

ARTÍCULO ORIGINAL**El análisis estadístico en la Farmacopea Europea: diseño completamente aleatorizado en un bioensayo de factor VIII.****Statistical analysis in the European Pharmacopoeia: completely randomised design in a factor VIII bioassay****Collazo MV¹, Muñiz MM², Alonso C¹, Frutos G²**¹Laboratorio de Hemoderivados. Agencia Española de Medicamentos (AEMPS).²Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Facultad de Farmacia. UCM.

mvcollazo@aemps.es

RESUMEN

La Farmacopea Europea proporciona una guía para diseñar los bioensayos que deben realizarse de acuerdo a las monografías publicadas, así como para el análisis o interpretación de sus resultados.

Uno de estos bioensayos es el ensayo cromogénico de la actividad del factor VIII de coagulación frente a un estándar de concentración conocida mediante un diseño cero común (3h) con 3 dosis de preparación, completamente aleatorizado, aplicando un modelo de razón de pendientes.

En este trabajo, hemos realizado e interpretado un análisis de varianza, y, finalmente, hemos calculado la potencia estimada de la preparación problema, con su correspondiente intervalo de confianza al 95%.

Para ello, hemos contado con el software CombiStats v4.0, suministrado por el European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) y utilizado rutinariamente por las Agencias Europeas de Evaluación, así como con el programa Microsoft Office Excel 2003. Los resultados obtenidos han sido similares en ambos casos.

Este trabajo demuestra la importancia de las ciencias matemáticas, y, en particular, de la estadística, en la optimización de los resultados obtenidos en las investigaciones científicas.

PALABRAS CLAVE: Farmacopea Europea, bioensayos, métodos estadísticos.

ABSTRACT

The European Pharmacopoeia provides the guidance for the design of bioassays prescribed in the European Pharmacopoeia monographs and for the analysis or interpretation of its results.

One of these bioassays is the chromogenic assay of human coagulation Factor VIII activity compared with a standard of known concentration according to a completely randomized “common zero (3h) – design” with 3 doses per preparation and using the slope-ratio model.

In this paper we have implemented and interpreted an analysis of variance and, finally, we have calculated the estimated potency of the preparation problem, with its corresponding confidence interval 95%, using the CombiStats v4.0 software, provided by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) and used for European Medicines Evaluation Agencies as well as the software Microsoft Office Excel 2003. The results obtained have been similar.

This paper shows the importance of mathematical sciences and, in particular, statistics in the optimization of the results of scientific research.

KEYWORDS: European Pharmacopoeia, bioassays, statistical methods.

INTRODUCCIÓN.

La *European Pharmacopoeia*, (Ph. Eur.) describe los bioensayos que deben ser utilizados para la valoración de ciertas sustancias y preparaciones cuya potencia no puede garantizarse mediante el uso de análisis químicos o físicos.¹

Sin embargo, la estimación de la potencia obtenida a partir de este tipo de valoración está sometida a un error aleatorio debido a la variabilidad inherente de las respuestas biológicas.

Entre los diseños experimentales propuestos por la Ph. Eur. para realizar bioensayos se encuentra el *diseño completamente aleatorizado*, donde la asignación de las unidades a los distintos tratamientos debe hacerse aleatoriamente.¹

Los cálculos de error deben realizarse, si es posible, a partir de los resultados de cada ensayo y siguiendo los métodos propuestos por la *Ph. Eur.* u otros de igual o mayor fiabilidad.

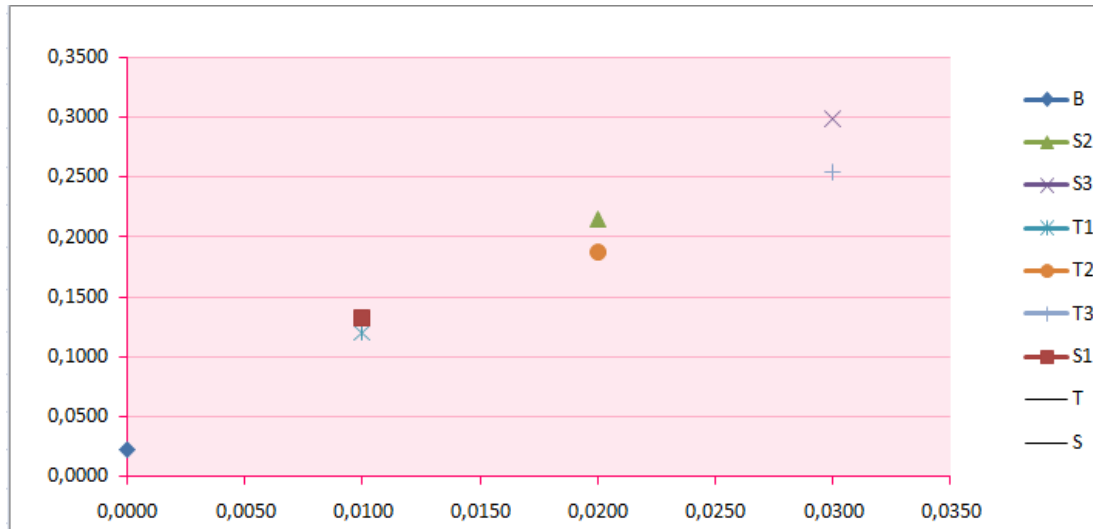
MATERIALES Y MÉTODOS.

