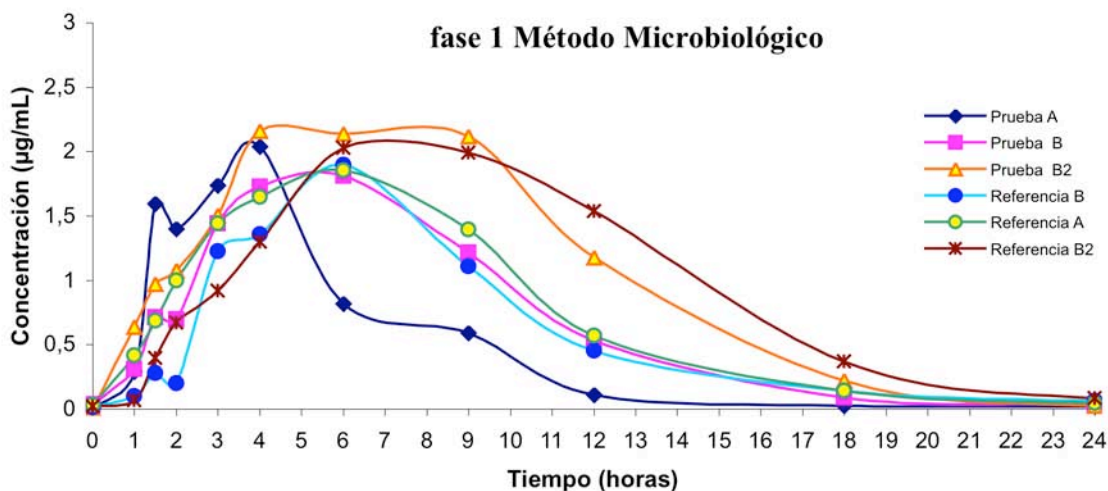


Figura 2. Fase 1, Método Microbiológico. Gráfica de los promedios de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin. Datos crudos.

Cuadro 9. Fase 2, Método Microbiológico. Concentraciones plasmáticas promedio de enrofloxacin obtenidas después de la administración de los seis diferentes tratamientos. Para los tratamientos Prueba A, Prueba B, Referencia A y Referencia B, la dosis fue de 5mg/kg; mientras que para los tratamientos Prueba B2 y Referencia B2, la dosis fue de 7.5mg/kg.

PROMEDIOS FASE 2 MICROBIOLÓGICO	GRUPO (Tratamiento) (concentración en µg/mL)					
	A (Referencia A)	B (Ref. B)	C (Ref. B2)	D (Prueba A)	E (Prueba B)	F (Prueba B2)
Tiempo (h)						
0	0,091	0,212	0,183	0,041	0,115	0,163
1	0,260	0,820	0,212	0,163	0,244	0,443
1,5	0,365	1,463	0,275	0,727	0,234	0,393
2	0,773	0,352	0,565	0,613	0,503	2,465
3	1,216	0,113	0,878	0,896	0,872	2,160
4	1,350	0,022	2,322	0,732	0,938	1,735
6	0,319	0,010	1,105	0,469	0,556	1,397
9	0,158	0,009	0,488	0,216	0,274	0,869
12	0,091	0,003	0,193	0,092	0,115	0,460
18	0,007	0,002	0,014	0,021	0,032	0,147
24	0,001	0,000	0,002	0,002	0,010	0,051
36	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
48	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
72	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
96	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

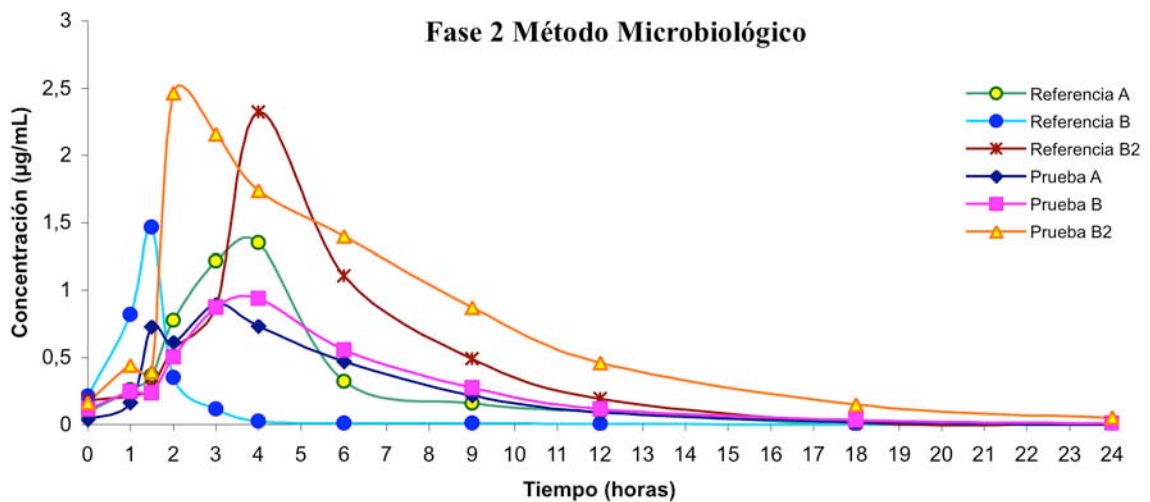


Figura 3. Fase 2, Método Microbiológico. Gráfica de los promedios de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin. Datos crudos.

Cuadro 10. Fase 1 , Método HPLC. Concentraciones plasmáticas promedio de enrofloxacin obtenidas después de la administración de los seis diferentes tratamientos. Para los tratamientos Prueba A, Prueba B, Referencia A y Referencia B, la dosis fue de 5mg/kg; mientras que para los tratamientos Prueba B2 y Referencia B2, la dosis fue de 7.5mg/kg.

PROMEDIOS FASE 1 HPLC	GRUPO (Tratamiento) (concentración en µg/mL)					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Prueba B2)	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,748	0,407	0,438	0,303	0,618	0,435
1,5	0,886	0,510	0,688	0,392	0,655	0,682
2	0,908	0,624	0,618	0,523	0,680	0,745
3	0,788	0,610	0,760	0,547	0,682	0,942
4	0,768	0,645	0,993	0,534	0,624	0,935
6	0,543	0,490	0,763	0,598	0,605	0,986
9	0,240	0,375	0,592	0,337	0,518	0,813
12	0,105	0,177	0,310	0,184	0,424	0,497
18	0,043	0,077	0,132	0,073	0,121	
24	0,040	0,035	0,037	0,044	0,137	0,090
36		0,028	0,062	0,038	0,060	0,052
48	0,020	0,007	0,043	0,004	0,039	0,010
72	0,073	0,004	0,010	0,027	0,000	0,000
96	0,010	0,000	0,005	0,004	0,026	0,000
120	0,000	0,085	0,003	0,004	0,000	0,000

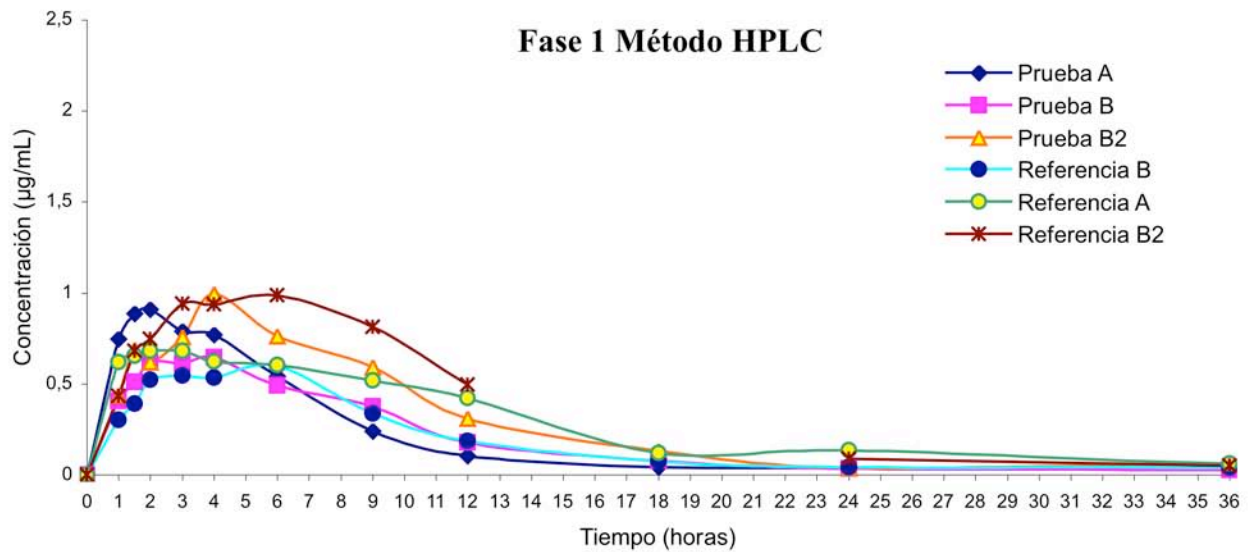


Figura 4. Fase 1, Método HPLC. Gráfica de los promedios de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin. Datos crudos.

