



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS
PARA CUANTIFICAR CASIOPEÍNA IIGLY EN PLASMA
Y SANGRE DE PERRO BEAGLE POR HPLC-MS Y
SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO FARMACOCINÉTICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. ROBERTO CARLOS CAÑAS ALONSO

TUTORA:

**DRA. LENA RUIZ AZUARA
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Este trabajo se realizó en el laboratorio 112 y 113 del edificio E de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Lena Ruiz Azuara.

**Los resultados aquí presentados se divulgaron , entre
otros foros, en los siguientes congresos:**

American Association of Pharmaceutical Scientist (AAPS),
Annual Meeting and Exposition, Atlanta, Georgia, USA, 2008

II Congreso Internacional de Química Médica dedicado a la
Investigación en Cáncer y Diabetes. Querétaro, Qro., México, 2006

Primer Congreso en Química Médica. Oaxaca, Oaxaca, 2004

Así mismo fueron publicados en los artículos:

Roberto Carlos Cañas-Alonso, Inés Fuentes-Noriega, Lena Ruiz-Azuara **(2013)**. Blood to plasma ratio, short-term stability and plasma protein binding of Casiopeína IIgly, a copper (II) based compound with antineoplastic activity. *J. Mex. Chem. Soc.*, **57**(3): 253-258.

Cañas-Alonso RC, Fuentes-Noriega I, Ruiz-Azuara L **(2010)**. Pharmacokinetics of Casiopeína IIgly in Beagle Dog: A Copper Based Compound with Antineoplastic Activity. *J. Bioanal. Biomed.*, **2**: 028-034. doi:10.4172/1948-593X.1000018.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue financiado por los siguientes proyectos de investigación: CONACYT-SS C01-2002-7677, PAPIIT IN204706, CONACYT (RT194130, 179119), PAPIIT217613, ICYT PINVII-32. Así mismo, extendo mi agradecimiento por las becas para realizar mis estudios doctorales que me fueron otorgadas por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de beca 173255 y el complemento de beca por la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP).

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Lena Ruiz por su invaluable apoyo científico en la realización de esta tesis, a las doctoras Inés Fuentes Noriega y Helgi Jung y al Dr. Gilberto Castañeda por sus importantes comentarios en el ámbito farmacocinético, así mismo al Dr. Rogelio Pereda por sus aportaciones en el campo de la espectrometría de masas y estructura de la tesis. El presente doctorante también agradece a los Doctores Eduardo Rodríguez de San Miguel quien revisó la parte analítica y al Dr. David Quintanar, experto en el campo tecnología Farmacéutica.

*A mis padres,
Roberto Cañas Domínguez y Jacinta Alonso Vázquez,
por su gran apoyo.*

Contenido

a.	Lista de constantes y abreviaturas	i
b.	Lista de tablas	iii
c.	Lista de figuras	vii
1.	Resumen (Abstract)	1
2.	Antecedentes	
2.1.	Importancia de los estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos	3
2.1.1.	Farmacocinética y sistema LADME	3
2.1.2.	Paradigmas desde la concepción de un nuevo fármaco hasta los estudios Fase IV	8
2.1.3.	Investigación preclínica en Estados Unidos, Europa y México	15
2.2.	Desarrollo y validación de métodos bioanalíticos: principios y recomendaciones	17
2.2.1.	Desarrollo de un método bioanalítico	18
2.2.2.	Validación	22
2.2.2.1.	Selectividad	24
2.2.2.2.	Efecto de la matriz	24
2.2.2.3.	Linealidad	26
2.2.2.4.	Límite de cuantificación	27
2.2.2.5.	Exactitud	27
2.2.2.6.	Precisión	28
2.2.2.7.	Recobro	28
2.2.2.8.	Estabilidad	29
2.2.2.9.	Límite de detección	30
2.2.2.10.	Integridad por dilución	31
2.3.	Casiopeínas: complejos de coordinación con actividad antineoplásica	33
2.3.1.	Cáncer y Casiopeínas	33
2.3.2.	Casiopeína IIgly	36
2.3.2.1.	Propiedades fisicoquímica y análisis instrumental	36
2.3.2.2.	Actividad biológica	37
2.3.2.3.	Mecanismo de acción	38
2.3.2.4.	Toxicidad	40
2.3.2.5.	Estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos	41



3. Planteamiento del problema	42
4. Objetivos del Proyecto	43
5. Hipótesis	44
6. Parte Experimental	
6.1. Insumos	45
6.1.1. Equipos	45
6.1.2. Reactivos	46
6.1.3. Soluciones	
6.1.3.1. Fase móvil MeOH/HFBA 0.1% (2:3) y MeOH/HFBA (3:2)	46
6.1.3.2. HFBA al 5% en agua desionizada	46
6.1.3.3. HFBA al 7% en agua desionizada MeOH/HFBA 0.1% (4:1)	47
6.1.3.4. Solución de MeOH/HFBA 0.1% (4:1)	47
6.1.3.5. Solución de estándar interno. Ketoprofeno en MeOH/HFBA (4:1)	47
6.1.3.6. Solución de estándar interno. Prednisona 20 µg/mL	47
6.1.3.7. Solución stock de casiopeína Igly en agua (1 mg/mL)	48
6.1.4. Material biológico	48
6.1.5. Software (programas computacionales)	48
6.2. Procedimientos experimentales	
6.2.1. Farmacocinética de la casiopeína Igly en plasma de perro por HPLC-MS	48
6.2.2. Farmacocinética de la casiopeína Igly en sangre de perro beagle durante un proceso de infusión constante	49
6.2.3. Estudio de biodistribución (relación sangre total/plasma) de la casiopeína Igly	49
6.2.4. Perfil farmacocinético de la casiopeína Igly en sangre de perro después de una administración intravenosa (bolus)	50
6.2.5. Estabilidad de la casiopeína Igly en sangre total de rata, perro y humana	50
6.2.6. Determinación de la unión a proteínas plasmáticas de la casiopeína Igly en tres especies diferentes	50
6.2.7. Método para cuantificar casiopeína Igly en plasma de perro Beagle por HPLC-MS	51
6.2.7.1. Preparación de la curva de calibración y puntos control de casiopeína Igly en agua y plasma de perro beagle	51
6.2.7.2. Método de extracción de la casiopeína Igly en plasma de perro beagle	52
6.2.7.3. Condiciones cromatográficas en la cuantificación de la casiopeína Igly	52
6.2.7.4. Validación del método bioanalítico para cuantificar casiopeína Igly en plasma de perro beagle por HPLC-MS	54
6.2.8. Método para a cuantificación de casiopeína Igly en sangre de perro beagle	56
6.2.8.1. Preparación de la curva y puntos control de la casiopeína	

	Iggy en sangre de perro beagle	56
6.2.8.2.	Método de extracción de la casiopeína Iggy en sangre de perro beagle	57
6.2.8.3.	Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de la casiopeína Iggy en sangre de perro beagle por HPLC-MS	57
6.2.8.4.	Validación del método analítico para cuantificar casiopeína Iggy en sangre total de perro beagle	59
6.2.9.	Método para cuantificar la casiopeína Iggy en sangre total de perro beagle por HPLC-MS (método 2)	61
6.2.9.1.	Preparación de la curva de calibración y puntos Control de la casiopeína Iggy en sangre de perro Beagle por HPLC-MS (método 2)	61
6.2.9.2.	Método de extracción de la casiopeína Iggy en sangre (método 2)	61
6.2.9.3.	Parámetros cromatográficos y espectrométricos	62
6.2.9.4.	Validación del método analítico para cuantificar Casiopeína Iggy en sangre total de perro beagle (método 2)	63
6.2.10.	Desarrollo de un método analítico cualitativo para determinar los posibles metabolitos de la casiopeína Iggy <i>in vivo</i>	
6.2.10.1.	Condiciones cromatográficas optimizadas. Método cualitativo	64
6.3.	Discusión y resultados	66
6.3.1.	Método bioanalítico para cuantificar casiopeína Iggy en plasma de perro beagle	66
6.3.1.1.	Desarrollo del método	66
6.3.1.2.	Validación del método	74
6.3.1.2.1.	Selectividad	74
6.3.1.2.2.	Efecto de la matriz	75
6.3.1.2.3.	Linealidad y precisión del sistema de medición	76
6.3.1.2.4.	Linealidad del método	77
6.3.1.2.5.	Límite de cuantificación	79
6.3.1.2.6.	Límite de detección	79
6.3.1.2.7.	Recobro absoluto	80
6.3.1.2.8.	Precisión del método	81
6.3.1.2.9.	Exactitud del método	83
6.3.1.2.10.	Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación	83
6.3.1.2.11.	Estabilidad a largo plazo	84
6.3.1.2.12.	Estabilidad pospreparativa	84
6.3.2.	Método bioanalítico para cuantificar casiopeína Iggy en sangre total de perro beagle por HPLC-IT-MS	
6.3.2.1.	Desarrollo del método bioanalítico	85
6.3.2.2.	Validación del método bioanalítico para cuantificar casiopeína Iggy en sangre de perro beagle	88
6.3.2.2.1.	Selectividad	88
6.3.2.2.2.	Efecto de la matriz	89
6.3.2.2.3.	Linealidad del método de cuantificación	90

6.3.2.2.4.	Límite de cuantificación	91
6.3.2.2.5.	Límite de detección	91
6.3.2.2.6.	Recobro relativo	91
6.3.2.2.7.	Precisión del método	92
6.3.2.2.8.	Exactitud	94
6.3.2.2.9.	Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación	94
6.3.2.2.10.	Estabilidad pospreparativa	95
6.3.3.	Método bioanalítico para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle (método 2)	
6.3.3.1.	Desarrollo del método bioanalítico	95
6.3.3.2.	Validación del método	
6.3.3.2.1.	Selectividad	95
6.3.3.2.2.	Efecto de la matriz	96
6.3.3.2.3.	Linealidad del método	96
6.3.3.2.4.	Límite de cuantificación	98
6.3.3.2.5.	Recobro	98
6.3.3.2.6.	Precisión del método	99
6.3.3.2.7.	Exactitud del método	99
6.3.3.2.8.	Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación	100
6.3.3.2.9.	Estabilidad a corto plazo	100
6.3.4.	Farmacocinética de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS	101
6.3.5.	Estudio farmacocinético de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle durante un proceso de infusión constante	103
6.3.6.	Biodistribución (relación sangre total/plasma) de la casiopeína IIgly	106
6.3.7.	Farmacocinética de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle Después de una administración intravenosa	107
6.3.8.	Estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre de 3 especies diferentes	109
6.3.9.	Unión a proteínas plasmáticas de la casiopeína IIgly	111
7.	Conclusiones	112
8.	Bibliografía	113
9.	Apéndices	120

a. Lista de constantes y abreviaturas

ABC	Área bajo la curva de cero a infinito
AUC	Area under the curve
CasIIgly	Casiopeína IIgly
CC	Puntos de la curva de calibración
Cl	Depuración o aclaramiento
Conc	Concentración
Cp	Concentración plasmática
DEB	Desviación estándar del blanco
DE	Desviación estándar muestral (n-1)
DEA	Desviación estándar absoluta
DL ₅₀	Dosis letal 50
DL ₉₀	Dosis letal 90
EI	Estándar Interno
EIC	Extracted ion chromatogram (Cromatograma de la extracción de un ión)
EM	Efecto de Matriz
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
FM	Factor Matriz (EMA)

	Ácido Heptaflourobutírico
HL_Lambda_z	Tiempo de vida media resultado del modelado no compartimental
HPLC-IT-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas del tipo trampa de iones.
HPLC-MS	Cromatografía de Líquidos acoplada a espectrometría de masas
HPLC-UV	Cromatografía de Líquidos acoplada a un detector ultravioleta (arreglo de diodos)
K10_HL	Tiempo de vida media (modelo compartimental)
LADME	Liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación
Lambda_z (λ_z)	Constante de eliminación en un modelo no compartimental
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MeOH	Metanol
MRT	Tiempo medio de residencia
PC	Puntos control
SIS	Selective ion storage (confinamiento selectivo del ión)
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TIC	Total ion chromatogram (cromatograma de iones totales)
UP	Unión a proteínas
V _{ss}	Volumen de distribución al estado estacionario.
V _z	Volumen de distribución en un modelo no compartimental

b. Lista de cuadros

- Cuadro 1. Ecuaciones fundamentales del modelado compartimental.
- Cuadro 2. Estudios relevantes que se realizan en la etapa preclínica.
- Cuadro 3. Factores del tumor que tiene incidencia sobre la concentraciones del fármaco en el tejido neoplásico.
- Cuadro 4. Procedimientos utilizados en la precipitación de proteínas plasmáticas.
- Cuadro 5. Subgrupos de la familia casiopeínas.
- Cuadro 6. Características fisicoquímicas de la Casiopeína IIgly.
- Cuadro 7. Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}) de diversas líneas celulares al ser expuestas a la casiopeína II gly y el cisplatino.
- Cuadro 8. Dosis letal 50 (DL_{50}) y la dosis letal 90 (DL_{90}) de la casiopeína IIgly (administraciones intraperitoneal e intravenosa) encontradas en los modelos animales de rata y ratón.
- Cuadro 9. Condiciones cromatográficas en la cuantificación de la casiopeína IIgly.
- Cuadro 10. Parámetros cromatográficos y espectrométricos para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-IT-MS.
- Cuadro 11. Proceso de preparación de la curva de calibración (CC) y puntos control (PC) en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle.
- Cuadro 12. Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle por HPLC-IT-MS.
- Cuadro 13. Parámetros del espectrómetro de masas para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle.

- Cuadro 14. Preparación de la curva de calibración y puntos control para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre (método 2). Los volúmenes tomados del stock fueron colocados en el tubo, evaporado el disolvente y finalmente se adicionó 1 ml de sangre.
- Cuadro 15. Parámetros cromatográficos usados en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre (método 2).
- Cuadro 16. Parámetros espectrométricos usados en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre (método 2).
- Cuadro 17. Condiciones cromatográficas para la determinación de posibles metabolitos de la casiopeína IIgly *in vivo*.
- Cuadro 18. Parámetros de espectrómetro de masas en el método cualitativo para determinar los posibles metabolitos de la casiopeína IIgly *in vivo*.
- Cuadro 19. Experimentos iniciales para la obtención de una retención adecuada y un pico gaussiano en HPLC-UV, (n=3).
- Cuadro 20. Resultados experimentales de la prueba de linealidad del sistema de medición para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle.
- Cuadro 22. Resultados de la prueba del límite de cuantificación. Método en plasma.
- Cuadro 23. Cocientes de las respuestas de los blancos entre el estándar interno. Método en plasma.
- Cuadro 24. Recobro absoluto para el método de cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro.
- Cuadro 25. Resultados de la precisión del método en su modalidad de repetibilidad.
- Cuadro 26. Resultados de la precisión del método en su modalidad de reproducibilidad intermedia.
- Cuadro 27. Exactitud del método en la determinación de casiopeína IIgly en plasma.
- Cuadro 28. Resultados de la prueba de estabilidad de la casiopeína IIgly en los ciclos de congelación / descongelación.
- Cuadro 29. Resultados de la estabilidad a largo plazo.
- Cuadro 30. Resultados de la estabilidad post-preparativa

- Cuadro 31. Matriz de experimentos para el diseño factorial 2^2 .
- Cuadro 32. Media y desviación estándar del área bajo la curva de los picos cromatográfico para cada tratamiento.
- Cuadro 33. Resultados del análisis de la varianza para el diseño de experimentos 2×2 .
- Cuadro 34. Prueba de Levine para determinar si existe igualdad entre los errores de la varianza.
- Cuadro 35. Resultados de la Prueba de Shapiro-Wilk.
- Cuadro 36. Resultados del ensayo del efecto de la matriz a tres niveles de concentraciones.
- Cuadro 37. Prueba de linealidad del método. Relación de áreas de casiopeína IIgly/EI para cada concentración que conforman la curva de calibración.
- Cuadro 38. Límite de cuantificación. Análisis de la concentración de $0.1 \mu\text{g/mL}$.
- Cuadro 39. Ensayo de recobro en el método bioanalítico para cuantificar la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle ($n=5$).
- Cuadro 40. Precisión del método de medición en su modalidad de repetibilidad (en el día).
- Cuadro 41. Precisión del método de medición en su modalidad de reproducibilidad.
- Cuadro 42. Resultados de la prueba de exactitud el método bioanalítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre de perro.
- Cuadro 43. Resultados de la prueba de estabilidad Ciclos congelación/descongelación.
- Cuadro 44. Estabilidad pospreparativa (inyector) en el método de sangre total.
- Cuadro 45. Resultados del efecto de la matriz en el método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre.
- Cuadro 46. Datos de linealidad del método. Método 2 en sangre.
- Cuadro 47. Datos promedio del valor mas bajo de la curva de calibración para la obtención del límite de cuantificación.
- Cuadro 48. Datos del recobro del método analítico (método 2).