El objetivo de este trabajo es dar a conocer los métodos estadísticos recogidos en la *Ph. Eur.*¹ que se utilizan en los bioensayos y, más concretamente, el diseño completamente aleatorizado, aplicando de forma práctica, mediante el uso del programa Excel³ y el modelo de razón de pendientes y con respuesta del blanco ignorada, a una valoración colorimétrica de Factor VIII, tomando todos los datos de la *Ph. Eur.*¹ (TABLA 1) para posteriormente realizar e interpretar un análisis de varianza, y, finalmente, calcular la potencia estimada de la preparación problema, con su correspondiente intervalo de confianza al 95% con ayuda del software CombiStats^{®2}, propio de las Agencias Europeas de Evaluación.

	PATRON S, en UI/ml			PREPARACIÓN T, en UI/ml			
	S1	S2	S3	T1	T2	T3	
Concentración	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	
Absorbancia	0,133	0,215	0,299	0,120	0,188	0,254	
	0,133	0,215	0,299	0,119	0,188	0,253	
	0,131	0,216	0,299	0,118	0,190	0,255	
	0,136	0,218	0,297	0,120	0,190	0,258	
	0,137	0,220	0,297	0,120	0,190	0,257	
	0,136	0,220	0,305	0,121	0,191	0,257	
	0,138	0,219	0,299	0,121	0,191	0,255	
	0,137	0,218	0,302	0,121	0,190	0,254	
Media	0,135125	0,217625	0,299625	0,120	0,190	0,255	0,203

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**MODELO DE RAZÓN DE PENDIENTES.**

Las dosis se representan en el eje horizontal. Las respuestas se representan en el eje vertical (Gráfico 1).



Las 2 líneas representan la relación dosis-respuesta calculada para la preparación patrón y para la preparación desconocida suponiendo que ambas se cortan en la dosis cero.

La razón de las pendientes representa la *potencia verdadera* de la preparación desconocida, con relación a su potencia supuesta.

1) Diseño de valoración.

Cálculo de $(y - \bar{y})^2$:

S1	S2	S3	T1	T2	T3
0,0049	0,0002	0,0092	0,0069	0,0002	0,0026
0,0049	0,0002	0,0092	0,0070	0,0002	0,0025
0,0052	0,0002	0,0092	0,0072	0,0002	0,0027
0,0045	0,0002	0,0089	0,0069	0,0002	0,0030
0,0043	0,0003	0,0089	0,0069	0,0002	0,0029
0,0045	0,0003	0,0104	0,0067	0,0001	0,0029
0,0042	0,0003	0,0092	0,0067	0,0001	0,0027
0,0043	0,0002	0,0098	0,0067	0,0002	0,0026
Cálculo del $\sum (y - \bar{y})^2$:					0,1919



Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Probabilidad (p-valor)
Regresión	2	0,1917	0,0958	21150,4	0,0000
Intersección	1	3,0E-09	3,0E-09	7,E-04	0,980
No Linealidad	2	2,3E-05	1,2E-05	2,5	0,091
Tratamientos	5	0,1917	0,0383	8461,2	0,000
Error residual	42	1,90E-04	4,53E-06		
Total	47	0,1919			

	Patrón (S)	Muestra problema (T)	Fórmulas adicionales del análisis de varianza			
Total de la preparación (P)	0,6524	0,5651	H_T	0,0952	S_1^2	0,0183
Producto lineal (L)	1,4693	1,2656	H_b	3,6923	S_2^2	0,0474
Valor de la ordenada en el origen (a)	0,3177	0,3180	a	0,0530	S_3^2	0,0898
Valor de la pendiente (b)	0,3290	0,2708	K	1,9764	T_1^2	0,0144
Valor del tratamiento (G)	0,1554	0,1156	a_s^2	0,1010	T_2^2	0,0360
No linealidad (J)	0,0000	0,0000	a_T^2	0,1011	T_3^2	0,0652
			a^2	0,0028		

Otros parámetros necesarios	
$d=d_s=d_T$	3
n	8
h	2
d^2-d	6
d^2	9
d^3	27
$(d^2-d)^2$	36

Diseño cero común (3h) con 3 dosis de preparación, completamente aleatorizado.

2) Análisis de varianza.

Requiere el uso de varias fórmulas apropiadas para valoraciones simétricas en las que una o más preparaciones examinadas se comparan con una preparación patrón (S).