Cuadro 11. Fase 2 , Método HPLC. Concentraciones plasmáticas promedio de enrofloxacin obtenidas después de la administración de los seis diferentes tratamientos. Para los tratamientos Prueba A, Prueba B, Referencia A y Referencia B, la dosis fue de 5mg/kg; mientras que para los tratamientos Prueba B2 y Referencia B2, la dosis fue de 7.5mg/kg.

PROMEDIOS FASE 2 HPLC	GRUPO (Tratamiento)					
	(concentración en µg/mL)					
Tiempo (h)	A (Ref. A)	B (Ref. B)	C (Ref. B2)	D (Prueba A)	E (Prueba B)	F (Prueba B2)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,453	0,243	0,993	0,293	0,312	0,815
1,5	0,545	0,323	0,940	0,357	0,402	1,518
2	0,453	0,338	0,805	0,332	0,432	1,417
3	0,558	0,405	1,033	0,315	0,602	0,978
4	0,500	0,376	1,502	0,340	0,642	1,515
6	0,453	0,415	0,752	0,400	0,618	1,232
9	0,288	0,237	0,535	0,240	0,463	1,498
12	0,158	0,132	0,380	0,139	0,313	0,877
18	0,064	0,030	0,085	0,061	0,089	0,129
24	0,031	0,019	0,129	0,050	0,033	0,055
36	0,013	0,000	0,018	0,014	0,005	0,005
48	0,006	0,000	0,010	0,000	0,003	0,000
72	0,000	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000
96	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
120	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000

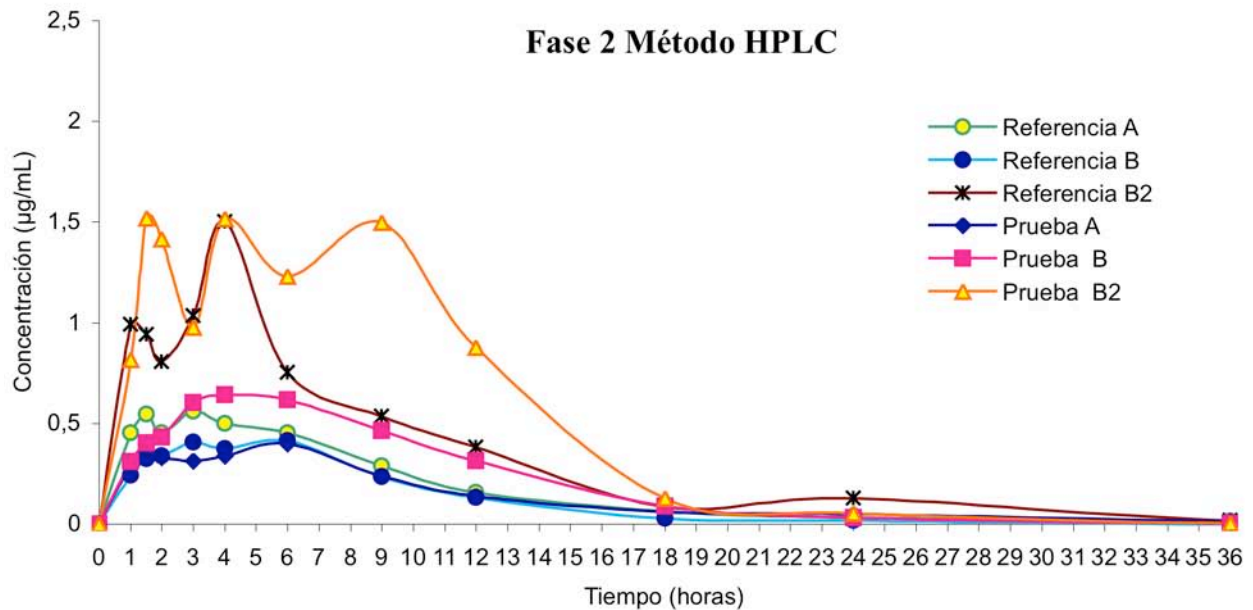


Figura 5. Fase 2, Método HPLC. Gráfica de los promedios de las concentraciones plasmáticas de enrofloxacin. Datos crudos.

7.2 MODELAJE COMPARTIMENTAL.

El ajuste de los datos por modelos compartimentales se realizó mediante el programa Pkanalyst. El análisis de los datos revela que éstos se ajustan con un mayor coeficiente de correlación al modelo abierto de dos compartimentos (MADC) que al modelo abierto de un compartimento (MAUC) (véanse los cuadros 12, 13, 14 y 15).

Cuadro 12. Fase 1.- Coeficientes de correlación (r^2) al ajuste de modelos farmacocinéticos (Método Microbiológico).

Grupo \Rightarrow	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Prueba B2)	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)
MAUC	0.9496	0.9654	0.9678	0.9603	0.9703	0.9649
MADC	0.9584	0.9759	0.9744	0.9873	0.9870	0.9732

Cuadro 13. Fase 2.- Coeficientes de correlación (r^2) al ajuste de modelos farmacocinéticos (Método Microbiológico).

Grupo \Rightarrow	A (Ref. A)	B (Ref. B)	C (Ref. B2)	D (Prueba A)	E (Prueba B)	F (Prueba B2)
MAUC	0.9681	0.9611	0.9623	0.9686	0.9690	0.9628
MADC	0.9866	0.9737	0.9811	0.9832	0.9938	0.9770

Cuadro 14. Fase 1.- Coeficientes de correlación (r^2) al ajuste de modelos farmacocinéticos (Método HPLC).

Grupo \Rightarrow	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Prueba B2)	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)
MAUC	0.9654	0.9644	0.9690	0.9556	0.9708	0.9667
MADC	0.9856	0.9834	0.9745	0.9878	0.9894	0.9888

Cuadro 15. Fase 2.- Coeficientes de correlación (r^2) al ajuste de modelos farmacocinéticos (Método HPLC).

Grupo \Rightarrow	A (Ref. A)	B (Ref. B)	C (Ref. B2)	D (Prueba A)	E (Prueba B)	F (Prueba B2)
MAUC	0.9798	0.9769	0.9673	0.9866	0.9821	0.9622
MADC	0.9984	0.9887	0.9710	0.9911	0.9859	0.9699

7.3 ANÁLISIS DE BIOEQUIVALENCIA.

7.3.1 Parámetros farmacocinéticos determinantes de bioequivalencia.

En los cuadros 16, 17, 18 y 19 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos ABC 0-t y C_pmax, determinantes de bioequivalencia (todos ellos, datos crudos). Cada cuadro se acompaña del resumen del análisis de varianza de los valores de ABC 0-t (t_n), así como de los resultados de la prueba de comparación de medias de Tukey.

Cuadro 16.

Promedios por grupo de las principales variables farmacocinéticas en la Fase I (Método HPLC).

Variable	Grupo					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Pba. B2)*	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)*
ABC 0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	6.043	6.208	9.502	6.301	8.670	13.213
\pm desv. est.	0.876	1.434	1.360	0.842	4.194	5.578
ABC 0-t (ln)**	1,790	1,804	2,243	1,833	2,069	2,494
\pm desv. est.	0,149	0,227	0,146	0,132	0,457	0,480
Cpmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.932	0.661	0.870	0.589	0.813	1.025
\pm desv. est.	0.171	0.202	0.074	0.100	0.104	0.286
Cpmax (ln, mg/L)***	6,824	6,458	6,765	6,366	6,692	6,902
\pm desv. est.	0,181	0,289	0,084	0,167	0,140	0,269

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg).