Cuadro 49. Precisión del método. Reproducibilidad (método 2).

Cuadro 50. Precisión del método. Repetibilidad (precisión intermedia) (método 2).

Cuadro 51. Resultados de la exactitud (método 2).

Cuadro 52. Datos de estabilidad. Ciclos congelación/descongelación (método 2).

Cuadro 53. Resultados de la estabilidad a corto plazo (método 2).

Cuadro 54. Concentraciones de casiopeína IIgly obtenidas después de la administración IV de 0.9 mg/Kg de casiopeína IIgly a perros beagle.

Cuadro 55. Datos de diagnóstico de los modelos probados para la farmacocinética en plasma.

Cuadro 56. Parámetros Farmacocinéticos de la casiopeína IIgly en perros beagle obtenidos después de la administración de 0.9 mg/kg vía bolus intravenoso.

Cuadro 57. Concentraciones (\pm desviación estándar) obtenidas en la farmacocinética de casiopeína IIgly en sangre a dos diferentes dosis.

Cuadro 58. Parámetros farmacocinéticos obtenidos en el modelado no compartimental.

Cuadro 59. Resultados del estudio de biodistribución sangre total/plasma de la casiopeína IIgly en 3 sistemas biológicos.

Cuadro 60. Datos farmacocinéticos de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa de 2 mg/kg utilizando el modelado compartimental.

Cuadro 61. Datos farmacocinéticos de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa de 2 mg/kg utilizando el modelado no compartimental.

Cuadro 62. Manifestaciones clínicas de la casiopeína IIgly luego de la administración

Cuadro 63. Valores de porcentaje de unión a proteínas plasmáticas en tres especies diferentes.

c. Lista de figuras

- Figura 1. Proceso del desarrollo de un nuevo fármaco.
- Figura 2. Esquema de conexiones en un ensayo de supresión iónica por el método de infusión.
- Figura 3. Estructura de la Casiopeína IIgly.
- Figura 4. Preparación de la curva de calibración y puntos control de Casiopeína IIgly en plasma de perro beagle (curva en método) y en agua (evaluación del sistema).
- Figura 5. Casiopeína IIgly® 50 µg/mL, FM: MeOH/H₂O c/ CH₃COOH (4:1), flujo 1ml/min, Columna: Synergy Hydro RP (Phenomenex), C18, endcapping.
- Figura 6. Casiopeína IIgly® 50 µg/mL, FM: MeOH/H₂O c/ CH₃COOH (2:8), flujo 1ml/min, Columna: Synergy Hydro RP (Phenomenex), C18, endcapping.
- Figura 7. Espectro de masas de la casiopeína IIgly 10 µg/mL en MeOH/H₂O (1:1). Velocidad de infusión 0.3 mL/min.
- Figura 8. Patrón de fragmentación de la casiopeína IIgly en MeOH/H₂O 1:1.
- Figura 9. Espectro de masas ESI-IT-MS de la Casiopeína IIgly disuelta en FM (MeOH/HFBA 0.1% en H₂O, 1:1).
- Figura 10. Esquema de fragmentación de la Casiopeína IIgly disuelta en MeOH/HFBA en ESI-MS-IT (modo positivo).
- Figura 11. Casiopeína IIgly 10 µg/mL disuelta en FM [MeOH/HFBA 0.1% (4:6)]. SIS al ión 484 m/z . Columna Synergy Polar RP 30mm X 2mm.
- Figura 12. Efecto carry-over. Blanco de fase móvil después de la inyección de una muestra de Casiopeína IIgly (5 µg/mL) disuelta en agua.

Figura 13. Blanco de sistema después de la inyección de Casiopeína IIgly, lavado y análisis de un blanco de fase móvil.

Figura 14. Aducto disódico de ketoprofeno utilizado como estándar interno.

Figura 15. Casiopeína II gly ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) y ketoprofeno ($25 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 16. Iones encontrados en el rango de 100 a 500 m/z durante el análisis de muestra plasmática de perro beagle.

Figura 17. Cromatogramas de un blanco de plasma de perro beagle a) Extracción del ión 484 m/z, b) extracción del ión 299 m/z y c) Cromatograma de iones totales.

Figura 18. a) Cromatograma resultado del ensayo de doble infusión para investigar el efecto de la matriz sobre la casiopeína IIgly al tiempo de retención del compuesto y b) Cromatograma de la casiopeína IIgly ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$).

Figura 19. Gráfica de la linealidad del sistema de medición. Casiopeína IIgly en fase móvil en el rango de concentraciones de 0.1 a $15 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 20. Curva de calibración de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle. Las concentraciones que la conforman son 0.1, 0.5, 1.0, 10 y $15 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 21. Muestra cero. Blanco de plasma de perro con estándar interno.

Figura 22. Vista de la curva de calibración de la casiopeína IIgly en plasma en el software de adquisición y proceso de datos LC/MSD Trap version 1.6.

Figura 23. Cromatograma característico de un blanco de sangre.

Figura 24. Cromatogramas de la casiopeína IIgly (484 m/z, $t_r = 2.1 \text{ min}$) y ketoprofeno (299 m/z, $t_r = 7.8 \text{ min}$) en sangre de perro beagle .

Figura 25. Curva de calibración de casiopeína IIgly en sangre de perro Beagle. Los niveles que la conforman son 0.1, 1, 5, 10 y $15 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Figura 26. Vista típica de una curva de calibración en sangre con los correspondientes puntos control en el software LC/MSD Quant Analysis version 1.6 de Bruker Daltonic GmbH.

Figura 27. Espectro de masas característico de un blanco de sangre después de los procesos de extracción e inyección al sistema HPLC-MS.

Figura 28. Curva de calibración para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre (método b).

Figura 29. Perfil farmacocinético después de la administración de una dosis de 0.9 mg/kg de casiopeína IIgly a 2 perros de la raza beagle.

Figura 30. Gráfica de concentración de casiopeína IIgly vs tiempo durante y después de la administración iv por infusión. Se ensayaron 2 dosis: 1.5 y 3 mg/kg.

Figura 31. Gráfica de tiempo contra concentración plasmática obtenida después de realizar el modelado computacional compartimental.

Figura 32. Perfil Farmacocinético de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa simple de casiopeína IIgly.

Figura 33. Gráficas de estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre de tres especies diferentes (rata, perro y humano) a las concentraciones de a) 0.3 $\mu\text{g/mL}$ y b) 1 $\mu\text{g/mL}$.

1. RESUMEN

La casiopeína II gly es un complejo de coordinación conformado por un centro metálico de cobre y dos ligantes bidentados, uno del tipo diimina (fenantrolina) y otro aminoacidato (glicina). Este compuesto ha demostrado tener una alta actividad citotóxica en ciertas líneas celulares resistentes al cisplatino. Con la finalidad de realizar estudios preclínicos como la farmacocinética, la relación sangre/plasma, la estabilidad en sangre y la unión a proteínas plasmáticas, el objetivo de esta tesis es el de desarrollo y validación de métodos analíticos para cuantificar casiopeína IIgly en plasma y sangre de perro beagle.

Con base en las características químicas del complejo de coordinación, se desarrollaron métodos bioanalíticos utilizando tecnología de par iónico y fases estacionarias aromáticas. La cuantificación del compuesto se llevó a cabo usando el sistema acoplado HPLC-MS, usando como ión de cuantificación $[\text{Cu(II)(F}_7\text{C}_3\text{COO) 4,7-dimetil phen}]^+$, resultado de la reacción interfase entre el nitrato de acua 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicina cobre(II) y el HFBA. Los métodos fueron validados y los parámetros como la efecto de la matriz, linealidad, exactitud, precisión, estabilidad y recobro cumplieron con las recomendaciones establecidas por la FDA. Los estudios farmacocinéticos de este complejo de coordinación indican una alta tasa de eliminación con un corto tiempo de vida media (1.12-2.8 h) y un valor de depuración moderadamente alto (3.5-24.3 mL/min kg). Los resultados de la relación sangre total/plasma (Kb/p) obtenidos para rata, perro y humano a la concentración de 0.3 $\mu\text{g/mL}$ fueron 0.98, 1.29 y 2.15 y para la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvieron valores de 1.23, 1.57 y 2.47, respectivamente. Lo anterior indica que la casiopeína IIgly presenta una importante acumulación en sangre en comparación al plasma ($\text{Kb/p} > 2$) en las especies del perro y el humano. Los estudios de estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre de rata, perro y humana fueron realizados a 37 °C por 6 horas y se no se observó una degradación significativa del analito con base en la estabilidad analítica reportada por la guía de validación de la FDA. Los estudios de la unión a proteínas plasmáticas (UP) de rata, perro y humano demuestran que a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$, la casiopeína IIgly exhibe un %UP mayor al 90%.

1. ABSTRACT

Casiopeína IIgly is a coordination complex with copper core and two types of bidentate ligands: 4,7-dimethyl-phenanthroline (N-N) and glycinate (O-N). This compound has demonstrated to present high antineoplastic activity in some cell lines resistant to cisplatin. In order to continue with preclinical studies such as pharmacokinetics, whole blood to plasma ratio, short-term stability in whole blood and plasma protein binding, the aims of this work were to develop and validate methods to quantify casiopeína IIgly in blood and plasma of beagle dog.

Due to the chemical characteristics of casiopeína IIgly, analytical methods were developed on the basis of columns with aromatic stationary phase, an ionic pairing agent and an HPLC-MS system to improve sensibility. The quantification of this coordination complex was carried out using $[\text{Cu}(\text{II})(\text{F}_7\text{C}_3\text{COO})_2(4,7\text{-dimethyl phen})]^+$ ion (484 m/z) resulting from the ESI reaction between (4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) (glycinato) copper (II) nitrate) and HFBA. Method validation was conducted conforming to accepted recommendations of FDA bioanalytical method validation guide and the measurement of parameters such as matrix effect, linearity, accuracy, precision, stability and recovery were within required limits. Pharmacokinetics assays of this coordination complex shown a high elimination rate constant with a short half-time (1.12-2.8 h) and moderate clearance (3.5-24.3 mL/min/kg). The values of whole blood to plasma ratio obtained from rat, dog and human at 0.3 $\mu\text{g/mL}$ were 0.98, 1.29 and 2.15 and for 1 $\mu\text{g/mL}$ were 1.23, 1.57 y 2.47, respectively. These findings indicates and important accumulation in whole blood rather than plasma fluid ($K_b/p > 2$) for dog and human. Short-stability experiments in whole blood of rat, dog and human were carried on at 37 °C through 6 hours. The results showed that this coordination complex was stable in the described conditions at least 6 hours in accordance with analytical requirements of FDA guide. On the other hand, casiopeína IIgly exhibits a high protein binding ($UP > 90\%$) in plasma of rat, dog and human. These values should be considering in the clinic field, in order to avoid emergency of toxicity.

2. ANTECEDENTES

2.1 IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS BIOFARMACÉUTICOS Y FARMACOCINÉTICOS EN EL DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

2.1.1 Farmacocinética y sistema LADME

El papel de los medicamentos ha sido determinante a lo largo de la historia. Es probable que sea uno de los elementos que más ha contribuido a los cambios demográficos históricos, no sólo disminuyendo la mortalidad y aumentando la esperanza de vida, sino mejorando su calidad. Es por ello que cualquier intento de innovación para crear nuevos medicamentos, o bien para mejorar o ampliar su utilidad repercutirá en beneficio para la humanidad.

Muchos de los fármacos que se han descubierto a través de la historia han sido obtenidos de manera afortunada (o que comúnmente se denomina suerte o *serendipia*), tal es el caso de la isoniazida, compuesto sintetizado por Meyer y Mally en 1912 y que después de 40 años fue descubierto como un potente agente antituberculoso, cuando en 1952 Robitzek et al. administraron este compuesto a pacientes “sin esperanza” [1]. Existen otros emblemáticos ejemplos como los son el descubrimiento de la penicilina [2] y también en la deducción de utilizar el cisplatino como agente anticancerígeno [3].

Por otra parte, también existen ejemplos dentro de la historia del desarrollo de nuevas moléculas en donde se pueden apreciar graves problemas que afectan a los pacientes tras su administración, como el caso de la talidomida, producto farmacéutico utilizado como sedante y calmante de la náuseas durante los primeros meses de embarazo, causando severos defectos de nacimiento en miles de niños en Europa Occidental en 1962 [4].

Hoy en día, y gracias a la importante herencia cultural y científica de los pasadas experiencias, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad terapéutica se ha optimizado y sistematizado. Se han diseñado ciertos ensayos que permiten evaluar la seguridad y la eficacia del candidato a fármaco antes de poder ser administrado a los seres humanos. Mas aún, después de su comercialización, el producto debe ser monitorizado de manera poblacional con la finalidad de conocer variables como posibles efectos adversos no detectados en la investigación temprana.

Entre los diversos estudios que se deben realizar se encuentran los de carácter biofarmacéutico y farmacocinético. Los primeros se definen como aquellos estudios que examinan la interrelación que guardan los aspectos biológicos de un organismo vivo (el ser humano, por ejemplo) con las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la forma de dosificación y la ruta de administración. Esto implica el conocimiento profundo de la liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación (sistema LADME, por sus siglas) del fármaco. Por otra parte, la farmacocinética tiene como objetivo principal caracterizar el comportamiento temporal del fármaco en el cuerpo a través de ecuaciones matemáticas que ayudarán, entre otras cosas, en la determinación de un régimen de dosificación conveniente para el paciente [5].

Los estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos están implicados en todos los procesos que conforman el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos. Su importancia radica en el hecho de que si se caracteriza el proceso metabólico en el organismo, desde la aplicación de la forma farmacéutica hasta la excreción, se podrá inferir acerca de la concentración que se alcance en sangre, siendo ésta un punto preponderante que puede determinar la eficacia terapéutica de un fármaco.

Con la finalidad de describir el comportamiento cinético del fármaco en el organismo de ensayo, se pueden utilizar diversos modelos matemáticos tales como el modelaje compartimental, no compartimental y los modelos fisiológicos [6].