	Patrón (S)	1ª muestra problema (T)	2ª muestra problema (U, etc.)
Respuesta media a la dosis más baja	S_1	T_1	U_1
Respuesta media a la 2ª dosis	S_2	T_2	U_2
...
Respuesta media a la dosis más alta	S_d	T_d	U_d
Total de la preparación	$P_S = S_1 + S_2 + \dots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \dots + T_d$	$P_U = \dots$
Producto lineal	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + \dots + dS_d$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \dots + dT_d$	$L_U = \dots$
Valor de la ordenada en el origen	$a_S = (4d + 2)P_S - 6L_S$	$a_T = (4d + 2)P_T - 6L_T$	$a_U = \dots$
Valor de la pendiente	$b_S = 2L_S - (d + 1)P_S$	$b_T = 2L_T - (d + 1)P_T$	$b_U = \dots$
Valor del tratamiento	$G_S = S_1^2 + \dots + S_d^2$	$G_T = T_1^2 + \dots + T_d^2$	$G_U = \dots$
No linealidad(*)	$J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3b_S^2}{d^3 - d}$	$J_T = G_T - \frac{P_T^2}{d} - \frac{3b_T^2}{d^3 - d}$	$J_U = \dots$

(*) No calculado para valoraciones de dos dosis

$H_U = \frac{nhcd^2 - nhcd}{hd^2 - hcd + 4d + 2}$	$H_T = \frac{n}{4cd^3 - 2cd^2 - 2d}$	$a = \frac{a_S + a_T + \dots}{h(d^2 - d)}$	$K = \frac{n(B^2 + P_S + P_T + \dots)^2}{hd + 1}$
---	--------------------------------------	--	---

III- Fórmulas para calcular la suma de cuadrados y los grados de libertad

Fuente de variación	Grados de libertad (f)	Suma de cuadrados
Regresión	h	$SS_{reg} = SS_{tot} - SS_{blancos} - SS_{int} - SS_{lin}$
Blanco	1	$SS_{blancos} = H_B(B - a)^2$
Intersección	$h - 1$	$SS_{int} = H_I(a_1^2 + a_2^2 + \dots) - h(d - d)^2 a^2$
No linealidad(**)	$h(d - 2)$	$SS_{lin} = n(U_S + J_T + \dots)$
Tratamientos	hd	$SS_{tot} = n(B^2 + G_S + G_T + \dots) - K$

(*) No calculado para valoraciones de dos dosis

IV- Estimación del error residual

Fuente de variación	Grados de libertad (f)	Suma de cuadrados
Bloques (filas)(**)	$n - 1$	$SS_{bloques} = hd(R_1^2 + \dots + R_n^2) - K$
Columnas(***)	$n - 1$	$SS_{col} = hd(C_1^2 + \dots + C_n^2) - K$
Error residual(***)	Compl. aleatorizado	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{bloques}$
	Bloques aleatorizados	$SS_{res} - SS_{col} - SS_{tot} - SS_{bloques}$
Total	Cuadrado latino	$SS_{res} = SS_{col} - SS_{tot} - SS_{bloques} - SS_{col}$
		$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

(*) No calculado para diseños totalmente aleatorizados
 (***) Calculado únicamente para cuadrados latinos
 (***) Dependiente del tipo de diseño utilizado

3) Cálculo de la potencia y los límites de confianza.

Inters. común de preparaciones ($\alpha = \alpha'$)	0,05298	➔	Resultado de los intervalos de confianza al 95,0%:
Pendiente del patrón (b'_s)	0,082241		
Pendiente de la muestra (b'_t)	0,067696		
Razón de potencias, R'	0,823146		
C	1,000058		
K'	0,000034	➔	0,8231 ± 0,0065
		➔	0,82962
		➔	0,81668

Resultado del análisis de varianzas:

Para que la valoración sea estadísticamente válida debe cumplir que

- 1) La variación correspondiente a la intersección no sea significativa; es decir, que la probabilidad calculada sea superior a 0,05.
- 2) En esta valoración, donde se incluyen 3 niveles de concentración por preparación, la variación correspondiente a la no linealidad no debe ser significativa; es decir, la probabilidad calculada sea superior a 0,05.

CONCLUSIONES.

Existe una regresión muy significativa así como desviaciones de linealidad e intersección no significativas.

La valoración es válida de acuerdo al ejemplo de farmacopea y permite por tanto el cálculo de límites de confianza.

En este ejemplo, los cálculos obtenidos con Excel (2003)³ conducen a los mismos resultados finales, aunque algunos cálculos intermedios son diferentes, debido a las cifras significativas utilizadas.

Este trabajo pone de manifiesto que las ciencias matemáticas, y, en particular, la estadística, son disciplinas que contribuyen de forma importante a la optimización de los resultados obtenidos en las investigaciones científicas. Este ejemplo ayuda a probar que todo, en última expresión, se basa en la conjunción de conocimientos físicos, químicos y matemáticos.

BIBLIOGRAFIA

1. Statistical Analysis of Results Biological Assays and Tests (01/2008:50300). Farmacopea Europea.
 2. Software CombiStats v4.0, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) – Council of Europe.
 3. Microsoft Office Excel 2003.
-