** ln= logaritmo natural.

*** Los datos se expresaron en mg/L para facilitar su conversión a logaritmos naturales y, a su vez, su análisis.

Cuadro 16'. Análisis de Varianza de los valores de ABC 0-t (ln), todos los grupos, Fase I, Método HPLC.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	Prob > F
Producto	5	2.4522818	0.490456	5.3406	0.0013
Error	30	2.7550618	0.091835		
C. Total	35	5.2073436			

Cuadro 16''. Comparación de medias con prueba de Tukey, alfa= 0.05

Tratamiento		Media
REF B2	A	2.4936667
PruebaB2	A B	2.2428333
REF A	A B	2.0690000
REF B	B	1.8335000
PruebaB	B	1.8041667
PruebaA	B	1.7896667

Los tratamientos que no comparten letras son significativamente diferentes.

Cuadro 17.

Promedios por grupo de las principales variables farmacocinéticas en la Fase II (Método HPLC).

Variable	Grupo					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Pba. B2)*	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)*
ABC 0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	5.073	4.345	11.687	4.098	7.736	17.189
\pm desv. est.	1.490	1.826	6.191	0.675	3.967	5.211
ABC 0-t (ln)**	1,587	1,375	2,333	1,400	1,961	2,806
\pm desv. est.	0,300	0,508	0,556	0,157	0,422	0,303
Cpmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.591	0.427	1.230	0.406	0.635	1.466
\pm desv. est.	0.244	0.215	0.451	0.099	0.240	0.472
Cpmax (ln, mg/L)***	6,324	5,938	7,069	5,980	6,394	7,244
\pm desv. est.	0,354	0,563	0,314	0,261	0,376	0,340

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg).

** ln= logaritmo natural.

*** Los datos se expresaron en mg/L para facilitar su conversión a logaritmos naturales y, a su vez, su análisis.

Cuadro 17'. Análisis de Varianza de los valores de ABC 0-t (ln), todos los grupos, Fase II, Método HPLC.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	Prob > F
Producto	5	9.817720	1.96354	12.3781	<.0001
Error	30	4.758924	0.15863		
C. Total	35	14.576644			

Cuadro 17''. Comparación de medias con prueba de Tukey, alfa= 0.05

Tratamiento	Media
657.01B2 A	2.8061667
REF B2 A B	2.3331667
657.01B B C	1.9615000
REF A C	1.5868333
657.01 ^a C	1.3995000
REF B C	1.3748333

Los tratamientos que no comparten letras son significativamente diferentes.

Cuadro 18.

Promedios por grupo de las principales variables farmacocinéticas en la Fase I (Método Microbiológico).

Variable	Grupo					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Pba. B2)*	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)*
ABC 0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	12,871	21,804	30,097	17,851	20,347	29,839
\pm desv. est.	1,992	2,045	6,288	2,229	1,219	3,662
ABC 0-t (ln)**	2,545	3,078	3,387	2,876	3,011	3,390
\pm desv. est.	0,150	0,093	0,202	0,122	0,060	0,122
Cpmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.596	1.610	2.048	1.197	1.545	1.663
\pm desv. est.	0.275	0.194	0.296	0.189	0.105	0.185
Cpmax (ln, mg/L)***	7,363	7,378	7,616	7,077	7,341	7,411
\pm desv. est.	0,174	0,113	0,150	0,161	0,068	0,117

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg).

** ln= logaritmo natural.

*** Los datos se expresaron en mg/L para facilitar su conversión a logaritmos naturales y, a su vez, su análisis.

Cuadro 18'. Análisis de Varianza de los valores de ABC 0-t (ln), todos los grupos, Fase I, Método Microbiológico.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	Prob > F
Producto	5	3.0967497	0.619350	35.3615	<.0001
Error	30	0.5254443	0.017515		
C. Total	35	3.6221940			

Cuadro 18''. Comparación de medias con prueba de Tukey, alfa= 0.05

Tratamiento		Media
REF B2	A	3.3896667
657.01B2	A	3.3871667
657.01B	B	3.0783333
REF A	B	3.0113333
REF B	B	2.8760000
657.01A	C	2.5455000

Cuadro 19.

Promedios por grupo de las principales variables farmacocinéticas en la Fase II (Método Microbiológico).

Variable	Grupo					
	A (Prueba A)	B (Prueba B)	C (Pba. B2)*	D (Ref. B)	E (Ref. A)	F (Ref. B2)*
ABC 0-t ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	7.087	2.453	12.473	5.771	6.871	17.599
\pm desv. est.	1.408	0.505	2.782	2.496	3.870	7.452
ABC 0-t (ln)**	1,941	0,879	2,501	1,665	1,805	2,788
\pm desv. est.	0,205	0,213	0,238	0,474	0,533	0,445
Cpmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.869	1.164	1.111	0.721	0.689	1.787
\pm desv. est.	0.147	0.279	0.241	0.289	0.247	0.441
Cpmax (ln, mg/L)***	6,756	7,038	6,993	6,502	6,488	7,463
\pm desv. est.	0,168	0,224	0,220	0,447	0,329	0,242

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg).

** ln= logaritmo natural.

*** Los datos se expresaron en mg/L para facilitar su conversión a logaritmos naturales y, a su vez, su análisis.

Cuadro 19'. Análisis de Varianza de los valores de ABC 0-t (ln), todos los grupos, Fase I, Método Microbiológico.

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F	Prob > F
Producto	5	13.516671	2.70333	19.0615	<.0001
Error	30	4.254658	0.14182		
C. Total	35	17.771330			

Cuadro 19''. Comparación de medias con prueba de Tukey, alfa= 0.05

Tratamiento	Media
657.01B2	A
Ref. B2	A B
Ref. A	B C
657.01B	C
657.01A	C
Ref. B	D

7.3.2. Comparaciones por parejas hipotéticas.

Se llevó a cabo un análisis factorial para cada comparación hipotética, de los efectos independientes de tres diferentes factores: Producto (Prueba A, Prueba B, Prueba B2, Referencia A, Referencia B y Referencia B2), Fase (1 ó 2) y Secuencia (el orden en que cada grupo de bovinos recibía el tratamiento, pudiendo ser: Prueba-Referencia o Referencia-Prueba) en los apéndices 1 y 2 (referentes a ABC 0-t y Cpmax, respectivamente) se incluyeron los cuadros de dicho análisis del modelo y los cuadros de las

pruebas por efectos de los diferentes factores. No se analizaron los efectos de las interacciones de los factores, pues esto no es aplicable. En los análisis se incluyeron todos los bovinos que recibieron el mismo producto, es decir, de ambas fases, por lo que el número de réplicas en estos análisis es de 12.

7.3.3 Decisión de Bioequivalencia.

En los cuadros 20 y 21 se muestra la decisión de Bioequivalencia de los productos de prueba con base en la construcción de intervalos de confianza de las comparaciones hipotéticas de los valores de ABC 0-t (ln).

Cuadro 20. Decisión de Bioequivalencia. Método HPLC.

Producto ⇒	Prueba A media ABC 0-t = 1.594 media C _{pmax} = 6.401		Prueba B media ABC 0-t = 1.882 media C _{pmax} = 6.426		Prueba B2 media ABC 0-t = 2.524 media C _{pmax} = 7.004	
Comparado con ⇒	Referencia A media ABC 0-t = 2.069 media C _{pmax} = 6.508		Referencia B media ABC 0-t = 1.604 media C _{pmax} = 6.366		Referencia B2 media ABC 0-t = 2.413 media C _{pmax} = 6.985	
	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%
ABC 0-t	0.7706	0.4208-0.8795	1.1737	1.1675-1.5149	1.0460	0.9182-1.2203
C _{pmax}	0.9835	0.9220-1.0286	1.0094	0.9816-1.0466	1.0027	0.9996-1.0061
Decisión⇒	No Bioequivalente		No Bioequivalente		Bioequivalente	

Cuadro 21. Decisión de Bioequivalencia. Método Microbiológico.

Producto ⇒	Prueba A media ABC 0-t = 2.105 media C _{pmax} = 6.932		Prueba B media ABC 0-t = 2.441 media C _{pmax} = 6.932		Prueba B2 media ABC 0-t = 3.087 media C _{pmax} = 7.539	
Comparado con ⇒	Referencia A media ABC 0-t = 2.476 media C _{pmax} = 7.048		Referencia B media ABC 0-t = 1.877 media C _{pmax} = 7.057		Referencia B2 media ABC 0-t = 2.945 media C _{pmax} = 7.201	
	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%	Cociente de las medias	Intervalo de confianza 90%
ABC 0-t	0.8501	0.5379-1.0123	1.3005	0.9574-1.6436	1.0482	0.9348-1.2098
C _{pmax}	0.9835	0.9215-1.0290	0.9823	0.9278-1.0209	1.0468	1.0238-1.1173
Decisión⇒	No Bioequivalente		No Bioequivalente		Bioequivalente	

7.4 Tiempo al que se alcanza la C_{pmax} (T_{max}).

En los cuadros 22 y 23 se muestran las medias, con desviación estándar, de los valores de T_{max} para cada producto, tomando en cuenta las dos fases del estudio, es decir, la media corresponde a 12 réplicas.