Los modelos compartimentales son los más utilizados en la farmacocinética y se basan fundamentalmente en las siguientes premisas: a) el organismo es un sistema abierto (existe un sentido unidireccional de entrada y salida), b) el compartimiento es considerado como una porción de material biológico en donde el fármaco se distribuye de manera homogénea y presenta las mismas propiedades cinética y c) en la fase de eliminación del fármaco la concentración plasmática es proporcional a la cantidad de fármaco remanente:

$$\frac{dA}{dt} \propto -A$$
$$\frac{dA}{dt} = -kA$$

En donde A es la cantidad de fármaco y k es la constante de eliminación.

Dependiendo del tipo de administración (oral, intravenosa, infusión constante, etc.) y la muestra (por ejemplo plasma, orina, saliva) se generan diversas ecuaciones diferenciales que permiten encontrar expresiones matemáticas para cada caso. En el cuadro 1 se indican las fórmulas mas utilizadas para el modelaje compartimental.

Cuadro 1. Ecuaciones fundamentales del modelado compartimental.

Modelo	Administración/Datos	Ecuación fundamental
Modelo Abierto de Un Compartimiento (MAUC)	Intravenosa/plasmáticos	$C_p = C_p^0 * e^{-k_e * t}$
	Intravenosa /urinarios	$(Aex_{\infty} - Aex_t) = \frac{kex}{ke} * D * e^{-k_e * t}$ (Sigma menos)
		$\frac{\Delta Aex}{\Delta t} = kex * D * e^{-k_e * t}$ (velocidad de excreción)
	Oral/plasmáticos	$C_p = \frac{F * D * ka}{Vd(ka - ke)} [e^{-k_e * t} - e^{-ka * t}]$
	Infusión constante / plasmáticos	$C_p = \frac{ko}{ke * Vd} [1 - e^{-k_e * t}]$
	Régimen de dosificación	$Dm = \frac{C_{p_{ee}} * ke * Vd * \tau}{F}$
Modelo Abierto de Dos Compartimientos (MADC)	Intravenosa/plasmáticos Oral/plasmáticos	$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ $C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + Pe^{-ka * t}$
Modelo Abierto de tres compartimientos (MATC)	Intravenosa/plasmáticos	$C_p = Ae^{-\lambda_1 t} + Be^{-\lambda_2 t} + Pe^{-\lambda_3 t}$

Una de los principales aplicaciones de la farmacocinética es la elucidación del régimen posológico. Para ello en la investigación del desarrollo de nuevos fármacos se ensayan de manera común tres diferentes dosis del compuesto con la finalidad de conocer el comportamiento de los parámetros farmacocinéticos en el rango de dosis establecido. Si el resultado de la experimentación revela que el valor de los parámetros farmacocinéticos son constantes en el intervalo de dosificación definido, se establece que el sistema es dosis independiente, también llamado farmacocinética lineal. En el caso contrario, cuando se observa que al menos un parámetro farmacocinético no es constante, se define que el sistema corresponde a una cinética dosis dependiente o de farmacocinética no lineal.

La cinética no lineal puede ser atribuida principalmente a los siguientes factores:

- Saturación de la fijación del fármaco a las proteínas plasmáticas.
- Saturación del sistema de transporte activo responsable de la absorción del fármaco.
- Saturación del sistema metabólico intestinal o hepático responsable del efecto del primer paso.
- Baja solubilidad del fármaco que produce una disminución de la fracción disuelta al aumentar la dosis y por ende, la cantidad absorbida es afectada.
- Saturación del sistema de eliminación renal de secreción activa tubular.

En estos casos, las ecuaciones que describen de manera asertiva el perfil farmacocinético están basadas en la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{V_{\max} * C}{K_m + C}$$

Siendo V_{\max} la velocidad máxima (biotransformación etc.) y K_m la constante de Michaelis-Menten.

Por otra parte, el **modelaje no compartimental** se define como el tratamiento de los datos experimentales que permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de ajustarlos a un modelo determinado. Este sistema se basa en la obtención de parámetros como el ABC de cero a infinito, la constante de eliminación (la cual en este modelo se define como λ_z) y el tiempo de vida media que permiten explicar los datos experimentales, predecir los niveles plasmáticos del fármaco en dosis únicas y repetidas y la determinación de regímenes de dosificación. También se puede obtener en este modelo el Tiempo Medio de Residencia (TMR), el cual es definido como el tiempo que en promedio, permanece de forma inalterada una molécula de fármaco en el organismo durante su tránsito por el cuerpo. Una de las principales ventajas del tratamiento cinético no compartimental radica en resuelve el problema de seleccionar un único modelo compartimental para todos los perfiles de los sujetos en estudio. Por ejemplo, en caso de la vancomicina, un antibiótico glicopéptido, se ha reportado que después de la administración intravenosa los perfiles farmacocinéticos de los pacientes se pueden ajustar a uno, dos o tres compartimientos [7].

En los modelos fisiológicos se agrupan de manera real órganos y/o tejidos que tienen interés farmacológico y/o toxicológico, dando como resultado ecuaciones cinéticas en donde se realiza un balance de masa dependiente de las características fisicoquímicas del fármaco y el flujo sanguíneo o la permeabilidad de la membrana. En el caso de los modelos limitados por el flujo, la velocidad de irrigación (en donde se encuentra el fármaco) se considera plausiblemente más lenta que la velocidad de difusión a través de las membranas, por lo que con base a la agrupación de órganos considerados

con características cinéticas semejantes, se desprende la siguiente la expresión matemática:

$$V_t \frac{dC_t}{dt} = \Phi_t C_a - \Phi_t \frac{C_t}{R_t}$$

En donde C_t es la concentración del tejido, C_a la concentración arterial, Φ_t el flujo sanguíneo al tejido, R_t es el coeficiente de reparto (concentración tisular/concentración venosa) y V_t el volumen tisular.

En el caso de modelos limitados por la permeabilidad, se establece que la contribución por el flujo es despreciable de tal forma que se pondera la existencia de barreras de difusión del fármaco las cuales se dividen en espacio vascular, intersticial y celular y de esta forma, en cada etapa, se plantea una ecuación diferencial que denota el balance de masa. Generalmente este proceso puede ser simplificado considerando que la etapa cinética mas lenta se da en la membrana celular, lo que conlleva a generar dos ecuaciones que explican el fenómeno:

$$V_e \frac{dC_e}{dt} = \Phi_t C_a - \Phi_t C_v - F_{e-c}$$

$$V_c \frac{dC_c}{dt} = F_{e-c}$$

en donde V_e y V_c son los volúmenes del espacio extracelular y celular respectivamente, Φ_t el flujo sanguíneo al tejido, C_a concentración arterial, C_v concentración venosa y F_{e-c} la función de transferencia del fármaco.

De los tres modelos descritos, los modelos fisiológicos son lo menos utilizados debido en gran parte a la dificultad experimental y matemática, sin embargo la utilización de esta herramienta ha servido para la extrapolación del comportamiento cinético en humanos a partir de datos obtenidos en animales de experimentación (alometría), como en el caso del metotrexato [8].

Es importante hacer notar que una de las principales pruebas que las moléculas candidato fallan son en los estudios ADME y farmacocinéticos [9], por lo que las compañías farmacéuticas y universidades en donde se realiza investigación destinan una gran parte de los recursos a este tipo de ensayos. Con el fin de que la probabilidad de éxito aumente, actualmente se hace énfasis en realizar estudios biofarmacéuticos en la etapa inicial del diseño de nuevos fármacos [10-12] y también a través de ensayos en sistemas computacionales como los llamados estudios *in silico* [13] tratando de esta manera de encontrar moléculas que tengan un perfil farmacológico adecuado.

2.1.2 Paradigmas desde la concepción de un nuevo fármaco hasta los estudios Fase IV.

El inicio de todo el proceso es el diseño; desde el punto de vista de Harvey [14], existen 3 grandes vertientes en donde se pueden agrupar a las metodologías para encontrar nuevas moléculas con actividad terapéutica:

- a) Enfoque empírico o “irracional”. Esta categoría está basada en el descubrimiento de nuevas moléculas a través de la observación de los efectos farmacológicos de un producto natural o sintético. Importantes fitofármacos han sido obtenidos a través de esta técnica, tales son los casos de los extractos de la hiedra como agente antitusivo, el uso de la morfina y la codeína que poseen efecto sedante, y la quinina, producto que se extrae de la corteza de los árboles *Cinchona calisaya*, *Cinchona ledgeriana*, *Cinchona officinalis* L. y *Cinchona succirubra*.
- b) Enfoque racional. El candidato a fármaco es diseñado (“confeccionado a la medida”) en función de un blanco molecular, el cual por ejemplo, puede ser un receptor o una biomolécula que se encuentra en una ruta metabólica y que es parte de un proceso de enfermedad. Las técnicas en este enfoque se subagrupan a su vez en el diseño de fármacos basado en blancos moleculares y a través de estructuras líderes (cabezas de series), como en la caso del diseño de compuestos antagonistas a partir de las biomoléculas agonistas para ciertos receptores, por ejemplo en el caso de la noradrenalina que dio origen a la cimetidina.
- c) Enfoque antisentido. Este rubro es relativamente nuevo y nace gracias al conocimiento genético que a fechas recientes se ha obtenido del genoma humano. Se basa en el desarrollo de moléculas a partir del funcionamiento de los genes y su implicación en el desarrollo de patologías. Los blancos de la técnica antisentido son las moléculas de RNA, afectándolas en su expresión y en su funcionamiento. Un ejemplo del diseño de fármacos por esta vía lo constituye la generación de oligonucleótidos que inhiben la RNA β -secretasa, implicada en el deterioro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer.

Cabe mencionar que en el descubrimiento de nuevos candidatos a fármaco, ninguno de los sistemas excluye al otro, en otras palabras las técnicas pueden ser complementarias.

A partir de este punto y con la finalidad de determinar, entre otros importantes parámetros, la seguridad y la eficacia, la nueva entidad química queda sujeta a los estudios preclínicos y los clínicos, conformados estos últimos en 3 etapas (figura 1).

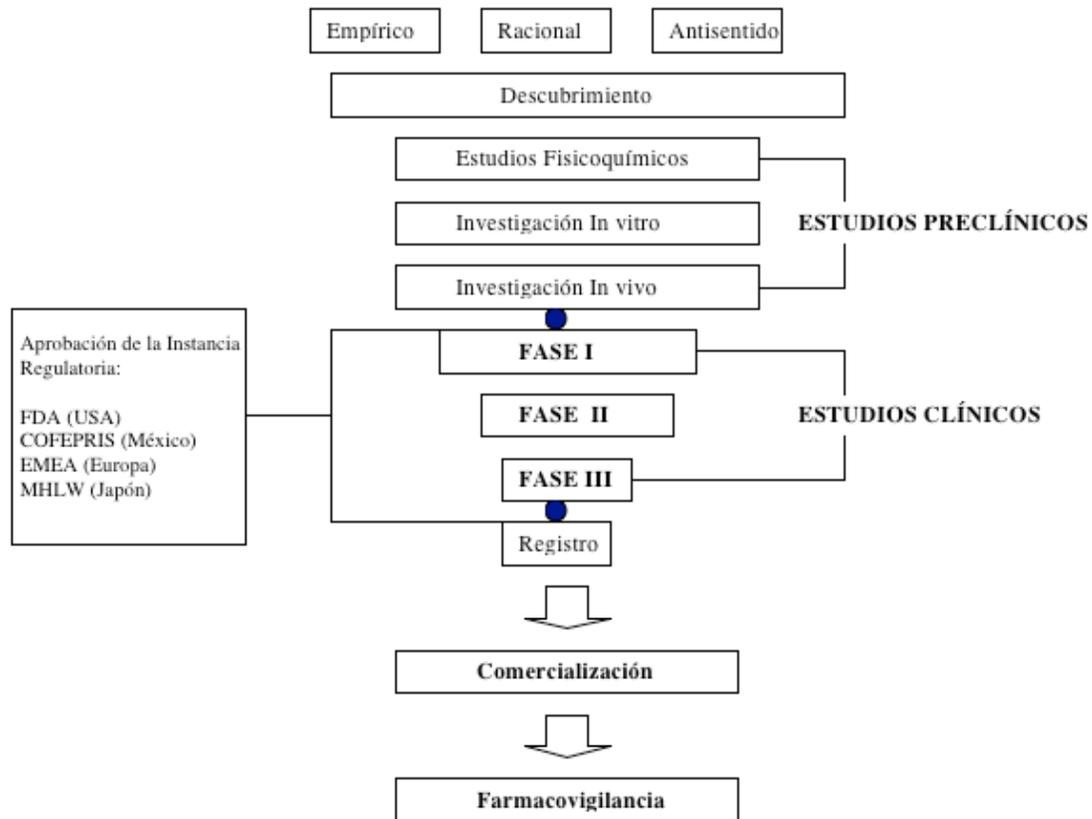


Figura 1. Proceso del desarrollo de un nuevo fármaco

Existen guías internacionales publicados por instancias gubernamentales como la FDA [15] y la EMA [16] entre otras que contiene recomendaciones que permiten evaluar de manera sistemática al candidato a fármaco. Por otra parte, es necesario conocer los procedimientos y la legislación vigente en el país en donde se pretende registrar a dicho fármaco.

La fase de descubrimiento comprende desde la obtención de la molécula hasta los estudios preclínicos inclusive y dura aproximadamente de 1 a 5 años.

En la fase de desarrollo se encuentran los estudios clínicos con sus diversas etapas (I,II,III) que en promedio se invierten 8 años. Sin embargo, en muchas ocasiones, los ensayos revelan la infactibilidad ya sea por toxicidad o ineficacia principalmente, y muchas de los candidatos no alcanzan la etapa clínica. Según estadísticas, de cada 5000 nuevos compuestos identificados durante el proceso de descubrimiento, sólo 5 son considerados seguros para ser administrados en seres humanos y después de 6 años de investigación clínica sólo uno de esos compuestos es aprobado para ser comercializado [17].

El objetivo de las etapas mencionadas, al igual que los principales estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos haciendo énfasis en los estudios para compuestos antineoplásicos se describe a continuación:

- a) **Fase Preclínica:** El tiempo invertido en esta etapa es de aproximadamente 5 años y en ella se realizan las primeras pruebas de exposición de la molécula en seres vivos. Los estudios toxicológicos en animales son uno de los ensayos que se realizan en este punto y a los cuales se les destinan una gran proporción de recursos. Según las guías de FDA, se deben trabajar con un modelo roedor y uno no roedor que generalmente es el perro o el puerco y en ciertos casos el chimpancé. Con la finalidad de poder extrapolar el comportamiento de la molécula en seres humanos, es preciso seleccionar cuidadosamente la especie animal y estará en función, entre otras cosas, de la similitud que guarde los sistemas metabólicos entre ambas especies (animales-humanos) [18,19]. Es por ello que los estudios biofarmacéuticos iniciales son los ensayos metabólicos *in vitro*, utilizando hepatocitos o microsomas humanos y de animales. A la par de estos estudios, se conducen los ensayos de absorción, distribución y eliminación.

En este punto se inician el desarrollo y la validación de métodos bioanalíticos que se utilizan para cuantificar el potencial fármaco en los fluidos biológicos. Posteriormente, con esta herramienta se realiza los estudios farmacocinéticos preclínicos o no clínicos, generando importante información como el tiempo de vida media del fármaco y la depuración. La información farmacocinética junto con los datos toxicológicos y los algoritmo alométricos [20] ayudarán a determinar una dosis inicial en seres humanos.