Cuadro 22. T_{max} . Método HPLC.

	Producto					
	Prueba A	Prueba B	Pba. B2*	Ref. A	Ref. B	Ref. B2*
T_{max} (h)	3,112	4,002	4,306	3.643	4,003	4,114
\pm desv. est.	1,269	0,902	1,172	1.416	0,987	1,649

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg)

Cuadro 23. T_{max} . Método Microbiológico.

	Producto					
	Prueba A	Prueba B	Pba. B2*	Ref. A	Ref. B	Ref. B2*
T_{max}	2,952	4,247	4,469	3.919	2,996	5,420
\pm desv. est.	0,221	0,936	1,118	0.963	2,192	1,313

*El número 2 se refiere al aumento de la dosis (7.5 mg/kg)



8 DISCUSIÓN:

8.1 BUENAS PRÁCTICAS CLÍNICAS (BPC):

El objetivo de las BPC es proveer una guía acerca del diseño, conducción, vigilancia, archivo, revisión, análisis y reporte de estudios clínicos para la evaluación de productos veterinarios en las especies blanco.

Las BPC pretenden ser un estándar de calidad internacional en estudios clínicos; el apego a este estándar provee al aseguramiento público de la integridad de los datos vertidos por el estudio, así como otorga confianza de que las actividades realizadas implicaron bienestar animal, además de protección del personal involucrado y el ambiente.

8.2 EJECUCIÓN DEL EXPERIMENTO:

Todo lo relacionado a la fase animal del experimento, específicamente el manejo de las condiciones de los bovinos involucrados, respecto de: inclusión en el estudio, alimentación, exámenes clínicos, asignación de grupos, manejo, contención y vigilancia de la aparición de Reacciones Adversas al Fármaco; se llevó a cabo de la manera más adecuada y precisa posible, tal y como se describe en “Material y Métodos”, así como de las formas 1,2,7,8,10,12.

Todas las facetas relacionadas con el manejo de la enrofloxacin, incluyendo personal involucrado, manejo, contabilización, inventario, dosificación y administración a los bovinos, se llevaron a cabo con la mayor precisión posible, con ayuda de las formas 3,4,5 y 6.

Todo lo relacionado a las muestras biológicas se ejecutó de la mejor manera para mantener las condiciones óptimas y de mejor precisión posible en lo que respecta a toma de la muestra, envasado, preservación en campo, transporte, preservación en laboratorio y procesamiento para análisis, con ayuda de las formas 11 y 14, así como de los procedimientos de aseguramiento de la calidad de los laboratorios que realizaron el análisis de las muestras.

8.3 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

En las figuras 2, 3, 4 y 5 se observa que los perfiles de concentración plasmática ($\mu\text{g/mL}$) contra tiempo (h), de los productos de referencia son semejantes a los obtenidos en los productos de prueba, tomando en cuenta que las comparaciones hipotéticas eran:

- Prueba A vs. Referencia A
- Prueba B vs. Referencia B
- Prueba B2 vs. Referencia B2

Los valores encontrados de C_{pmax} fueron de 0.406 a 0.932 para las aplicaciones de 5 mg/kg y de 0.870 a 1.466 para las aplicaciones de 7.5 mg/kg, lo que indica una probable influencia de la dosis sobre el pico de enrofloxacin en el plasma, y por lo tanto, sobre su eficacia bactericida, ya que ésta última depende de la concentración. En la revisión bibliográfica se encontró que después de una administración de preparados de enrofloxacin a una dosis de 5 mg/kg, los valores de C_{pmax} son de 0.73 a 0.98 $\mu\text{g/mL}$ en bovinos adultos; por lo que los valores encontrados en este estudio resultan ser semejantes a los publicados en otras poblaciones, aunque en algunos grupos, los valores encontrados de C_{pmax} fueron ligeramente menores. Recordando que la actividad bactericida de la enrofloxacin es dependiente de la concentración; en el caso de la aplicación de dosis de 7.5 mg/kg, las C_{pmax} logradas resultan ser de gran beneficio terapéutico, dado que se logra superar con facilidad los valores recomendados de: 8 a 10 veces la CMI de la mayoría de las patógenas mencionadas en el cuadro 1. El mismo caso se aplica al cociente ABC/CMI, que supera con facilidad, en dosis de 7.5 mg/kg, los valores recomendados de: >100 ó >125 (dependiendo del autor) para microorganismos gram-negativos, mientras que para gram-positivos es probable que sean de utilidad valores incluso menores.²⁸

8.4 ESTIMACIÓN DE LA BIOEQUIVALENCIA:

Para determinar si los productos de prueba eran bioequivalentes a los de referencia se calcularon los parámetros farmacocinéticos: Área bajo la curva de cero al último tiempo de muestreo (ABC 0-t) y la concentración plasmática máxima C_{pmax} , datos que pueden observarse en los cuadros 16, 17, 18 y 19.

a) Análisis de la varianza: Se realizó una comparación entre todos los grupos respecto de las variables AUC 0-t, C_{pmax} . Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación entre medias. El nivel de

confianza fue del 95 %. Estos resultados se pueden observar en los cuadros 16', 16'', 17', 17'', 18', 18'', 19' y 19''.

b) Intervalo de Hipótesis: Se llevó a cabo mediante una prueba t de student para obtener el Intervalo de Confianza al 90 %. La decisión de Bioequivalencia se basó principalmente en este punto; el intervalo de Confianza debía situarse dentro de los límites del 80 al 125 %, dado que el análisis se realizó utilizando los datos transformados a valores logarítmicos naturales. Estos resultados se pueden observar en los cuadros 20 y 21.

Con base en lo anterior, se encontró que:

- El producto de prueba A no fue bioequivalente respecto del producto de referencia A.
- El producto de prueba B no fue bioequivalente respecto del producto de referencia B en dosis de 5 mg/kg.
- El producto de prueba B sí fue bioequivalente respecto del producto de referencia B en dosis de 7.5 mg/kg.

Cabe comentar que estas decisiones de bioequivalencia hubieran resultado diferentes si se tomara en cuenta, únicamente, una simple comparación entre medias con la prueba de Tukey, en cuyo caso, todas las comparaciones de los productos de prueba con su respectiva referencia hubieran resultado bioequivalentes.

Sin embargo, es muy importante señalar que, en el caso de la comparación de los productos, de prueba B y de referencia B a 5 mg/kg, las medias de ABC 0-t del producto de prueba son superiores a las del producto de referencia, e incluso las C_pmax son similares (ver cuadros 20 y 21); por lo que la decisión de no-bioequivalencia no implica, en este caso, una inferioridad o una desventaja clínica del producto de prueba con respecto al de referencia, incluso, se podría considerar lo contrario, es decir, hipotéticamente, el producto de prueba B sería superior, clínicamente, al de referencia B en dosis de 5 mg/kg.

La principal preocupación de las autoridades sanitarias es el riesgo que supondría para los animales la aceptación errónea de que un producto es bioequivalente cuando en realidad no lo es. El riesgo de que no se pueda concluir que dos formulaciones son bioequivalentes cuando en realidad lo son es menos preocupante, por lo que se suele considerar un 20% de diferencia en datos crudos.

Antes de realizar el análisis de la bioequivalencia fue necesario comprobar que no existen efectos influyentes de “fase” ni de “secuencia” en un diseño factorial. Se encontraron diferencias en el efecto fase de las tres comparaciones de productos en el caso de la detección por el Método

Microbiológico sobre los valores de ABC 0-t (ver Apéndice 1); el hallazgo de un efecto fase nos sugiere que existe algún tipo de problema en la realización del estudio: diferencias en el manejo, análisis y almacenamiento de las muestras biológicas, por lo que todas las muestras del mismo individuo de los dos periodos deberían analizarse simultáneamente; diferencias climáticas, dietéticas o de actividad física, etc.