También, se inician las primeras pruebas para determinar la forma farmacéutica de dosificación, estudios de permeabilidad en células caco-2 y MDCK, solubilidad, mecanismo de acción y las ensayos iniciales de quimioprotectores, sustancias que tienen la función de paliar los efectos adversos que provoca el compuesto antineoplásico en estudio. En el cuadro 2 se muestran algunos estudios relevantes que deben realizarse en la etapa preclínica.

Por otra parte, y haciendo hincapié en el descubrimiento y desarrollo de fármacos con actividad antineoplásica, deben considerarse adicionalmente otros elementos dentro de la investigación por ejemplo, la presencia de un tumor en situaciones de metástasis altera varios parámetros en el cuerpo, por ende los valores farmacocinéticos también se ven afectados. De esta forma la extrapolación de los datos preclínicos se torna más compleja. Algunos autores mencionan la necesidad de tener mayor atención en algunos aspectos, como la concentración de los productos oncológicos dentro del tumor.

Cuadro 2. Estudios relevantes que se realizan en la etapa preclínica

Propiedades Fisicoquímicas (Solubilidad, pKa, estabilidad)
Ensayos en animales. Administración de dosis agudas y crónicas (toxicidad)
Desarrollo y Validación de Métodos Analíticos
Farmacocinética de dosis simple y múltiples en animales (roedor y no roedor)
Unión a proteínas plasmáticas
Metabolismo del compuesto en sistemas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
Permeabilidad
Balance de masa e identificación de rutas de excreción
Distribución tisular
Toxicogenómica
Diseño y elaboración de la forma farmacéutica
Estudios de alometría

Generalmente los fármacos son cuantificados en sangre o plasma ya que es un tejido de fácil acceso. Se espera que las concentraciones del medicamento en el mencionado tejido guarden una cierta proporcionalidad con el efecto terapéutico, de tal manera que se puede ajustar la dosis para mantener un efecto farmacodinámico deseado. Sin embargo, estudio en animales han demostrado que las concentraciones de algunos compuestos anticancerígenos en plasma o sangre no siempre son predicativos con respecto a las concentraciones en otros tejidos, particularmente en tumores; como una regla empírica se establece que la concentración de un agente antitumoral es más alta en la sangre que en el tumor, sin embargo la evidencia experimental reportada indica que la variabilidad de dichas concentraciones dentro del tejido neoplásico es elevada y más aún, depende del tipo de tumor [21].

Otro importante factor es la inflamación, situación que acompaña de forma directa a los procesos tumorales, por ejemplo, algunos componentes como la interleucina 6 o el factor TNF provocan una disminución de la actividad del citocromo P450, el principal sistema biológico responsable del metabolismo de fármacos. Algunos factores que inciden sobre la influencia de las concentraciones en el tumor se enumeran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Factores del tumor que tiene incidencia sobre la concentraciones del fármaco en el tejido neoplásico.

Factor	Características
Flujo de Sangre intratumoral	Número de venas Trombos intravasculares
Densidad Tumoral	Localización Estructura tridimensional Crecimiento del tejido neoplásico vs el necrótico
Permeabilidad	Composición extracelular Estado del drenado linfático Contenido de colágeno Presión intersticial
Metabolismo	Citocromo P450 Niveles en los transportadores de resistencia a fármacos Niveles de glicoproteína P Niveles de transportadores de nucleósidos

Con el avance del conocimiento en áreas como la genética y la biología molecular, nuevas disciplinas han incursionado en el desarrollo de los medicamentos, tal es el caso de la farmacogenómica, la cual estudia las variaciones en la respuesta farmacológica del compuesto con respecto a las características genéticas de un individuo o una población. Como la variabilidad genética es factor preponderante en la acción del fármaco, se podría estudiar el genoma para hacer inferencias sobre los efectos adversos y predicción de la dosis máxima tolerada con más exactitud antes de pasar a los ensayos clínicos Fase I, entre otras posibilidades [22].

Después de haber completado los estudios requeridos se ponen a consideración de la estancia pertinente (FDA en Estados Unidos o COFEPRIS en México, a través del Comité de Nuevas Moléculas) para continuar con los estudios clínicos en sus diferentes fases.

Fase Clínica I [23]. Esta fase está diseñada para verificar la seguridad y la tolerancia de la molécula candidata en seres humanos y tiene una duración de 6 a 9 meses. Se utiliza una cantidad pequeña de voluntarios clínicamente sanos aproximadamente de 20 a 100, (excepto para fármacos que se ensayarán para cáncer y SIDA, los cuales se realizan en enfermos terminales).

Aunque el protocolo clínico en esta etapa está primordialmente avocada a la seguridad, se realizan los primeros ensayos farmacocinéticos en seres humanos, obteniendo parámetros fundamentales para la clínica como los son la depuración y el tiempo de vida media del fármaco en humanos, también se estudia como actúa el fármaco en el cuerpo con base en el sistema ADME y se buscan cuales son o si existen metabolitos de la molécula en estudio. Los estudios clínicos fase I para molécula anticancerígenas se realizan en pacientes que tienen un problema de tumor refractario o su proceso cancerígeno sea severo. Los pacientes con problemas hepáticos o renales (elevada creatinina en suero o enzimas hepáticas) son generalmente excluidos de los estudio Fase I. El objetivo principal de esta fase en productos antitumorales es el determinar la dosis máxima tolerada (DMT) –es una fase que tiene como objetivo la seguridad en primera instancia- que definirá en una primera etapa el régimen de dosificación en humanos y una ruta de administración para el nuevo compuesto antineoplásico. La DMT se define de acuerdo al criterio de toxicidad.

Los supuestos del inicio de la dosificación se basan en la premisa de la correlación lineal que existe entre la dosis (en el intervalo establecido) y la respuesta farmacodinámica. Una gran parte de los fármacos se comportan de esa manera, en donde la diferencia entre las curvas sigmoideas de dosis tóxica (DMT) y efectiva es muy pequeña. Por otra parte, con algunos compuestos la diferencia entre los dos parámetros descritos es grande, por lo que se necesitan otras herramientas para poder determinar una dosis óptima, y generalmente se utilizan modelos farmacocinéticos-farmacodinámicos. En cuanto al esquema de dosificación, éste depende entre otras variables del lugar blanco o diana, si el compuesto es citotóxico sólo en una parte de la fase del ciclo celular y de la farmacocinética preclínica, en donde el escalamiento del tiempo de vida media es importante. Por ejemplo, en los casos en donde el agente antineoplásico tenga efectividad sin importar el estadio del ciclo celular, tiene un tiempo de vida media larga (mayor a 48 horas) y produce mioelosis diez días después de una simple dosis, se recomienda administrar dicho citotóxico en un intervalo posológico de 3 semanas. En el caso contrario, cuando el tiempo de vida media del compuesto es corto y solo sea activo en una parte del ciclo celular, se realiza una infusión intravenosa prolongada con la finalidad de exponer dicho compuesto en concentraciones sostenidas lo más posible a el blanco.

El objetivo secundario de las pruebas clínicas Fase I usualmente incluye la caracterización farmacocinética asociado al compuesto de estudio. Los estudios modernos que se realizan en esta fase son los estudios farmacodinámicos moleculares y farmacogenéticos que están diseñados para evaluar los sitios de acción y la influencia del polimorfismo genético y los llamados “endpoints”, o puntos máximos tolerados para una variable en particular. Otra diferencia entre el estudio clínico Fase I de moléculas regulares con respecto a compuestos antineoplásicos radica en que en estos últimos si se observa una respuesta positiva en la cura cuando se administra el quimioterapéutico, la dosificación se puede prolongar desde días hasta meses, incluso años. En el otro caso, para compuestos comunes, generalmente sólo se aplica una sola dosis del compuesto a los voluntarios y se determinan los parámetros de estudio.

Cabe mencionar que aunque los estudios preclínicos tienen una invaluable importancia y proveen de datos relevantes, en el caso de las entidades antineoplásicas no siempre tienen una gran capacidad de predicción en cuanto a la relación del régimen de dosificación y la eficacia y toxicidad en los seres humanos, por lo cual los estudios clínicos Fase I se realizan bajo esta temática y en muchas ocasiones en paralelo en diversas instituciones.

Fase Clínica II [24] . El objetivo de esta fase es el de determinar la efectividad del compuesto y proseguir con la evaluación de la seguridad. Dependiendo de las características de la molécula puede invertirse en tiempo desde 6 meses a tres años en la investigación. En esta etapa, el fármaco se administra a un centenar de pacientes y se llevan a cabo los estudios de farmacocinética clínica. Con los valores arrojados por los estudios farmacocinéticos y los farmacodinamia se establecen la mínima y máxima dosis que se puede utilizar (intervalo terapéutico).

En los estudios Fase II para anticancerígenos, una de las premisas fundamentales que se sigue es la determinación de la eficacia del compuesto en cuestión con base al intervalo de dosis obtenida en la Fase I. Por otra parte, se ajustan con base en el efecto los esquemas de muestreo utilizando un número mayor de pacientes. En esta etapa de la investigación se realizan las pruebas en varios tipos de tumores (de 1 a 10 variantes) y se realizan también estudios farmacocinéticas en una escala mayor que en la Fase I.

Una de las causas por las cuales un fármaco antineoplásico falla es por presentar un mínimo efecto terapéutico a una dosis estimada. Por el contrario, para agentes que presentan buena eficacia pero una considerable toxicidad, el estudio continúa al administrar al paciente fármacos que puedan contrarrestar los efectos adversos de la molécula a estudio.

Fase Clínica III [25]. En este punto se completa la información de efectividad y seguridad al administrar el fármaco a un número elevado de pacientes (de ciento a miles) y se afina el régimen de dosificación. También se realizan, según el caso, los estudios en poblacionales especiales, como pacientes infantiles y geriátricos si aplica. En esta fase se invierten de 1 a 4 años.

En países como Estados Unidos, Gran Bretaña y México el proceso de toda la etapa preclínica y clínica se documenta y se pone a consideración de la instancia de salud competente para obtener el registro del nuevo medicamento. También se realizan estudios de comparación en cuanto a eficacia con fármacos registrados. La investigación presentada debe proporcionar la evidencia contundente de que el compuesto tiene la actividad farmacológica descrita, y que es efectiva y segura bajo las condiciones posológicas establecidas. Típicamente el proceso de aprobación tarda de seis meses a dos años.

Posteriormente, y ya cuando el compuesto ha sido aprobado para su comercialización, la farmacéutica puede conducir estudios adicionales en los cuales se invierte de meses hasta varios años. Las fase son:

- b) Fase IIIb /IV. La Fase IIIb es un extensión de la Fase III, en donde se sigue monitoreando el comportamiento del fármaco en los pacientes en cuanto a efectividad. La Fase IV tiene como objetivo conocer la efectividad del fármaco a largo plazo y la relación costo/beneficio en relación a otros productos farmacéuticos que son utilizados para la misma enfermedad.
- c) Estudios post-aprobatorios. Estos estudios se centran en conocer efectos adversos que en la etapas posteriores a la Fase III no se han identificado (Farmacovigilancia), o encontrar factores de riesgo y/o también estudios del fármaco en otras poblaciones (Farmacocinética poblacional).

2.1.3 Investigación preclínica y clínica en Estados Unidos, Europa y México.

En Estados Unidos la instancia gubernamental que realiza esta investigación es el National Cancer Institute (NCI por sus siglas en inglés). Esta instancia gubernamental, a diferencia de otras instancias de salud, tiene la capacidad técnica de conducir la investigación preclínica y clínica. Por otra parte, es muy común que este órgano de salud participe activamente con empresas farmacéuticas en estudios cruzados y asesorías en torno a este tema. Los programas que el NCI tiene para la evaluación preclínica y clínica son el Developmental Therapeutic Program y Cancer Therapy Evaluation Program, respectivamente.

En el caso de Europa, además de las empresas transnacionales, se reconocen dos grandes instancias académicas que se dedican al desarrollo de nuevos fármacos: la European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) y la Cancer Research U.K. En particular el propósito de EORTC es el de promover y coordinar los esfuerzos en la investigación básica y clínica en el ámbito del estudio de moléculas con potencial anticancerígeno.

Los países de Europa han conformado una red académica que permite acercar grupos de investigación de diversas áreas que colaboran de manera activa en el ámbito preclínico y clínico. De esta manera el trabajo se distribuye y se conforman grupos altamente especializados en ciertas pruebas.

Como este esfuerzo se realiza en diversos países y con el fin de adoptar las nuevas leyes y directrices de la Comunidad Europea, así como la legislación internacional sobre las buenas prácticas clínicas, se desarrolló el “Programa de desarrollo de Nuevos Fármacos” una metodología que armoniza estos parámetros y cumple con los estándares internacionales.

En toda Europa existen alrededor de 50 centros de investigación altamente especializados en los estudios preclínicos y clínicos que son denominados en su conjunto NDDG (New Drug Development Group) [26].

En nuestro país, México, una gran proporción de la investigación en torno al descubrimiento de nuevas moléculas se da en las instituciones académicas. Sin embargo, es preciso hacer notar que la etapa básica se ha descuidado y constituye un obstáculo para la investigación de nuevas moléculas. Por otra parte, se ha avanzado de manera importante en la etapa de formulación (desarrollo de formas farmacéuticas) y últimamente en los estudios clínicos de Fase I a III.

Las principales empresas e instituciones mexicanas líderes en la solicitud de patentes en el periodo 1996 al 2002 son el Instituto Mexicano del Petróleo, la UNAM y el CINVESTAV, en todas las áreas. Por otra parte, del lado de las empresas mexicanas sobresalen el grupo Mabe y Silanes. Dentro de las empresas e instituciones extranjeras destacan: la farmacéutica “The Procter & Gamble Company” (EUA) con 396 solicitudes, “Kimberly Clark Worldwide, Inc” (EUA) con 296, farmacéutica “Bayer Aktiengesellschaft” (Alemania) con 296 y “BASF Aktiengesellschaft” con 221 [27].

Hoy en día en México y con base en las recomendaciones de la OMS se trabaja en políticas farmacéuticas que tienen como objetivos expresar y priorizar las metas a mediano y largo plazo establecidas por el gobierno para el sector farmacéutico, al igual que trabajar en las estrategias para alcanzarlas. Abarca tanto los sectores tanto público como privado, e implica a todos los protagonistas del ámbito farmacéutico. En el año 2005 la Secretaría de Salud publicó el documento titulado “Hacia una política Farmacéutica Integral para México”, una acción que se considera un avance en el campo de la promoción del desarrollo de nuevos medicamentos y otros importantes temas del ámbito farmacéutico, dando a conocer una serie de medidas para agilizar su avance con la finalidad de que el sector más competitivo en beneficio de la salud de la población. Algunas estrategias que describe este documento, entre otras, son el aseguramiento de la calidad farmacéutica de los principios activos mediante la adherencia a las buenas prácticas de fabricación de fármacos, el fomento en el uso seguro de los medicamentos, facilitar la clasificación y garantizar la seguridad del uso de productos herbolarios y vitamínicos, reglamentar la disposición con una perspectiva de seguridad y eficacia y reforzar el programa de farmacovigilancia [28].