8.5 ANÁLISIS GRÁFICO:

Las curvas promedio de Cp contra el tiempo muestran gráficamente que, en algunos casos, existen aumentos y disminuciones alternantes en las concentraciones promedio de enrofloxacin, lo cual llega a ser sumamente evidente en la figura 5. Estos altibajos pudieron deberse a una circulación enterohepática, que aunque la principal vía de eliminación de la enrofloxacin es la renal, la vía biliar contribuye en cierta proporción.^{1,4} Se podría suponer que durante la eliminación biliar se secretaría la bilis con la enrofloxacin al intestino, creando así la posibilidad de que el fármaco fuera reabsorbido y pasara a la circulación sistémica nuevamente, con lo que se provoca el aumento de concentración observado en las gráficas. Otra hipótesis es que, ya que la administración del preparado farmacéutico es por vía subcutánea, el tejido subcutáneo sirviera de reservorio del fármaco y dependiendo de factores como el lugar de aplicación del fármaco y perfusión de la zona, la enrofloxacin se liberaría en mayor o menor velocidad. Por supuesto, aquí resalta la importancia de la solubilidad, velocidad de disolución y la permeabilidad de la zona anatómica.

8.6 RELEVANCIA CLÍNICA:

El objetivo general de los estudios de bioequivalencia es comparar dos formulaciones diferentes de un mismo fármaco para establecer su similitud. Aunque pudiera pensarse que esta práctica se utiliza primordialmente para evaluar la bioequivalencia de medicamentos genéricos, la realidad es que es un procedimiento mucho más extendido, ya que este tipo de estudios son frecuentes, tanto en la fase de desarrollo de un fármaco, como durante su etapa comercial.

La calidad de los medicamentos genéricos está sujeta a las mismas normas y regulaciones de fabricación que las demás especialidades farmacéuticas, mientras que la garantía de eficacia y seguridad deriva de un buen estudio de bioequivalencia.



No debe olvidarse que, muchas veces, el estudio de bioequivalencia es el único ensayo que un medicamento aporta para su autorización, situación muy particular de los medicamentos genéricos, de ahí la enorme importancia que ese estudio esté bien planteado y desarrollado.

8.7 SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS:

Los resultados fueron muy positivos, ya que no se detectaron eventos adversos a los fármacos, tanto reacciones locales, como tampoco sistémicas.

9 CONCLUSIONES:

1. Los productos de prueba B fueron Bioequivalentes a sus respectivos productos de referencia en dosis de 7.5 mg/kg.
2. Los productos de prueba A y B no fueron Bioequivalentes a sus respectivos productos de referencia en dosis de 5 mg/kg.
3. Es posible que la enrofloxacin sufra recirculación enterohepática de acuerdo a los perfiles de concentración plasmática contra tiempo, o bien, que el tejido subcutáneo sea un reservorio para la liberación del fármaco.
4. Los cuatro productos estudiados son seguros a las dosis utilizadas.



No debe olvidarse que, muchas veces, el estudio de bioequivalencia es el único ensayo que un medicamento aporta para su autorización, situación muy particular de los medicamentos genéricos, de ahí la enorme importancia que ese estudio esté bien planteado y desarrollado.

8.7 SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS:

Los resultados fueron muy positivos, ya que no se detectaron eventos adversos a los fármacos, tanto reacciones locales, como tampoco sistémicas.

9 CONCLUSIONES:

1. Los productos de prueba B fueron Bioequivalentes a sus respectivos productos de referencia en dosis de 7.5 mg/kg.
2. Los productos de prueba A y B no fueron Bioequivalentes a sus respectivos productos de referencia en dosis de 5 mg/kg.
3. Es posible que la enrofloxacin sufra recirculación enterohepática de acuerdo a los perfiles de concentración plasmática contra tiempo, o bien, que el tejido subcutáneo sea un reservorio para la liberación del fármaco.
4. Los cuatro productos estudiados son seguros a las dosis utilizadas.



FORMA 1 EVENTOS ADVERSOS AL FÁRMACO

INSTRUCCIONES. Se observará en cada animal la posible presentación de eventos adversos (EAF) hasta 6 horas posteriores al tratamiento. Se debe determinar, dentro de un periodo máximo de 24 horas, la necesidad de un tratamiento, si éste es aplicable. El director del estudio informará del EAF al monitor del estudio, particularmente si se trata de una reacción severa, mortal, totalmente inesperada o de frecuencia escasa.

Aún cuando el evento no parece estar involucrado con la aplicación del fármaco, el director del estudio documentará y describirá la reacción, la severidad, identificara la terapia concomitante y procedimientos (examen físico, prueba de laboratorio, etc.), y hará una hipótesis de la relación del EAF con el producto de prueba.

PERFIL DEL ANIMAL

Animal núm. _____

EVENTO ADVERSO

Día de reacción _____ Día del estudio _____ Hora de reacción _____ Reacción día/Hora desconocida

Sinología del EAF _____

Historia clínica relevante

Magnitud

Suave [1]

Pequeña o ninguna incomodidad.
Signos intermitentes o continuos.
Funciones vitales no afectadas.*
No arriesga la salud significativamente.
Terapia y/o procedimiento clínico innecesarios.

Moderada [2]

Un poco de incomodidad.
Signos intermitentes o continuos.
Funciones vitales moderadamente afectadas.*
No arriesga la salud significativamente.
Terapia y/o procedimiento clínico pueden ser necesarios.

Severa [3]

Incomodidad severa
Signos continuos.
Funciones vitales severamente afectadas.*
Arriesga la salud significativamente.
Terapia y/o procedimiento clínico indispensables.

CONTACTO CON EL PATROCINADOR

Por _____ Fecha _____

Instrucciones recibidas Ninguna Explicación _____

PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO

Resultados Anexos

NA =No Aplica NS = No significante S = Significante.

Hematológico NA NS S > _____

Química Sanguínea NA NS S > _____

Urianálisis NA NS S > _____

Otros _____ NS S > _____

Necropsia NA Muerte espontánea Fecha _____ Hora _____

Muerte por Eutanasia Fecha _____ Hora _____

Bruto _____

Microscopía _____

Causa espontánea de muerte _____

* A criterio del Director del estudio; comparado con los hallazgos en el día -1.

Director del Estudio _____

Fecha _____



FORMA 1

REGISTRO DE EVENTOS ADVERSOS AL FÁRMACO Página 2 de 2

Animal núm. _____

PERFIL DE TRATAMIENTO:						
Tratamiento Núm. de Código	Ruta	Dosis por tratamiento	Duración		Motivo de uso	Causa relacionada al evento adverso*
			Fecha de Inicio	Fecha de Final		
Producto de prueba						
						"Fármaco utilizado en este estudio"
Terapia concomitante						
Causa de Relación con el EAF						
* En opinión del director del estudio o investigador la relación entre este tratamiento y el efecto adverso al fármaco (EAF) es:						
1= <u>Desconocido</u>						
2= <u>No relacionado</u> : Claramente preexistente o causado por un evento específico extraño, sin otro factor causal evidente.						
3= <u>Posible</u> : Posible asociación del fármaco, como sugiere el tipo de reacción o el tiempo de presentación, pero se podía haber producido por el estado clínico del animal y/o otra terapia.						
4= <u>Probable</u> : Posible asociación del fármaco, como sugiere el tipo de reacción o el tiempo de presentación; sigue un modelo de respuesta para la administración del fármaco. (Incluye dosis excesiva.).						
ESTATUS DEL CASO						
<input type="radio"/> Recuperación total Fecha de recuperación _____ Hora _____						
<input type="radio"/> Vivo, con secuelas Descripción _____						
<input type="radio"/> Reacción continua Días de duración ____ horas ____ minutos ____						
ACCIONES TOMADAS Por <input type="radio"/> Director del estudio <input type="radio"/> Ordenado por el patrocinador						
<u>Caso</u>						
<input type="radio"/> Retiro del estudio <input type="radio"/> Remoción del estudio						
<u>Fármaco de estudio</u>						
<input type="radio"/> Continúa, no hay cambios en la dosis o el régimen.						
<input type="radio"/> Continúa. Cambio de dosis a _____ Régimen de _____						
<input type="radio"/> Descontinuado temporalmente. Fecha de reinicio _____ <input type="radio"/> Descontinuado permanentemente						
<input type="radio"/> Otro _____						
<u>Comentarios</u>						
Director de estudio _____				Fecha _____		



FORMA 4

REGISTRO DE PERSONAL

INSTRUCCIONES. Se representarán en este registro la firma real e iniciales de todo el personal que participa en este estudio.

Los cambios del nombre durante el estudio fueron indicados por una entrada nueva y su aclaración en la sección de los comentarios.