2.2 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS: PRINCIPIOS Y RECOMENDACIONES

En diversos campos del ámbito científico la identificación o la cuantificación de ciertos compuestos que se encuentran en matrices biológicas (como son la sangre, la orina, la saliva etc.) es una herramienta básica que permite establecer paradigmas con base en una hipótesis en particular. Por ejemplo, en la industria farmacéutica para investigar si existe bioequivalencia entre dos productos comerciales es necesario obtener ciertos parámetros farmacocinéticos derivados de la cuantificación del analito de interés en plasma (u otro fluido) de los voluntarios; en el campo del deporte, la identificación de sustancias prohibidas en atletas de alto rendimiento se puede establecer gracias a los métodos bioanalíticos; en la clínica, el conocimiento de la cinética que presenta una sustancia con actividad terapéutica permite establecer un régimen de dosificación que ayuda al paciente a restablecer la salud.

Se denomina método bioanalítico al conjunto de procedimientos que involucran la recolección, el almacenamiento, el procesamiento y el análisis de un analito que se encuentra en un fluido biológico [29]. Con el fin de obtener dicho método es necesario, en primera instancia, encontrar las condiciones óptimas para que el o los analitos sean analizados y por otra parte se debe demostrar que el procedimiento se comporta de manera consistente. De esta forma, la obtención de un método bioanalítico consta de dos etapas fundamentales: el desarrollo del método y la validación.

2.2.1 Desarrollo de un método bioanalítico

El desarrollo de un método bioanalítico o etapa de prevalidación, es herramienta utilizada en el ámbito farmacocinético y biofarmacéutico, es una de las etapas que más tiempo y esfuerzo consumen para la obtención del procedimiento; es por ello que se recomienda, como primer paso, reunir información que pueda conducir de manera exitosa a la obtención del método bioanalítico. Entre los puntos que se deben tomar en consideración se encuentran los siguientes:

- Las propiedades fisicoquímicas del analito
- Las concentraciones en el fluido biológico que se esperan
- El tipo de matriz biológica
- Posibles interferencias con compuestos endógenos
- Estándar interno /externo
- Si el método es de carácter cualitativo o cuantitativo
- El límite de detección que se necesita
- El rango de concentraciones en el cual puede encontrarse el analito en la muestra
- La precisión y la exactitud requerida
- La robustez del método
- El mejor instrumento para realizar la medición
- Disposición de los equipos e insumos
- Si el método sólo será utilizado en un laboratorio o será aplicado en otros laboratorios alrededor del mundo
- Los requerimientos de órganos legislativos [FDA (Estados Unidos) , EMEA (Europa), SSA (México)]

El inicio del desarrollo de un método bioanalítico se inicia con el conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y la matriz biológica en la cual se encuentra dicho analito. El conocimiento relativo al compuesto como el pKa, solubilidad en varios disolventes como agua, metanol, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, hexano, diclorometano (aunque en desuso, por las nuevas políticas ambientales), la estabilidad y el peso molecular son de vital importancia para planear un sistema de extracción. En el caso del analito y el estándar interno (definido más adelante), es preciso realizar pruebas de estabilidad en las soluciones primarias con las cuales se prepararán las muestras. Se deberá tomar en cuenta el tiempo en el cual se consideran estables dichas sustancias a temperatura ambiente y documentar si es necesario que las soluciones se encuentren en refrigeración y/o protegidas de la luz.

Es recomendable, antes de iniciar el proceso de extracción, eliminar la mayor parte de los componentes de la matriz biológica que puedan interferir en el proceso. Los principales fluidos que son utilizados para determinar un analito en el ámbito farmacocinético son la sangre, el plasma, el suero, la orina, el fluido cerebrospinal, las heces y, en menor medida la bilis, la saliva y otros tejidos como el muscular. Dependiendo del fluido biológico la limpieza de la muestra deber ser más o menos estricta.

La sangre es el fluido más complejo de los antes mencionados. Consiste en un fluido con un sistema de amortiguación de pH, proteínas solubilizadas, grasas disueltas, una gran variedad de sustancias endógenas y células suspendidas como los eritrocitos, entre otros componentes. La separación debe realizarse con especial cuidado, ya que si la sangre no se trata correctamente, se puede provocar la liberación de sustancias que pueden interferir fuertemente en la extracción del analito de interés. Por ejemplo al cambiar las propiedades osmóticas de la muestra, puede conducir a la lisis celular de los eritrocitos y la liberación de iones de hierro, los cuales, dependiendo de la naturaleza del compuesto, pueden quelar al analito, provocando una pobre extracción en fase acuosa .

El plasma es uno de los fluidos biológicos preferidos para realizar los estudios farmacocinéticos. Se obtiene fácilmente después de centrifugar la sangre por un determinado tiempo. Sin embargo, algunos fármacos presentan tendencia a unirse firmemente a algunas proteínas plasmáticas como lo son la albúmina y la alfa-glicoproteína. Si la metodología propuesta indica que se centrifuge la muestra antes de liberar al principio activo, en el sobrenadante se encontrarán cantidades ínfimas del compuesto de interés, lo que conlleva a tener una pobre sensibilidad al realizar el análisis. Lo que aplica en estos casos, es adicionar una sustancia o mezcla de sustancias que permitan romper la unión fármaco-proteína antes de realizar la centrifugación. Sin embargo, el conocimiento de la estabilidad del analito es fundamental, ya que algunos reactivos reducen drásticamente el pH de la solución al adicionarlos a la muestra, lo que puede implicar una degradación del analito y otros pueden reaccionar. Algunos agentes comunes para la precipitación de proteínas se muestran en el cuadro 4. Los estudios en orina tienen la ventaja de no ser procedimientos invasivos y generalmente dicho fluido se encuentra libre de proteínas o lípidos, lo que hace que la metodología de extracción líquido-líquido sea un buen candidato para aislar el analito. Por otra parte, es recomendable contar con sistemas considerablemente sensibles, ya que cuando el paciente ha tomado una cantidad considerable de agua, después de la micción, el analito se encuentra altamente diluido en la muestra [30,31].

Uno de los puntos fundamentales dentro del desarrollo analítico es la selección del estándar interno, un compuesto con estructura similar al analito que se quiere analizar, de concentración conocida y constante y que se adiciona en la muestra antes de iniciar el proceso de extracción. El objetivo del estándar interno es el de corregir el valor de la cantidad recuperada debido a variaciones en el proceso de extracción. La base fundamental de esta herramienta en el análisis de fluidos biológicos puede describirse de la siguiente manera: al colocar el estándar interno en la muestra que contiene el analito de interés, experimentará todos los procesos involucrados en la extracción del compuesto a analizar, de esta forma la cantidad perdida del analito se reflejará en la del estándar interno. Las respuestas de ambas entidades después del análisis en el detector son comparadas calculando la proporción entre ellas (Analito/EI). Como las pérdidas de masa entre ambas especies son proporcionales, el cociente entre ellas permanece constante. Cabe mencionar que aunque es muy útil el uso del estándar interno para corregir las diferencias en el recobro del analito a analizar, en el desarrollo de la metodología bioanalítica debe optimizarse todo lo necesario para minimizar las variaciones que puedan presentarse. En



una etapa posterior, el estudio del comportamiento del estándar interno indicará fehacientemente que tan controlado se tiene dicho proceso.

Otra modalidad es el uso del estándar externo (EE). En este caso después de la extracción y antes de inyectar la muestra preparada al equipo en el que se va a analizar, se adiciona una concentración conocida de una sustancia determinada, que generalmente tiene características estructurales similares al analito de interés. En este caso, no se puede corregir las pérdidas por extracción y sólo se limita a verificar lo que se denomina como la adecuabilidad del sistema (“system suitability”), que indica si el instrumento de cuantificación se encuentra en estado óptimo para realizar el análisis. En este caso, también se realiza la relación de analito/EE.

Cuadro 4. Procedimientos utilizados en la precipitación de proteínas plasmáticas.

Disolvente para la extracción	Características
Etanol	Una relación Muestra/Etanol (1:2) es necesaria para la desnaturalización completa proteínas. Recomendado en el caso de fármacos sensibles a pH's bajos.
Acetonitrilo	1.5 volúmenes de ACN es requerido para la completa desnaturalización de proteínas.
Cloruro de Aluminio	Buen precipitante para compuestos básicos.
Ácido Perclórico	Excelente eficiencia. No recomendado para compuestos que se pueden degradar a pH inferiores a 3. El reactivo es necesario mantenerlo frío para evitar explosiones.
Solución de Sulfato de Amonio saturado	Moderadamente eficiente. La solución se encuentra aproximadamente a pH = 7.
Sulfato de Zinc/ NaOH	Excelente eficiencia. La solución tiene un pH cercano a 7.
Ácido tricloroacético	Buena eficiencia. Algunas veces la remoción del reactivo es complicada.

También el conocimiento conjunto de el intervalo de concentraciones esperada y los máximos de absorción en UV que presenta el compuesto, su espectro de fluorescencia, cromatografía en capa fina, espectro de resonancia magnética nuclear y espectro de masas, ayudará a seleccionar el mejor detector para determinar el analito de interés.

Hoy en día, uno de los principales detectores con los cuales se realizan estudios farmacocinéticos, de metabolismo y permeabilidad es el espectrómetro de masas [32,33] el cual tiene diferentes tipos de procesamiento, que dependiendo del objetivo, puede ser seleccionados. Por ejemplo, el espectrómetro de masas que utiliza un sistema de trampa de iones (MS-IT) se recomienda que cuando se realizan estudios de metabolismo, ya que



puede fragmentar a los iones en transiciones sucesivas (MS^n) a algún producto resultado de la biotransformación con la finalidad de conocer la estructura del compuesto en cuestión. Por otra parte, los espectrómetros de masas de cuadropolo simple y triple cuadropolo (QQQ) tiene una alta sensibilidad y son altamente reproducibles en procesos de cuantificación, por lo que son los mejores candidatos en los estudios de bioequivalencia. También ya en el mercado existen los sistemas híbridos que se componen de dos o más tipos de detectores, aumentando sus ventajas, sin embargo tienen un costo muy elevado.

Los detectores espectrométricos han incrementado sustancialmente la sensibilidad de los métodos bionálticos, sin embargo, cuando un remanente del analito bajo investigación se adhiere, por ejemplo, en alguna zona del sistema cromatográfico (inyector, goma del asiento, columna etc.) es posible que al realizar la siguiente inyección dicho analito se desprenda y se adicione a la muestra siguiente, provocando un aumento de la señal cromatográfica. Este fenómeno es llamado efecto de memoria o acarreo (“carry over”) y tiene una inferencia importante en las concentraciones más bajas de la curva de calibración afectando, principalmente, la exactitud y precisión del método [34]. Este fenómeno se puede investigar inyectando después de la muestra un blanco de sistema (fase móvil). Si en el espectrograma del blanco se aprecia respuesta este fenómeno esta presente. En esos casos, es imprescindible que después de cada inyección, se programe un método de lavado en donde se limpie la aguja, el asiento y/o todo el sistema después de cada inyección.

Por otra parte, con base en el tipo de análisis que se desea llevar a cabo serán los puntos que se requieren para verificar por medio de la validación si el método funciona para lo que fue creado. Por ejemplo, si el método es desarrollado para la determinación cualitativa de compuestos a niveles de trazas, no será necesario determinar el parámetro de validación conocido como límite de cuantificación o linealidad . En contraste, para estudios de farmacocinética, los estudios antes mencionados deberán ser evaluados. Los parámetros de validación a detalle se describen en la sección 2.2.2.

En este punto, y con la información recabada, se inicia el trabajo experimental del desarrollo en donde los experimentos empíricos y el diseño de experimentos son instrumentos que permitirán encontrar las mejores condiciones para analizar el analito de interés. Es recomendable antes de iniciar la validación formal realizar un ensayo exploratorio (prevalidación), determinando los valores de algunas directrices de la validación, lo que ayudará a optimizarlo y a visualizar el alcance del mismo. Con base en tipo de ensayo se deberán seleccionar los parámetros de validación a evaluar. Por ejemplo, si se realiza el desarrollo de un método para su aplicación en un estudio de farmacocinética al menos cuatro parámetros deberían ser explorados: la selectividad, el efecto de la matriz, el límite de cuantificación (lo que indicaría la sensibilidad, un punto importante en este tipo de estudios) y la linealidad (en donde se observaría el comportamiento de la respuesta con respecto a la concentración, indicando el tipo de sistema-lineal, cuadrático, doble lineal-con el cual se ajustan los datos).

2.2.2 Validación

Al haber encontrado las condiciones idóneas para el análisis de la sustancia deseada es necesario, como segundo paso, evaluar si el proceso desarrollado se comporta de manera consistente. Es por ello que nace la necesidad de validar los métodos bioanalíticos, lo que confiere confianza científica en los resultados experimentales obtenidos durante un estudio.

Hartman et al. define a la validación como “el proceso documentado de que el método bajo consideración funciona para el propósito indicado” [35]. En 1998, la disertación de Saha y colaboradores proponen que “el método de validación involucra todo los procedimientos requeridos para demostrar que un método en particular que tiene como fin la determinación cuantitativa de un analito (o serie de compuestos) en una cierta matriz biológica es confiable” [29]. Otro grupos sólo indican que la validación es la prueba de la repetibilidad, la especificidad y la competencia del método.

Los primeros esfuerzos por armonizar los parámetros y los criterios de validación se dieron en el año de 1990, cuando se organizó un congreso en donde participaron diversos representantes del ámbito académico y del sector industrial a nivel mundial. Los grupos organizadores y participantes fueron la American Association of Pharmaceutical Scientist, the United States Food and Drug Administration, The International Pharmaceutical Federation, the Health Protection Branch y the Association of Analytical Chemists. El objetivo fundamental de la reunión de trabajo fue el de definir los parámetros importantes de validación y como evaluarlos. Como producto del trabajo del mencionado congreso la FDA publicó los acuerdos a los que se había llegado en la revista científica *Journal of Pharmaceutical Research* [36] y en otras revistas científicas más [37,38], con la finalidad de diseminar lo mejor posible la información. Las nuevas recomendaciones fueron bien recibida por la comunidad científica. Después de 9 años, en 1999, se publicó un documento en forma de guía publicada por la FDA, que reunía los avances en torno a este tema

En 1994 la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, por sus siglas en inglés) emitió 2 documentos, uno en el citado año [39] y otro en 1996 [40] referente a la validación de métodos analíticos en donde se aprecian los criterios generales que en su conjunto Estado Unidos, Europa y Japón coinciden para la validación de métodos analíticos. Cabe resaltar que este trabajo de los expertos es uno de los primeros intentos para “armonizar” los criterios y parámetros a nivel internacional .

El segundo congreso de armonización sobre la validación de métodos bioanalíticos se realizó en enero de 2001. Se discutieron diferentes categorías de validación las cuales fueron nombrados como validación parcial, validación cruzada y validación total. Por otra parte con el advenimiento de nuevas tecnologías, como el uso del espectrómetro de masas como detector, indujo a nuevas recomendaciones y parámetros que deberían ser considerados en la validación (concretamente el efecto de la matriz). El foro reunió nuevamente a científicos del todo el mundo compartiendo las experiencias en la validación de los métodos bioanalíticos en donde se discutieron casos experimentales y se



establecieron optimizados criterios de aceptación. Los acuerdos a los que se llegaron en este última reunión dieron origen a una guía de recomendaciones avalada por la FDA y otras instituciones [41].