Nombre del lugar de prueba o laboratorio: _____

Nombre	Rol	Firma	Iniciales	Fecha

Comentario: _____

Iniciales _____ Fecha _____

Comentario: _____

Iniciales _____ Fecha _____

Comentario: _____

Iniciales _____ Fecha _____

Director de estudio (Firma)

Fecha



FORMA 5

REGISTRO DE PRODUCTO

Cuadro 1. Registro Descriptivo de Producto

(Lugar de prueba rellenar lo que es aplicable.)

ENVÍO NÚM. _____

<p>RECIBIDO POR: Nombre _____ _____ Compañía _____ Dirección _____ Ciudad _____ Estado _____ C.P. _____</p>	<p>INFORMACION DEL PRODUCTO Código de producto _____ Nombre del producto _____ Lote Núm. (Sólo uno) _____ Unidad Vial (mL) _____</p> <p style="text-align: right;">Enviado* Recibido</p> <p>1. Núm. Viales _____ 2. Núm. unidades (mL o implantes) _____ 3. Total mL o piezas _____</p> <p><i>Ver guía de envío. Notificar la cantidad enviada contra la recibida.</i></p> <p>Condiciones del producto <input type="radio"/> Intacto <input type="radio"/> Daño (anexar explicación)</p> <p>Lugar de almacenamiento _____</p> <p>Condiciones de almacenamiento _____°C _____% humedad</p>
<p>ENTREGA Nombre del sitio de Investigación _____ Día de llegada _____ Empresa de envíos: _____ Guía núm. _____</p> <p><input type="radio"/> Día de notificación de la llegada _____</p>	<p>REVISADO POR</p> <p>Director del estudio (Firma) _____ Fecha _____</p>
<p>RECIBIDO E INSPECCIONADO POR</p> <p>Firma _____ Fecha _____</p>	<p>REVISADO POR</p> <p>Director del estudio (Firma) _____ Fecha _____</p>

ENVÍO NÚM. _____

<p>RECIBIDO POR: Nombre _____ _____ Compañía _____ Dirección _____ Ciudad _____ Estado _____ C.P. _____</p>	<p>INFORMACION DEL PRODUCTO Código de producto _____ Nombre del producto _____ Lote Núm. (Sólo uno) _____ Unidad Vial (mL) _____</p> <p style="text-align: right;">Enviado* Recibido</p> <p>1. Núm. Viales o Cartuchos _____ 2. Núm. Unidades (mL o implantes) _____ 3. Total mL o piezas _____</p> <p><i>Ver guía de envío. Notificar la cantidad enviada contra la recibida.</i></p> <p>Condiciones del producto <input type="radio"/> Intacto <input type="radio"/> Daño (anexar explicación)</p> <p>Lugar de almacenamiento _____</p> <p>Condiciones de almacenamiento _____°C _____% humedad</p>
<p>ENTREGA Nombre del sitio de Investigación _____ Día de llegada _____ Empresa de envíos: _____ Guía núm. _____</p> <p><input type="radio"/> Día de notificación de la llegada _____</p>	<p>REVISADO POR</p> <p>Director del estudio (Firma) _____ Fecha _____</p>
<p>RECIBIDO E INSPECCIONADO POR</p> <p>Firma _____ Fecha _____</p>	<p>REVISADO POR</p> <p>Director del estudio (Firma) _____ Fecha _____</p>



FORMA 7

FORMA DE REMOCIÓN DE ANIMALES

INSTRUCCIONES

Criterios para la eliminación de un animal del estudio.

- 1) No cumple con los criterios de la inclusión.
- 2) No hay cooperación con procedimientos del estudio.
- 3) Si se encuentra alguna reacción adversa seria, lesión, o enfermedad.
- 4) Si muere espontáneamente o se le aplica eutanasia.

Procedimiento para la eliminación. A la discreción del director del estudio y amonestador del estudio, se eliminará un animal del estudio si cualquier de los siguientes criterios se aplica:

- Sitio de los animales del estudio muy alejado.
- La disposición de un animal del estudio para otra investigación, o vendido privadamente o comercialmente.

Necropsia.

Como se describió en el protocolo, una rutina se conducirá en un animal que muera espontáneamente o sea eutanizado. Se dispondrán los restos del animal según las regulaciones locales y procedimientos del lugar de la prueba.

CRITERIOS PARA LA REMOCIÓN DE ANIMALES

No cumple con los criterios de la inclusión.

El animal no coopera con los procedimientos del estudio.

Si se encuentra alguna: Seria reacción adversa Lesión Enfermedad.

Si muere espontáneamente o se le aplica eutanasia.

Requiere de necropsia (Ver forma 13)

No requiere necropsia (Explicación) _____

Otra (Explicar) _____

Núm. de Animal _____

Consultar con el monitor del estudio: _____
Fecha

Remoción del animal del estudio: _____
Fecha

Disposición final del animal: _____

Director del estudio _____

Fecha _____



FORMA 8

REGISTRO DE ALIMENTACIÓN Y AGUA

Página ____ de ____

INSTRUCCIONES. Se proporcionará la dieta básica de un alimento no medicado disponible para el mantenimiento. No se ajustará la ración durante el estudio, excepto durante la manipulación intermitente individual y el encierro que ocurriría durante los procedimientos del estudio; se proporcionará alimento una vez al día *Ad libitum* para el mantenimiento de peso corporal y condición durante todo el estudio.

PRECAUCION: Los animales tendrán un periodo de espera del alimento de 6 horas antes del tratamiento y 3 horas después del tratamiento, y agua una hora antes y una hora después del tratamiento.

Este registro pertenece a todos los animales

Número de Animal	Alimento Hora de alimentación A.M. o P.M.	Agua		Limpieza del lugar*	Limpieza de deposito de agua*
		Relleno A. M.	Relleno P. M.		
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					

* S (Sí) / N (No)

Técnico: _____ Fecha: _____

Director del estudio: _____ Fecha: _____



FORMA 9

EXAMEN POST MÓRTEM HOJA DE REGISTRO Y TOMA DE MUESTRAS

No Animal _____

Cuadro 1. EXAMEN POST MÓRTEM

INSTRUCCIONES. Examen post mórtem. La descripción de las lesiones se realizará en cualquier animal participante del estudio que muera espontáneamente o que se le aplique eutanasia durante el estudio. La necropsia incluirá un examen completo de tejidos con cambios patológicos

Fecha de muerte: _____

Tipo de muerte: Espontánea Eutanasia

Cabeza y cuello:

Contenido torácico

PRECAUCION: No realice esta tarea si se designa a preparar la dosificación de los productos

Contenido abdominal:

Sistema Músculo esquelético:

Comentarios (Anexar hoja):

Patólogo _____

Fecha de examen _____

Director de estudio _____

Fecha _____

Cuadro 2. COLECCIÓN DE TEJIDOS Y MUESTRAS

INSTRUCCIONES:

Colección de la muestra y proceso. Si es necesario para el director del estudio para el diagnóstico u otras razones, se coleccionarán los siguientes tejidos; se procesarán y empaquetarán en formol o un preservativo similar para histopatología.

Identificación de las muestras, almacenamiento a corto plazo, y transporte.

Los recipientes se etiquetarán con códigos apropiados para su envío al laboratorio, por otra parte se proporcionará el número del estudio, tipo de espécimen, fecha de colección y se podrán almacenar en refrigeración hasta su envío. Se transportarán al laboratorio en forma personal o por un servicio especializado de paquetería.

Tejido	Colectado		Procesado S/N	Etiquetado S/N	Refrigerado S/N	Tejido	Colectado		Procesado S/N	Etiquetado S/N	Refrigerado S/N
	S	N					S	N			
Glándula pituitaria						Médula espinal lumbar					
Glándula Tiroides						Ojos					
Glándula parotidas						Pulmones					
Gandulas adrenales						Glándula mamaria					
Páncreas						Higado					
Ovarios						Riñón					
Útero						Vejiga urinaria					
Testículos						Corazón					
Próstata						Aorta					
Epidídimo						Arteria y vena mesentericas					
Vesicula seminal						Hueso (fémur)					
Pene						Médula ósea (fémur)					
Cordón espermático						Bazo					
Timo						Estómago					
Nódulos linfáticos cervicales						Duodeno					
Nódulos linfáticos mediastínicos						Yeyuno medio					
Nódulos linfáticos mesentéricos						Ileon					
Cerebelo						Colon					
Cerebro						Ciego					
Médula espinal						Otro *					
Médula espinalcervical						Otro *					
Médula espinal torácica						Otro *					
Otro *						Otro *					

S = Sí, N = No

* Otros tejidos con cambios evidentes a la necropsia

Colector de la muestra

Día de toma de muestras

Director del estudio

Fecha



FORMA 10

EXAMEN FÍSICO GENERAL DEL DÍA -1

INSTRUCCIONES. Se someterá a cada animal a un examen físico para determinar la salud general en el día- 1.