Otros organismos han realizado trabajos colegiados para definir los parámetros necesarios para determinar la validación de métodos analíticos y han publicados sus documentos, sin embargo debido a la diferencia en terminología, recomendaciones y criterios de aceptación, las guías de organizaciones como la IUPAC (International of Pure and Applied Chemistry) [42], USP (United State Pharmacopoeia) [43], la AOAC (Association of Oficial Analytical Chemist) [44], EUROCHEM [45] y la EMEA (European Medicines Agency) [46] , entre otras, difícilmente podrían ser unificadas para establecer un documento único relativo a la validación de métodos analíticos.

Una de las guías que la comunidad científica se ha basado de manera internacional para la validación de métodos bioanalíticos es la publicada por la FDA [47]. A continuación se describen los puntos que conforman en su conjunto las pruebas para demostrar que el método es confiable según la mencionada guía. Este documento fue publicada en enero de 2001, por lo que a través del tiempo se han perfeccionado y puntualizado definiciones y metodologías en pos de optimizar los criterios de validación, es por ello que en algunos tópicos se incluyen algunas observaciones con base en escritos publicados en la literatura científica. Cabe resaltar que la validación de los métodos en fluido biológico realizada en la presente tesis están basados en las recomendaciones de esta guía.

La validación en este documento se divide en tres categorías:

- a) Validación completa. Es la validación que se debe de realizar cuando un método bioanalítico va a ser desarrollado e implantado por vez primera. Con este tipo de validación se sustenta los resultados obtenidos en los estudios de farmacocinética, biodisponibilidad , bioequivalencia y en los estudios analíticos de interacción medicamentosa.
- b) Validación parcial. Se aplica la validación parcial cuando a un método previamente validado se le realizan ligeros cambios para cuantificar el analito de interés bajo otras condiciones. Algunos cambios típicos incluyen transferencia del método bioanalítico entre laboratorios o analistas, cambios en la metodología analítica (diferente volumen de muestra o calor aplicado cuando se usa el rotavapor, tiempo de concentración de la muestra en el evaporador, cambio de agente precipitante de proteínas, cambio de matriz biológica entre especies, etc.). Dependiendo del tipo de cambio efectuado se deben determinar específicamente los parámetros de validación que deber ser revalorados.
- c) Validación cruzada. Este tipo de proceso indica la comparación de los parámetros de validación entre dos o más métodos bioanalíticos que sirven para cuantificar a un mismo analito o analitos (por ejemplo, entre un método cromatográfico-fluorescencia versus un ensayo por radio inmuno análisis (RIA)).

Los parámetros fundamentales que son necesarios para demostrar que un método bioanalítico es considerado validado son la precisión, la exactitud, la selectividad, la sensibilidad (límite de cuantificación), la reproducibilidad y la estabilidad. De manera típica, las principales muestras para evaluar la validación son las preparadas para la curva patrón (si es sistema lineal 5 muestras como mínimo sin incluir el blanco) y los puntos control (PC) que son muestras cargadas a tres niveles (alto, medio y bajo) que se encuentran dentro del rango de concentraciones de la curva patrón y puntualmente no coinciden con ninguna concentración del sistema de la mencionada curva (no se repiten). A continuación se describe las definiciones, los criterios y las recomendaciones de todos los parámetros de validación.

2.2.2.1 Selectividad

La selectividad, según el documento de la FDA, se refiere a la capacidad de un método analítico en determinar de manera inequívoca la respuesta del analito de interés en presencia de otros compuestos contenidos en la muestra (e.g., en el caso de la CLAR-UV, en donde es factible apreciar otras señales cromatográficas además del compuesto a cuantificar). Las recomendaciones indican que para realizar esta prueba es necesario analizar blancos de la matriz biológica en cuestión (plasma, orina, sangre, etc.) de 6 diferentes lotes para asegurar que en el tiempo de retención del analito a cuantificar ninguna sustancia interfiera con dicha señal. También es importante considerar durante esta prueba sustancias xenobióticas que presuntamente puedan interferir con este parámetro.

Es importante hacer notar que algunos autores hacen hincapié entre la diferencia entre selectividad y especificidad. Se dice que un método es específico cuando el método bioanalítico sólo responde al compuesto a analizar (de manera específica, por ejemplo, en la cuantificación por radio inmuno análisis, sólo se detecta el compuesto deseado).

2.2.2.2 Efecto de la matriz

Un parámetro relevante que se debe determinar especialmente en sistemas en donde se hace uso del espectrómetro de masas como detector del analito es el efecto de la matriz. Este fenómeno se presenta cuando la ionización del compuesto bajo estudio es modificada por el efecto de otras sustancias que coeluyen con él.

El primer reporte de esta condición fue publicado por Tang y Kebarle quienes demostraron que para ciertas bases débiles la respuesta disminuía al incrementar la concentración de otros compuestos que se encontraban en la misma muestra [48].

La FDA en su documento sobre la validación de métodos bioanalíticos emitido en el año de 2001 hace referencia a la supresión iónica. Indica, según el escrito, que es necesario investigar la contribución de este efecto, con la finalidad de no comprometer parámetros tan importantes como la precisión, la sensibilidad y la selectividad; sin embargo no indica

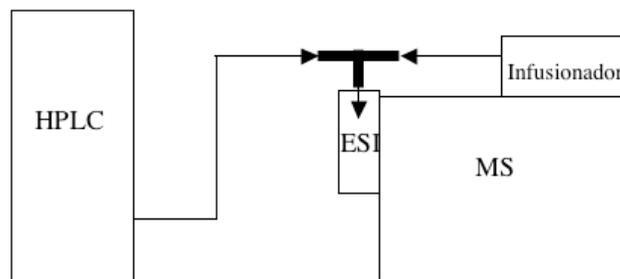


como poder investigar el efecto de matriz de manera experimental y tampoco criterios de aceptación, por lo que los científicos quienes desarrollan y validan los métodos bioanalíticos han tratado de eliminar el efecto de matriz e indicando este fenómeno como “no considerable” o “despreciable” en las comunicaciones.

En la literatura se describen dos métodos generales que comúnmente se utilizan para determinar el efecto de la matriz: el sistema de infusión continuo [49] y el descrito por Matuszewski y colaboradores que se refiere a la carga posextracción [50].

En el primer caso (figura 2) se establece un flujo de fase móvil que pasa del cromatógrafo de líquidos al espectrómetro de masas. Por otra parte, en el sistemas del electrospray (ESI) se infunde una cantidad constante del analito de interés en fase móvil (los dos flujos, del HPLC y la bomba de infusión convergen en el ESI). Una muestra blanco (matriz procesada sin analito) se inyecta en el cromatógrafo. Si existen compuestos que afectan la ionización de la sustancia bajo estudio, se observará un descenso en la línea base que será crítico si dicho fenómeno se presenta en el mismo tiempo de retención en donde se espera la señal cromatográfica del compuesto a analizar.

Figura 2. Esquema de conexiones en un ensayo de supresión iónica por el método de infusión.



Matuzewski *et al.* proponen una manera cuantitativa de establecer el efecto de la matriz. En este procedimiento se calcula el porcentaje de efecto de matriz (%EM) al relacionar la respuesta obtenida de un blanco procesado y adicionado con el analito después de la extracción ($R_{\text{postextracción}}$) versus la respuesta analítica del compuesto en solución a la misma concentración ($R_{\text{solución}}$). Dentro de las recomendaciones se establece la necesidad de procesar y probar al menos 5 lotes del fluido biológico en donde la muestra yace.

$$\%EM = \frac{R_{\text{postextracción}}}{R_{\text{solución}}}$$

Si el % EM es menor a 100, indica que existe un fenómeno de supresión iónica. Cuando %EM > 100, el agente (o agentes) que coeluye (n) mejora (n) las propiedades de ionización del analito de interés. Si %EM= 100 se dice que no hay efecto de matriz. Sin embargo, los autores, no se aventuran en establecer una recomendación en cuanto a un valor definido de %EM como criterio de aceptación.

En este punto cabe mencionar que comúnmente los términos de efecto de la matriz y supresión iónica han sido utilizados como sinónimos; sin embargo, no es correcto, ya que la supresión indica una de las posibilidades que puede suscitarse en este fenómeno.

En el año de 2010 la EMA publicó una guía en donde en su apartado de evaluación del efecto de la matriz indica un procedimiento para determinarlo e indica un criterio de aceptación [46]. El criterio discriminante es el Factor de Matriz (FM) que se calcula dividiendo la respuesta normalizada (respuesta de la muestra dividida entre la respuesta del estándar interno del blanco con adición del analito posextracción) entre la respuesta normalizada del analito sin matriz (en solución).

Las recomendaciones de la guía de la EMA indican que la concentración que debe probarse es la correspondiente al límite de cuantificación por triplicado (máximo). Además deben procesarse y examinarse al menos 6 lotes del fluido biológico en cuestión. El %CV de MF entre los lotes a la mencionada concentración no debe ser mayor del 15%.

2.2.2.3 Linealidad

Este parámetro indica la relación que existe entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito en estudio. Generalmente se trabajan con estructuras matemáticas del tipo $ax+b$, de manera directa o por ponderación ($1/x$, $1/y$ etc.). Las recomendaciones indican que se deberá realizar una curva de calibración por cada analito a cuantificar en la muestra, las cuales deben haber sido preparadas en el fluido biológico a tratar. El intervalo de trabajo deberá establecerse con base en las probables concentraciones del analito en el ensayo a realizarse. Por otra parte, es recomendable que la curva posea de seis a ocho niveles de concentración, un blanco (muestra de la matriz procesada) y una muestra cero (matriz procesada y estándar interno). La relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito debe ser continua y reproducible.

La guía de la FDA no refiere directamente sobre un parámetro o valor específico para demostrar la linealidad (r , r^2), sin embargo indica que es necesario demostrar dicha propiedad en base a la variación estadística. De manera general, la comunidad científica ha demostrado la linealidad de los métodos bioanalíticos evaluando el coeficiente de correlación (r) o al coeficiente de determinación (r^2). Algunos autores reportan también la variación de la ordenada al origen y la pendiente. Sin embargo, existe evidencia de que en algunos casos son insuficientes estos parámetros para determinar la linealidad, por lo que se recomienda hacer un análisis estadístico más exhaustivo [51].

En procesos en donde la respuesta analítica no sea directamente proporcional a la concentración del compuesto a estudio, es permitido establecer otro tipo de sistemas matemáticos para establecer la curva de calibración; sin embargo, deben considerarse un mayor número de niveles y encontrar un sistema estadístico adecuado para evaluarla.

2.2.2.4 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación es definido como la mínima concentración que el método bioanalítico puede determinar de manera precisa y exacta. En la mayoría de los casos se define el mínimo nivel de la curva de calibración como el LC.

Por otra parte debe cumplir con los siguientes postulados:

- La respuesta a la concentración que se indique como LC debe ser por lo menos 5 veces mayor a la respuesta que posee el blanco.
- La respuesta al LC debe ser totalmente identificable, discreta y reproducible con una precisión aceptable (%CV menor al 20%) y una exactitud entre $\pm 20\%$ del valor nominal.

2.2.2.5 Exactitud

La exactitud de un método indica la cercanía de los valores obtenidos experimentalmente con respecto a los valores (concentraciones) considerados como reales (teóricos). Para determinar este parámetro de validación es necesario procesar (por lo menos) 5 curvas a tres diferentes concentraciones (Puntos control -PC- alto, medio y bajo). El porcentaje de coeficiente de variación (%CV) obtenido para cada nivel de concentración y al compararlo con el valor nominal (teórico) debe ser menor al 15% y se permite hasta un 20% para el nivel más bajo. Alternativamente, algunos autores reportan este parámetro a través de la desviación estándar absoluta, la cual se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\%DEA = \left| \frac{Cp_{exp} - Cp_{teo}}{Cp_{teo}} \right| * 100$$

en donde

Cp_{exp} = Concentración plasmática experimental

Cp_{teo} = Concentración plasmática teórica

%DEA = Porcentaje de Desviación estándar

Otra manera de poder calcular la exactitud es a partir del porcentaje recuperado. En este procedimiento y a partir de las puntos controles preparados, se calcula la concentración experimental de los mencionados puntos y se compara con respecto a la concentración nominal:

$$\%R = \frac{Cp_{\text{experimental}}}{Cp_{\text{nominal}}} \times 100$$

Al igual que en el primer caso, los valores deben encontrarse en un rango de $\pm 15\%$ de la concentración nominal.

2.2.2.6 Precisión

Evalúa la cercanía de los valores experimentales obtenidos cuando el procedimiento bioanalítico es aplicado repetidamente. En este caso, las muestras cargadas con el analito a tres niveles (puntos control por quintuplicado) son procesadas y se calcula el coeficiente de variación de la respuesta para cada concentración definida. Con base en las recomendaciones de la FDA, el coeficiente de variación no debe sobrepasar el 15% a cada nivel, con excepción del punto más bajo de la determinación, el cual puede tener hasta un 20% de CV.

El estudio de la precisión de un método bioanalítico se divide en dos vertientes: la repetibilidad y la reproducibilidad. En el primero de ellos, también conocido intra-corrída, se evalúa la variabilidad cuando se aplica el método utilizando los puntos control por quintuplicado en un solo día. Por otra parte, la reproducibilidad en la validación de métodos bioanalíticos, según la guía de la FDA, es evaluada a través de la magnitud que relaciona la variación en los resultados observados cuando uno o más factores, tales como el tiempo, los analistas, los equipos y la marca de reactivos varía, e incluso los laboratorios.

Es importante indicar que algunas guías como la ICH proponen una “precisión intermedia”, que expresa las variaciones obtenidas en el laboratorio debido a la aplicación del método en varios días, cambio de analista, uso de diferentes equipos, entre otros factores y por otro lado, define a la reproducibilidad estrictamente como el grado de concordancia de los resultados experimentales entre laboratorios.

2.2.2.7 Recobro

Se le denomina recobro a la relación que existe entre la respuesta obtenida de la muestra procesada (respuesta analítica de una muestra cargada después de aplicar la técnica de extracción) a una concentración específica y la respuesta del analito no procesada a la misma concentración. Este parámetro puede ser evaluado a partir del recobro absoluto o relativo [52]. En el primer caso, las muestras cargadas con el analito son procesadas según la metodología desarrollada, obteniéndose las respuestas analíticas ($R_{\text{procesada}}$). Posteriormente dicha propiedad se compara con las respuestas obtenidas del analito que no sufrió el proceso de extracción a las mismas concentraciones ($R_{\text{solución}}$, analito en solución):

$$Recobro_{Abs} = \frac{R_{procesada}}{R_{solución}}$$

En el recobro relativo, que tiene la finalidad de evaluar de manera indirecta el efecto de sustancias que son co-extraídas de la matriz junto con el analito, se preparan las muestras a ciertas concentraciones y según el procedimiento analítico son extraídas ($R_{procesada}$).

Por otra parte, una serie de blancos de la matriz se procesa y se adiciona la cantidad del compuesto a las mismas concentraciones que en caso anterior (carga post-extracción). Finalmente, se compara las respuestas analíticas obtenidas de ambos procedimientos ($R_{postextracción}$):

$$Recobro_{rel} = \frac{R_{procesada}}{R_{postextracción}}$$

En los métodos bioanalíticos que son desarrollados por espectrometría de masas, debido a la probable influencia del efecto de la matriz sobre la respuesta del analito, es aconsejable reportar el recobro relativo.

En ambos casos, la guía de la FDA especifica que no es necesario obtener el 100% del porcentaje de recobro, pero si es imprescindible demostrar, tanto para el analito como el estándar interno, que a los diferentes niveles (concentración alta, media y baja) dicho parámetro de validación sea preciso y reproducible. De manera general, se considera que el método cumple con el recobro si esta valor se encuentra en una rango del 60 al 100% sin embargo, algunos autores con base en la complejidad del compuesto, el tipo de matriz y la cantidad de analito en el fluido biológico, consideran que el intervalo de aceptación debe ser mas amplio; por ejemplo, para fármacos que se encuentran en concentraciones de 1ppb, el rango aceptado del recobro podría estar entre 40-120% [53].

2.2.2.8 Estabilidad

La estabilidad de la muestra es un punto a considerar desde el inicio del desarrollo del método bioanalítico hasta el procesamiento de muestras con un sistema validado. Los experimentos de estabilidad que son recomendados realizar deberán ser representativos de los probables escenarios del manejo de la muestra según el método bioanalítico a instaurar. La guía de la FDA indica 5 tipos diferentes de estabildades, las cuales a continuación se definen y se describe el proceso experimental para evaluarlas.

- a) Estabilidad por ciclos congelación/descongelación. En este caso se preparan al menos por triplicado a dos niveles (alto y bajo) muestras cargadas con el analito de interés. Posteriormente se congelan a la temperatura definida (generalmente $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se descongelan completamente sin ayuda a temperatura ambiente después de 12 a 24 horas. Una vez más se vuelven a colocar en el refrigerador a la temperatura



determinada. Esta operación se realiza hasta completar tres ciclos de congelación/descongelación y en esta última etapa se analizan las muestras. En la caso que se compruebe que al analito es inestable a esas condiciones se recomienda realizar la misma metodología pero con una temperatura de congelación de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- b) Estabilidad corta. Se preparan las muestras en el fluido biológico al menos por triplicado a dos niveles (alto y bajo) y se colocan a temperatura ambiente por espacio de 4 a 24 horas. El intervalo de tiempo que deberá escogerse para esta prueba dependerá del lapso que es necesario aguardar para procesar desde la primera muestra hasta la última.
- c) Estabilidad larga. El proceso de estabilidad larga se realiza con base en la evaluación de la estabilidad de la muestra después de un periodo largo de almacenamiento. Para ello se preparan muestras (con la cantidad necesaria para poder tomar 3 alícuotas para análisis) de concentración alta y baja por triplicado. Las concentraciones de las muestras almacenadas y después procesadas son comparadas con la media de las concentraciones de aquellas que fueron analizadas en el primer día del inicio del estudio.
- d) Estabilidad del Stock. La estabilidad del analito y el estándar interno en las soluciones primarias deben ser investigadas por espacio mínimo de 6 horas a temperatura ambiente. Si dichas soluciones son refrigeradas para su uso, este hecho deberá ser documentado. El ensayo de estabilidad del stock se realiza relacionando la respuesta obtenida del analito o estándar interno después de un periodo establecido de horas a ciertas condiciones con la respuesta de soluciones de preparación reciente.
- e) Estabilidad pospreparativa. Esta pruebas sirve para conocer la estabilidad de la muestra después de ser procesada. También debe tomarse en cuenta el tiempo en el cual las muestras se encuentran en el inyector del cromatógrafo de líquidos. Es recomendable realizar estudios estadísticos para determinar las estabilidades antes mencionadas.

2.2.2.9 Límite de detección

Según la USP (US Pharmacopoeia) define al límite de detección como la mínima concentración del analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada [43].

Los límites pueden asignarse con base en la relación que existe entre la señal o respuesta del analito y el ruido (perturbaciones inherentes en la señal después de procesar e inyectar solo la muestra). Generalmente y de manera “ocular” se permite una relación de 1:3 veces el valor del ruido.

Otra manera para poder calcularlo es a partir la desviación estándar (σ) de la señal de ruido de cierto número de blancos procesados (6 aproximadamente) y la pendiente de la curva de calibración de analito de interés. En este caso, se calcula el LD como 3.3 veces al valor del ruido:

$$LD = 3.3 \frac{\sigma}{m}$$

El uso de esta ecuación reduce la probabilidad de error por apreciación en el valor de LD. En los métodos bioanalíticos es necesario cuantificar el compuesto de interés de manera exacta y precisa, por lo que este parámetro de validación no es muy requerido, sin embargo, alguno autores en sus escritos lo reportan probablemente con el afán de mostrar el alcance sensitivo del método analítico desarrollado y la determinación inconfundible entre el LC y este rubro. La guía de la FDA no incursiona profundamente en este parámetro.

2.2.2.10. Integridad de la dilución.

La prueba de integridad de dilución se refiere a que si alguna muestra debe ser diluida durante la experimentación, el resultado de la interpolación de la respuesta en la curva de calibración establecida debe cumplir con la exactitud y la precisión requerida.

La FDA, en uno de sus apartados, menciona esta prueba, sin embargo no comenta parámetros de aceptación. La EMA, en su guía de métodos bioanalíticos [46], lo propone como uno de los principales puntos a validar, e indica para esta prueba que se deberá preparar muestras que se encuentren arriba del punto más alto de la curva de calibración. Dichas muestras se deberán diluir con el fluido biológico correspondiente (al menos 5 determinaciones por factor de dilución) y analizadas. Los puntos de la validación, como la exactitud y la precisión, deberán estar bajo los límites establecidos. En ninguna guía se establece una secuencia progresiva para evaluar los puntos de validación; sin embargo, de manera general, se puede decir que en la validación de métodos bioanalíticos para estudios de farmacocinética o bioequivalencia es recomendable iniciar con los ensayos de estabilidad (stock, a corto plazo, post-preparativo), selectividad, efecto de matriz, linealidad, límite de detección, exactitud, precisión y recobro, en ese orden. Algunos autores indican cuales son los parámetros con los cuales hay que tener mayor cuidado cuando se valida un método bioanalítico. Dos parámetros sobresalen en esa observación: el recobro y la supresión de iones.



En el primer caso, para ciertos fármacos es posible que las muestras cargadas para realizar el recobro no sean predictores de lo que sucede en el organismo; por ejemplo, en el caso de la cuantificación de metabolitos inestables (como N-óxidos y glucurónidos) que se transforman en otros compuestos *in vivo*. Por otra parte, el efecto de matriz posee una gran cantidad de causas, como son el tipo de matriz biológica, los anticoagulantes, metabolitos, otros medicamentos que se administran en conjunto con el analito al sistema vivo y en algunas ocasiones hasta el tipo de proveedor con los que se adquieren los tubos colectores de sangre. Por estas situaciones, dependiendo del método bioanalítico desarrollado, es recomendable realizar otras pruebas no consideradas en las guías con la finalidad de cuantificar de manera confiable el compuesto bajo estudio.

2.3 CASIOPEÍNAS: COMPLEJOS DE COORDINACIÓN CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA

2.3.1 Cáncer y casiopeínas.

El cáncer es una de los principales padecimientos a nivel mundial. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés), en el año 2008, 7.6 millones de personas murieron por procesos neoplásicos (alrededor del 13% de todas las muertes registradas). Las proyecciones de este órgano indican que se espera un repunte en el número de casos y para el año 2030, 13.1 millones de personas perderán la vida por esta enfermedad [54].

Según esta organización, los principales tipos de cáncer que se diagnostican a nivel mundial (por orden decreciente de casos) son: cáncer de pulmón, estómago, sistema colo-rectal, hígado y pecho. La incidencia del tipo de neoplasias difieren entre el género, siendo en el hombre el cáncer de pulmón, estómago, hígado, sistema colo-rectal, esófago y próstata los más importantes. En las mujeres, los procesos neoplásicos que más frecuentemente se observan son el cáncer de pecho, pulmón, estómago, hígado y cervicouterino. La probabilidad de desarrollar cáncer puede ser decrementada en gran medida cambiando ciertas costumbres. Estudios sobre la incidencia de tumores muestran que aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer podrían ser prevenidos.

En el caso de México, con base en la información consultada en el mes de junio del año 2013 en la página del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI), durante el año 2011, del total de defunciones registradas en el país, 12.9% fueron por algún tumor y de éstos, 93.6% se debieron a neoplasias malignas. Por otra parte, entre los principales tumores malignos por los que fallece la población de 20 años y más en México, se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. Las mujeres mueren por cáncer de mama (13.8%), por cervicouterino (10.4%) y de estómago (7%), en tanto que los hombres fallecen por cáncer de próstata (16.9%), de bronquios y de pulmón (12.8%) y de estómago (8.6%) [55].

Existen diversos métodos terapéuticos para tratar este padecimiento [56] y de manera constante se han logrado grandes progresos en este tema. De manera general y en base principalmente en base a la información difundida por el National Cancer Institute de los Estados Unidos, los tratamientos pueden ser clasificados en cuatro grandes categorías: Cirugía, Quimioterapia, Radioterapia y otros tratamientos antineoplásicos. En este último punto se integran procedimientos como son la terapia dirigida, inmunoterapia, terapia hormonal, inhibidores de angiogénesis y la terapia complementaria y alternativa. Generalmente en la cura o procedimientos paliativos para esta enfermedad se utilizan de manera combinada una o más de estas técnicas. La búsqueda de nuevas moléculas con actividad terapéutica es una de las labores constantes de la investigación en torno a este problema, en donde productos orgánicos, inorgánicos y biotecnológicos están sujetos a escrutinio.

Dentro del campo de la Química Inorgánica, uno de los fármacos que demostrado tener una alta capacidad antineoplásica es el Cisplatino, un complejo de coordinación con centro de platino. Este hecho ha promovido el estudio de otros compuestos con base en diversos metales como potenciales agentes quimioterapéuticos. Interesantemente, los metales ofrecen diversas propiedades incluyendo, un extenso rango de números de coordinación, varios estados de oxidación y diversos ligandos, que en su conjunto, permiten obtener una gran diversidad de estructuras que pueden ser explotadas para el tratamiento oncológico [57]. Existe reportados investigaciones en donde se han estudiado complejos de paladio, rutenio, lantano, galio y rodio, entre otros [58, 59]. Algunos como en el caso del vanadio, han alcanzado una etapa preclínica [60].

Otro campo en el estudio de complejos de coordinación es constituido por compuestos que en su esfera de coordinación poseen cobre como átomo central. En este contexto, Lena Ruiz y colaboradores desde 1975 han sintetizado moléculas de coordinación que poseen metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Cu, y Zn). En especial, algunos compuestos diseñados a base de cobre han demostrado tener capacidad citotóxica, según los lineamientos exigidos dentro del panel de cernimiento sugerido por el Cancer Chemotherapy National Service perteneciente al National Cancer Institute de los Estados Unidos. A esta familia de compuestos de coordinación se les ha denominado Casiopeínas, las cuales ya han sido patentadas [61-64] y que poseen título de marca [65].

La familia de compuestos CASIOPEINAS[®], con fórmula general $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{ON})]\text{NO}_3$ o $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{OO})]\text{NO}_3$ es un grupo de compuesto de coordinación de cobre II (Cu^{2+}) con centro metálico, que en las esferas de coordinación presentan un ligante bidentado del tipo diimina (N-N) y otro que puede ser aminoacidato (N-O) o donador (O-O).

El diseño de estos compuestos se realizó pensando que la planaridad en la geometría de la molécula así como el ligante diimínico podrían conferirle la capacidad de intercalarse con el DNA. Además el centro metálico puede participar en ciclo redox liberando especies oxidantes (ERO, especies reactivas de oxígeno) que pudieran interaccionar con el material genético de la célula neoplásica. Por otra parte, al utilizar metales esenciales



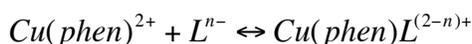
como el cobre es probable que los efectos adversos producidos por el anticancerígeno disminuirían [66].

Se han sintetizado alrededor de 100 compuestos pertenecientes al grupo de Casiopeínas que conforman 9 subfamilias, divididas en base al tipo de ligante que poseen en la esfera de coordinación. Las fórmulas generales para cada una de las subfamilias antes mencionadas se muestran en el cuadro 5.

Según reportes de estabilidad, los sistemas de coordinación terciaria conformados por Cu^{2+} , diiminas aromáticas y un segundo ligante que contenga oxígeno como donador (como en el caso de las Casiopeínas), poseen una alta e inusitada estabilidad en solución; por ejemplo, en mezclas de Cu y 1,10-fenantrolina el 90% del rendimiento de la reacción corresponde a la especie $\text{Cu}(\text{phen})^{2+}$ [67].

Cuadro 5. Subgrupos de la familia Casiopeínas.

Sub Familia	Fórmula general
Casiopeína I	$[\text{Cu}(4,7\text{-difenil-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína II	$[\text{Cu}(4,7\text{-metil-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína III	$[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína IV	$[\text{Cu}(4,4'\text{-dimetil-bipiridina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína V	$[\text{Cu}(5\text{R-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína VI	$[\text{Cu}(5,6\text{-dimetil-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína VII	$[\text{Cu}(\text{fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína VIII	$[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-fenantrolina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$
Casiopeína IX	$[\text{Cu}(\text{bipiridina})(\text{O-N})]\text{NO}_3$



Este comportamiento es anómalo, ya que de manera empírica se observa que el sistema donador (O) forma complejos más estables con estructuras del tipo $[\text{Cu}(\text{N-N})]^{2+}$ que con el ión Cu hidratado. Sigel y colaboradores explican este fenómeno indicando que la atracción de densidad electrónica que ejerce el nitrógeno hacia el cobre en la especie $[\text{Cu}(\text{N-N})]^{2+}$ provoca que el sistema tenga características de un ácido duro; consecuentemente, reaccionarán favorablemente con sistemas de bases duras como los donadores de oxígeno [68].

Por otra parte se han realizado estudio del tipo QSAR, en donde con base en las propiedades fisicoquímicas de estos complejos de coordinación, como el potencial de media onda ($E_{1/2}$) y la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) en varias líneas celulares, se ha establecido que para Casiopeínas que pertenecen a los sistemas $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{acac})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{gly})]\text{NO}_3$ la parte del anillo aromático es fundamental para preservar el efecto antiproliferativo celular [69]. Actualmente, con base en los resultados de la investigación,



dos complejos de coordinación pertenecientes al grupo han demostrado ser serios candidatos a alcanzar la etapa clínica: la casiopeína IIIa y la casiopeína IIgly, siendo esta última molécula objeto de investigación biofarmacéutica en la presente tesis.

2.3.2 Casiopeína IIgly®

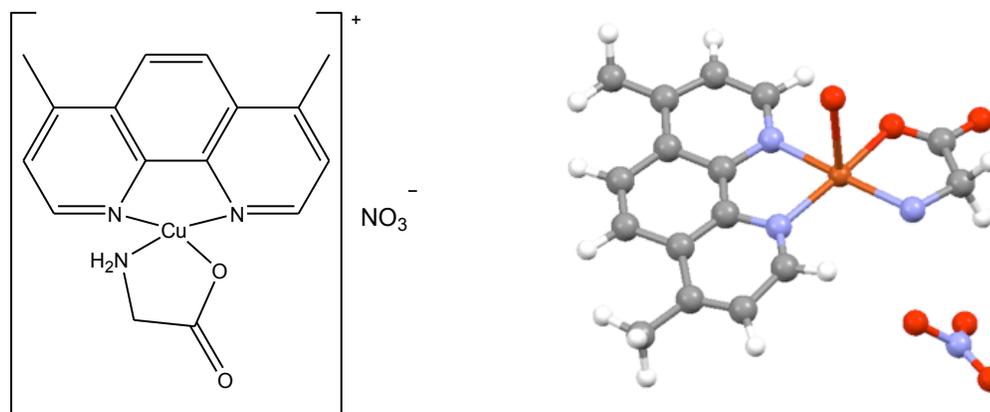


Figura 3. Estructura de la casiopeína IIgly.