ANIMAL Núm. Animal. _____ Fecha del examen _____
 Raza _____ Edad _____ Mes/año _____ Sexo _____

Día de estudio: -1 Otro _____

OCULAR		DISTURBIOS MUSCULARES		RESPIRATORIO		
Opacidad de la córnea	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Temblores de tríceps	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Respiración/ minuto		
Nistagmos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Temblores de miembros torácicos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Disnea	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Cambios pupilares	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Temblores de miembros pelvianos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Sonidos respiratorios	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	
Blefaroespasmos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Temblores Generalizados	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Descarga nasal	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	
Ceguera	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Labio caído y/ o salivación	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Apnea	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Examen de ojo	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Parálisis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N			
Iritis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Atonía	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N			
Quemosis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Atrofia	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	CONDUCTA/ACTITUD		
Fotofobia	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	TEGUMENTARIO		Ansiedad	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Congestión	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Alopecia	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Aprehensivo	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Conjuntivitis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Condiciones de pelaje	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Camina en círculos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Descarga o lagrimeo	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Estado de hidratación	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Comatoso	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
EQUILIBRIO		Prurito	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Deprimido	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
		Sensibilidad al tocar	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Recumbencia dorso - ventral	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Inestabilidad en miembros torácicos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	GASTROINTESTINAL		Recumbencia lateral	<input type="radio"/> S	
Inestabilidad en miembros pelvianos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Consistencia de heces	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Inquieto	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Inestabilidad de pie	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Diarrea	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Nariz o labio arrugado	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Inestabilidad mientras camina	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Cólico	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Cabeza temblorosa	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Incoordinación de miembros torácicos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Músculos abdominales tensos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Lengua de fuera	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Incoordinación de miembros pelvianos	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Transpiración (sudoroso)	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Convulsiones	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
Ataxia torácica o paresis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	Auscultación	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N			
Ataxia pelviana o paresis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N					
Reflejos anormales	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	CARDIOVASCULAR				
TEMP. CORPORAL(°C)				CAVIDAD ORAL		
				Dolor	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N	
APETITO		<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Frecuencia cardiaca	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Inflamación	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N
PESO CORPORAL (kg)			Color de membranas y mucosas	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Necrosis	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N
			Auscultación (Sonidos cardiacos)	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N	Inflamación	<input type="radio"/> S <input type="radio"/> N
Consumo del alimento/ tiempo	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N					
Consumo del agua/ tiempo	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N					
Condición corporal	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N					
Hidratación	<input type="radio"/> A <input type="radio"/> N					

S N = Sí o No (Anexar explicación para "sí")

A N = Anormal o Normal (Anexar explicación para "Anormal")

Firma del examinador

Fecha

Director del estudio

Fecha



FORMA 13

BITÁCORA DE VISITAS

Nombre del visitante _____ **Título** _____

Día de Visita _____ **Fecha de visita** _____

Otro personal involucrado _____

Propósito de la visita _____

Resumen de contacto _____

Acción resuelta de la visita _____

Firma del visitante

Fecha

Director del estudio

Fecha



FORMA 14

BITÁCORA DE COMUNICACION

Página ___ de ___

Fecha	Día de Estudio	Naturaleza de la comunicación y comentarios	Iniciales
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	
		<input type="radio"/> Teléfono <input type="radio"/> Correo-e <input type="radio"/> Otro medio _____ Persona _____ Comentarios _____	

Director del Estudio _____

Fecha _____

APÉNDICE 1

ANÁLISIS FACTORIAL, ÁREAS BAJO LA CURVA

Cuadros AP1-1. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba A vs Producto referencia A, método HPLC.

Medias ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Std Error
657.01A	12	1.59458	0.10257
REF A	12	2.06900	0.10257

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	1.8071171	0.602372	5.1913
Error	20	2.3207068	0.116035	Prob > F
C. Total	23	4.1278240		0.0082

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparam	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	1.3504270	11.6381	0.0028
Fase	1	1	0.2283450	1.9679	0.1760
Secuencia	1	1	0.2283450	1.9679	0.1760

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	-0.47442	-3.271	22	0.0035
Error Est.	0.14505			
Inferior 90%	-0.72350			
Superior 90%	-0.22534			

Cuadros AP1-2. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B vs Producto referencia B, método HPLC.

Medias ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
657.01B	12	1.88283	0.11062
REF B	12	1.60417	0.11062

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	1.1713173	0.390439	3.0921
Error	20	2.5253847	0.126269	Prob > F
C. Total	23	3.6967020		0.0503

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparam	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.46593067	3.6900	0.0691
Fase	1	1	0.13620267	1.0787	0.3114
Secuencia	1	1	0.56918400	4.5077	0.0464

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	0.278667	1.781	22	0.0887
Error Est.	0.156447			
Inferior 90%	0.010025			
Superior 90%	0.547308			

Cuadros AP1-3. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B2 vs Producto referencia B2, método HPLC.

Medias ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
657.01B2	12	2.52450	0.12747
REF B2	12	2.41342	0.12747

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	1.1033511	0.367784	2.2559
Error	20	3.2606158	0.163031	Prob > F
C. Total	23	4.3639670		0.1132

**Pruebas por Efectos**

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.07403704	0.4541	0.5081
Fase	1	1	0.24341204	1.4930	0.2360
Secuencia	1	1	0.78590204	4.8206	0.1401

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	0.111083	0.616	22	0.5441
Error Est.	0.180276			
Inferior 90%	-0.19848			
Superior 90%	0.420643			

Cuadros AP1-4. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba A vs Producto referencia A, método Microbiológico.**Medias** ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
657.01A	12	2.10500	0.16546
REF A	12	2.47617	0.16546

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	6.5919115	2.19730	30.0498
Error	20	1.4624423	0.07312	Prob > F
C. Total	23	8.0543538		<.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.8265882	11.3042	0.0031
Fase	1	1	5.7115527	78.1098	<.0001
Secuencia	1	1	0.0537707	0.7354	0.4013

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	-0.37117	-1.586	22	0.1270
Error Est.	0.23400			
Inferior 90%	-0.77298			
Superior 90%	0.03064			

Cuadros AP1-5. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B vs Producto referencia B, método Microbiológico.**Medias** ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
657.01B	12	2.44175	0.26539
REF B	12	1.87742	0.26539

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	3.5685121	1.18950	15.3180
Error	20	1.5530795	0.07765	Prob > F
C. Total	23	5.1215916		<.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.1211260	1.5598	0.2261
Fase	1	1	3.3219600	42.7790	<.0001
Secuencia	1	1	0.1254260	1.6152	0.2183

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	0.564333	1.504	22	0.1469
Error Est.	0.375313			
Inferior 90%	-0.08013			
Superior 90%	1.208799			

**Cuadros AP1-6. ABC 0-t. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B2 vs Producto referencia B2, método Microbiológico.****Medias** ($\mu\text{g.h/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
657.01B2	12	3.08742	0.13763
REF B2	12	2.94533	0.13763

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	3.5685121	1.18950	15.3180
Error	20	1.5530795	0.07765	Prob > F
C. Total	23	5.1215916		<.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.1211260	1.5598	0.2261
Fase	1	1	3.3219600	42.7790	<.0001
Secuencia	1	1	0.1254260	1.6152	0.2183

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

Estimador	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
	0.142083	0.730	22	0.4731
Error Est.	0.194634			
Inferior 90%	-0.19213			
Superior 90%	0.476298			

APÉNDICE 2

ANÁLISIS FACTORIAL, CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA MÁXIMA (CPMAX)

Cuadros AP2-1. C_{pm}max. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba A vs Producto referencia A, método HPLC.

Medias (µg/mL) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Std Error
Prueba A	12	6.40183	0.11959
REF A	12	6.50800	0.11959

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	2.6148075	0.871602	14.1931
Error	20	1.2282063	0.061410	Prob > F
C. Total	23	3.8430138		<.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.0676282	1.1013	0.3065
Fase	1	1	2.2082667	35.9592	<.0001
Secuencia	1	1	0.3389127	5.5188	0.0292

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

Estimador	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
	-0.10617	-0.628	22	0.5366
Error Est.	0.16912			
Inferior 90%	-0.39657			
Superior 90%	0.18424			

Cuadros AP2-2. C_{pm}max. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B vs Producto referencia B, método HPLC.

Medias (µg/mL) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
Prueba B	12	6.42642	0.07319
REF B	12	6.36650	0.07319

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	0.0338921	0.011297	0.1612
Error	20	1.4017958	0.070090	Prob > F
C. Total	23	1.4356880		0.9212

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.02154004	0.3073	0.5855
Fase	1	1	0.00617604	0.0881	0.7696
Secuencia	1	1	0.00617604	0.0881	0.7696

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

Estimador	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
	0.059917	0.579	22	0.5686
Error Est.	0.103505			
Inferior 90%	-0.11782			
Superior 90%	0.237649			

**Cuadros AP2-3. C_pmax. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B2 vs Producto referencia B2, método HPLC.****Medias** (µg/mL) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
Prueba B2	12	7.00475	0.09215
REF B2	12	6.98567	0.09215

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	0.7749885	0.258329	3.5167
Error	20	1.4691555	0.073458	Prob > F
C. Total	23	2.2441440		0.0340

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparam	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.00218504	0.0297	0.8648
Fase	1	1	0.62694338	8.5347	0.084
Secuencia	1	1	0.14586004	1.9856	0.1742

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

Estimador	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	0.019083	0.146	22	0.8849
Error Est.	0.130325			
Inferior 90%	-0.2047			
Superior 90%	0.242870			

Cuadros AP2-4. C_pmax. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba A vs Producto referencia A, método Microbiológico.**Medias** (µg/mL) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
Prueba A	12	6.93258	0.13143
REF A	12	7.04825	0.13143

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	3.3271928	1.10906	16.8916
Error	20	1.3131570	0.06566	Prob > F
C. Total	23	4.6403498		<.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparam	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.0802727	1.2226	0.2820
Fase	1	1	3.1334827	47.7244	0.1251
Secuencia	1	1	0.1134375	1.7277	0.2036

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

Estimador	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	-0.11567	-0.622	22	0.5401
Error Est.	0.18587			
Inferior 90%	-0.43482			
Superior 90%	0.20349			

Cuadros AP2-5. C_pmax. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B vs Producto referencia B, método Microbiológico.**Medias** (µg/mL) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
Prueba B	12	6.93292	0.11294
REF B	12	7.05725	0.11294

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	2.4761702	0.825390	16.7739
Error	20	0.9841337	0.049207	Prob > F
C. Total	23	3.4603038		<.0001

**Pruebas por Efectos**

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.0927527	1.8850	0.1850
Fase	1	1	1.2945615	26.3087	0.0721
Secuencia	1	1	1.0888560	22.1282	0.0641

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	-0.12433	-0.778	22	0.4446
Error Est.	0.15972			
Inferior 90%	-0.39860			
Superior 90%	0.14994			

Cuadros AP2-6. Cpmax. Análisis de Varianza de diseño factorial y Prueba t de dos colas con intervalo de confianza de 90%. Producto prueba B2 vs Producto referencia B2, método Microbiológico.**Medias** ($\mu\text{g/mL}$) (logaritmo natural)

Tratamiento	Número	Media	Error Est.
Prueba B2	12	7.53950	0.07052
REF B2	12	7.20192	0.07052

ANDEVA

Fuente de Variación	G.L.	S.C.	C.M.	Valor de F
Model	3	1.2779815	0.425994	11.8543
Error	20	0.7187175	0.035936	Prob > F
C. Total	23	1.9966990		0.0001

Pruebas por Efectos

Fuente de Variación	Nparm	G.L.	S.C.	Valor de F	Prob > F
Producto	1	1	0.68377504	19.0276	0.0003
Fase	1	1	0.48820538	13.5855	0.0315
Secuencia	1	1	0.10600104	2.9497	0.1013

Prueba t

Asumiendo varianzas iguales

	Diferencia	Prueba t	G.L.	Prob > t
Estimador	0.337583	3.385	22	0.0027
Error Est.	0.099732			
Inferior 90%	0.166330			
Superior 90%	0.508837			

10 BIBLIOGRAFÍA:

1. Papich M., Riviere J. Fluoroquinolone antimicrobial drugs. En: Adams R. Editor. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 8ª ed. Iowa State University Press, 2001: 898-917.
2. Walker R. Fluoroquinolones. En: Prescott J., Baggot J., Walker R. Editores. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3ª ed. Iowa State University Press, 2000: 315-338.
3. Brown, S. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1996; 19: 1-14.
4. Plumb D. *Veterinary Drug Handbook*. 3ª ed. Iowa State University Press, 1999: 276-279.
5. Bayer Health care LLC, Animal Health Division. Material safety data sheet, artículo número: 8713254. Disponible en <<http://bayer.com>> [Consultado el 15 de febrero de 2005].
6. Boothe D. Fluorinated quinolones: use and misuses. En: Bonagura J. Editor. *Kirk`s Current Veterinary Therapeutics XIII, small animal practice*. W.B. Saunders company, 2000.
7. Boothe D. Enrofloxacin revisited. *Veterinary Medicine*. 1994; 89: 744-753.
8. De Oliveira A., Watts J., Salmon S., Aarestrup F., De Oliveira A. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *Journal of Dairy Science*. 2000; 83: 855-862.
9. Salmon
10. Cox S., Cottrell M., Smith L., Papich M., Frazier D., Bartges J. Allometric analysis of ciprofloxacin and enrofloxacin pharmacokinetics across species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2004; 27: 139-146.
11. Langoni H. et al. Utilizaçao da enrofloxacin (Baytril R) no tratamento da mastite bovina estafilococica. *Ciencia-Rural*. 2000; 30: 167-170.
12. Rao G., Ramesh S., Ahmad A., Tripathi H., Sharma L., Malik J. Effects of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 23: 365-372.
13. Waxman S., San Andrés M., González F., De Lucas J., San Andrés M., Rodríguez C. Influence of *Escherichia coli* endotoxin-induced fever on the pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous administration in goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2003; 26: 65-69
14. Ahangar A., Srivastava A. Pharmacokinetics of enrofloxacin in febrile cross-bred bovine calves. *Indian Journal of Pharmacology*. 2000; 32: 305-308.
15. Varma R., Ahmad A., Sharma L., Aggarwal P., Ahuja V. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2003; 26: 303-305.
16. Hawkins E., Boothe D. Guinn A., Aucoin D., Ngyuen J. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1998; 21: 18-23.
17. Hoeben D., Burvenich C., Heyneman R. Influence of antimicrobial agents on bactericidal activity of bovine milk polymorfonuclear leukocytes. 1997; 56: 271-282.
18. Kaartinen L., Pyorala S., Moilanen M., Raisanen S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in newborn and one-week-old calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20: 479-482.
19. González M. Bioequivalencia de productos comerciales conteniendo ceftriaxona. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas-Biofarmacia. Facultad de Química, UNAM. 2000.

20. Centro para la evaluación e investigación de los medicamentos de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (“Food and Drug Administration”). Guidance for Industry: Statistical Approaches to Establishing Bioequivalence. 2001.
<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
21. Welage L., Kirking D., Ascione F., Galther C. Understanding the scientific issues embedded in the generic drug approval process. *Journal of the American Pharmaceutical Association*. 2001; 41: 856-867.
22. Jung H. Biodisponibilidad y Bioequivalencia. Diplomado en Farmacología, Módulo IV. Facultad de Medicina, UNAM. 2004.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, 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. *Diario oficial de la federación*. Viernes 7 de mayo de 1999.
24. Bennet J., Brodie J., Benner E., Kirby W. Simplified accurate method for antibiotic assay. *Clinical Specimens*. *American Society of Microbiology*. 1966;14: 170-177.
25. Sumano H., Ocampo L., Gutierrez L. Non bioequivalence of various trade-marks of enrofloxacin and Baytril® in cows. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2001; 108: 311-314.
26. Powers J. Statistical analysis of pharmacokinetic data. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1990; 13: 113-120.
27. Frías IJ. et al. Limitaciones de los estudios de bioequivalencia, aspectos prácticos. En: *El ensayo clínico en España*, pág. 81-92. Universidad Autónoma de Madrid. 2001.
28. Pirro F., Kristine F., Robrecht F. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of enrofloxacin in cattle. *Memorias del XXIX Congreso Nacional de Buiatría, México*, 2004.