La casiopeína IIgly®, (nitrato de acua 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina glicina cobre(II)) (**figura 3**) es un compuesto de coordinación que ha mostrado tener mayor actividad antineoplásica y una toxicidad menor en comparación con el quimioterapéutico cisplatino. Este complejo de coordinación es objeto de estudio de varios grupos multidisciplinarios que se encuentran evaluando diversos aspectos relacionados como son el mecanismo de acción, toxicidad, farmacología, tecnología farmacéutica y farmacocinética. A continuación se mencionan aspectos relevantes de la investigación en torno a esta molécula.

2.3.2.1 Propiedades fisicoquímicas y análisis instrumental

La síntesis de este complejo de coordinación se encuentra detalladamente descrita en las patentes correspondientes [62-64]. Algunas características fisicoquímicas de la casiopeína IIgly se enumeran en el cuadro 6.

Cuadro 6. Características fisicoquímicas de la casiopeína IIgly.

Propiedad	Valor/descripción
Fórmula	$\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Peso molecular	443.90 g/mol
Descripción física	Polvo fino de color azul intenso
Densidad aparente	0.425 g/mL
Solubilidad	Altamente soluble en metanol, etanol, y mezclas acuosas con estos dos alcoholes, soluble en agua.

El método instrumental de análisis por espectroscopia UV muestra dos picos máximos de absorción, uno en 273 nm y otro a 209 nm, presentando en la primera longitud de onda una mayor absorbancia. En espectroscopia IR las principales señales características son las siguientes: 3255 cm^{-1} (grupo amino), 1380 cm^{-1} (NO_3), 1601 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$) y 1524 cm^{-1} ($\text{C}=\text{N}$). En la parte correspondiente a la fenantrolina se observan señales en 1429, 871 y 726 cm^{-1} .

Los estudios de estabilidad del complejo de coordinación en diferentes soluciones fisiológicamente compatibles demuestran que este compuesto es estable en dextrosa al 5% durante tres semanas, en solución de Hartmann (Ringer con lactato de sodio) es estable al menos tres semanas. En el caso de la solución salina (cloruro de sodio al 0.9%), un medio utilizado comúnmente, la casiopeína IIgly no es estable. Las observaciones muestran la formación de un precipitado al contacto con el mencionado medio. El análisis por espectroscopia infrarroja mostró que los grupos nitrato había sido sustituidos por iones cloruro [70].

2.3.2.2 Actividad Biológica

Uno de los primeros ensayos de actividad *in vitro* que se realizó para este complejo de coordinación se llevó a cabo utilizando las líneas celulares L1210 (leucemia) y CH1 (carcinoma ovárico) sensibles y resistentes al quimioterapéutico cis-platino, fármaco de elección para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. La exposición de este compuesto con las células mostró que la casiopeína IIgly tiene capacidad apoptótica. Por otra parte, los estudios morfológicos demostraron que el compuesto de coordinación también produce necrosis. Los resultados obtenidos indican que la casiopeína IIgly mata a las células sensibles y resistentes al cisplatino, lo que hizo avistar que el mecanismo de acción es diferente para las dos moléculas ensayadas [71].

Posteriormente, en el año de 2001, se realizaron una parte de las pruebas que conforman al panel del cernimiento del National Cancer Institute para la búsqueda de nuevos quimioterapéuticos con probable acción antineoplásica. Los resultados fueron alentadores e indicaron que la casiopeína IIgly posee una actividad antiproliferativa mayor en varias de estas células que el fármaco de referencia con base en platino [72]. Algunos resultados de esta investigación se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) de diversas líneas celulares al ser expuestas a la casiopeína II gly y el cisplatino.

	Carcinoma cOrvico-uterino						Pr4stata		Colon		Mama	
	Hela		SiHa		LnBI		PC3		HCT-15		MCF-7	
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM	µg/mL	µM
CasIIgly	0.33	0.74	0.46	1.03	0.95	2.14	1.62	3.46	1.10	2.53	2.03	4.58
Cisplatino	1.56	5.20	1.49	4.90	5.62	18.60	>15	>15	1.38	4.60	1.68	5.60

También, se han realizado ensayos con otras células como el meduloblastoma y neuroblastoma humano, en donde se apreció la inducción de un efecto apoptótico [73].

El tratamiento sinergista de dos a mas fármacos antineoplásicos es comúnmente usado en los nosocomios para el tratamiento del cáncer. En algunas ocasiones, dependiendo del tipo de agente quimioterapéutico y la dosis se obtienen resultados positivos en la remisión de los tumores. Se reportó un estudio en donde la Casiopeína IIgly y diversos antineoplásicos comerciales como el carboplatino, cisplatino, oxaliplatino y busulfán fueron ensayados a diversas proporciones de dosis en las líneas celulares CaLo, LnBI, HeLa, HCT-15, SiHa, MCF-7, U-373 y SK-LU-1, teniendo como parámetro de medición el % de viabilidad [74].

Con respecto a la actividad *in vivo*, se han realizado diversos ensayos utilizando el modelo de ratón desnudo xenotransplantado. Las líneas celulares que han sido utilizadas en esos experimentos son la HCT-15, PC-3 y Hela. Los resultados de estos experimentos ayudaron a la obtención de la dosis terapéutica tentativa, tomado en consideración la función tumoral y el retraso del crecimiento. Por ejemplo, en el caso de la línea celular HCT-15, el mejor valor de dosis encontrado que inhibe el crecimiento tumoral es de 1 mg/kg, según el ensayo reportado [75].

2.3.2.3 Mecanismo de Acción

El mecanismo de acción de la casiopeína IIgly aún no se ha dilucidado completamente; sin embargo, los esfuerzos por conocer esta característica han demostrado en los estudios iniciales que este complejo de coordinación tiene la capacidad de inducir apoptosis y necrosis [71].

Los ensayos realizados en la línea celular del glioma C6 mostraron que la casiopeína IIgly incrementaba la producción de especies reactivas de oxígeno e incrementaba la actividad del factor de inducción de apoptosis y la endonucleasa G a todas las concentraciones usadas. Por otra parte, se pudo observar que a concentraciones altas (5 y 10 $\mu\text{g/mL}$) se presentó un incremento en la liberación del citocromo C, fragmentación del ADN nucleosomal y la activación de la Caspasa-3, un indicador de la activación de la vía apoptótica. Los resultados demostraron que la casiopeína IIgly induce la muerte celular por dos vías diferentes y que se activan de manera dosis dependiente. Los ensayos *in vivo* realizados en este trabajo confirman la actividad antiproliferativa de la casiopeína IIgly [76].

Por otra parte, Rodríguez-Enriquez y colaboradores realizaron ensayos en líneas celulares HeLa (Humanos) y AS-30D(roedores) para investigar si el compuesto bajo estudio tenía la capacidad de poder inhibir la glucólisis, vía metabólica que se encuentra altamente activada en las células cancerígenas debido a la alta tasa de reproducción que éstas poseen. Los resultados concluyeron que la casiopeína IIgly tiene la capacidad de inhibir la fosforilación oxidativa y la glucólisis. Además, los ensayos *in vivo*, en donde se implantaron estas células de manera intraperitoneal en ratas hembra, indicaron que aunque no se detuvo completamente el crecimiento del tumor, este complejo de coordinación tuvo un importante efecto citostático en esas líneas celulares [77].

En otro estudio realizado por Rivero-Müller y colaboradores, se encontró que la casiopeína IIgly se une con gran afinidad a las moléculas de ADN y RNA, provocando la escisión de estas cadenas, probablemente vía la producción de radicales hidroxilo. La inducción de radicales libres en el entorno nuclear fue constatada al encontrar la especie 8-oxo-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), uno de los mayores productos de oxidación del ADN; sin embargo, al parecer la superóxido dismutasa no participa en la síntesis de productos reactivos que pudieran dañar el material genético. La casiopeína IIgly además tiene la habilidad de poder escindir el ARN, ARN-plásmico y ADN en presencia de ascorbato lo que indica que este compuesto de cobre, aún sin la presencia de especies reactivas de oxígeno, tiene la capacidad de poder afectar el material genético [78]. No obstante, los estudios de generación de ERO's en el citosol indican que no se generan estas especies en esa región celular, lo que conduce a pensar en la probabilidad de que el efecto de esta molécula está restringido sólo a una región en particular, como el núcleo o la mitocondria [79].

Se realizaron también experimentos en las líneas celulares de pulmón A549 y H157 para investigar a mayor profundidad el mecanismo de generación de ERO's. En este estudio se demuestra que las concentraciones de glutation intracelular disminuyen de manera considerable y dicho compuesto es utilizado por la casiopeína IIgly como donador de electrones para catalizar la reacción de Fenton en ambas células, produciendo más agentes oxidantes. La casiopeína IIgly también causa una producción elevada de ERO's en la mitocondria y despolarización en el organelo antes mencionado [80].

2.3.2.4 Toxicidad

La toxicidad es uno de los principales puntos que es investigado durante el proceso de la etapa preclínica. En ella se realizan diversos estudios en por lo menos dos especies animales (roedor y no roedor). En gran medida, estos estudios, aunados a la actividad y los estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos, determinan si el candidato a fármaco tiene los elementos suficientes para ser probados en seres humanos.

En el caso de la casiopeína IIgly se han realizado estudios de toxicidad dando como resultado la obtención de la dosis letal 50 (DL₅₀) y la dosis letal 90 (DL₉₀) en rata y ratones [81]. En el cuadro 8 se muestran los resultados obtenidos. Los trabajos de toxicidad en el modelo biológico canino indicaron que la dosis letal 50 y la dosis letal 99 para este sistema biológico es de 5 mg/kg y 160 mg/m², respectivamente [82].

Cuadro 8. Dosis letal 50 (DL₅₀) y la dosis letal 90 (DL₉₀) de la casiopeína IIgly (administraciones intraperitoneal e intravenosa) encontradas en los modelos animales de rata y ratón.

Modelo Animal	Wistar Macho		Wistar hembra	
	IP	IV	IP	IV
Rata Wistar	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg	mg/Kg
DL50	8.46	7.83	8.83	8.89
DL90	11.61	8.88	10.6	12.1
Ratón ICR				
DL50	15.59	15.5	15.67	15.3
DL90	19.79	17.95	17.71	16.81

Adicionalmente, en el trabajo de toxicidad en perros se realizaron ensayos como hemograma, bioquímica sanguínea, urianálisis, equilibrio ácido-base, necropsia, histopatología y microscopia electrónica. Luego de la administración de casiopeína IIgly, se observó la inversión de la onda T cardíaca, lo que indica hipoxia al miocardio. Por otro lado, se apreció un aumento en la frecuencia respiratoria y disminución de la saturación de oxígeno. Como resultado de la exposición de casiopeína IIgly a dosis altas, el perro presentó disnea, cianosis y edema pulmonar y finalmente muere en un lapso de 20 a 40 minutos. En la necropsia practicada se pudo constatar que las partes anatómicas como la tráquea, bronquios primarios y secundarios contenían abundante espuma blanquecina. Las pruebas realizadas indican que la casiopeína IIgly afecta directamente las mitocondrias del músculo cardíaco, lo cual produce una insuficiencia cardíaca aguda.

Con la finalidad de investigar a nivel bioquímico el mecanismo de toxicidad muscular que sufre el músculo cardíaco, Hernández-Esquivel y colaboradores realizaron diversos ensayos en donde perfundieron corazones aislados de rata con glucosa, octanoato, glucosa más octanoato y diferentes concentraciones de casiopeína. La investigación reveló que la



casiopeína IIgly induce una disminución en el gasto cardiaco al igual que decremanta el consumo de oxígeno en el mencionado órgano. A nivel bioquímico se observó una fuerte disminución de la actividad del piruvato y 2-oxoglutarato deshidrogenasa, al igual que la creatin cinasa, lo que pone de manifiesto que el compuesto de coordinación tiene la capacidad de afectar la fosforilación oxidativa para la producción celular de ATP. Dentro del panel de investigación, los autores también realizaron los ensayos con la adriamicina, un fármaco antineoplásico, que se sabe afecta al músculo cardiaco. Al comparar los resultados obtenidos de este último fármaco con los de la casiopeína IIgly se observó una menor toxicidad por parte del complejo de coordinación a base de cobre [83].

Con base en los reportes conocidos sobre la toxicidad que ejerce el cobre sobre los eritrocitos, De Vizcaya *et al.* realizaron un estudio con la finalidad de conocer como afecta la casiopeína IIgly al tejido sanguíneo. Los resultados demostraron que después de una administración intravenosa en ratas (dosis 5mg/kg), el compuesto de coordinación tiene la capacidad de inducir anemia hemolítica, acompañada de leucositosis y neutrofilia. Sin embargo, los análisis practicados a los sistemas biológicos utilizados indicaron que después de 15 días de la administración, el organismo tendía a la recuperación en cuanto a la integridad y morfología de los eritrocitos [84].

2.3.2.5 Estudios Biofarmacéuticos y Farmacocinéticos

Como parte de los estudios preclínicos, los ensayos farmacocinéticos y biofarmacéuticos proporcionan información substancial sobre el comportamiento de la entidad química bajo estudio en un organismo, dando como resultado la generación de modelos matemáticos que describen dicho comportamiento y, en casos favorables, en conjunto con todos los demás estudios, ayudan a definir una dosis inicial en seres humanos. En el caso concreto de la casiopeína IIgly, Reyes y colaboradores realizaron un ensayo farmacocinético en ratas, en donde después de la administración de 8 mg/kg del complejo de coordinación en estudio se encontró que el mejor sistema matemático que describía la eliminación del compuesto correspondía a un modelo abierto de dos compartimientos, por el cual se obtuvo el tiempo de vida media, con un valor de 40 minutos [85]. Por otra parte, se han realizado ensayos de unión a proteínas plasmáticas a concentraciones muy elevadas y fuera del probable rango terapéutico (15-50 $\mu\text{g/mL}$), indicando que el porcentaje de unión es mayor al 90% [86].

También se ha reportado un estudio de biodistribución en tejidos, en donde se cuantificó cobre total a través de la técnica instrumental de absorción atómica. Bajo el silogismo que la determinación de cobre representa la cantidad de casiopeína II gly, los autores señalaron que el complejo de coordinación se distribuye con mayor rapidez en riñón e hígado. Una premisa interesante de este estudio estriba en el hecho de que las concentraciones de la casiopeína IIgly se mantienen constante por un espacio de al menos 128 horas, lo que sugeriría que en el caso de que este candidato a fármaco se utilizara para el tratamiento de un tumor en los órganos antes mencionados, el compuesto tuviera tiempo suficiente para producir sus efectos terapéuticos [87].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen varias alternativas quimioterapéuticas para tratar el cáncer. El National Cancer Institute de los Estados Unidos cita más de 100 medicamentos aprobados por la FDA [88] sin embargo, la existencia de tumores refractarios, la alta toxicidad y el elevado costo impulsan el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos. En México, además de las desventajas medicamentosas antes mencionadas, existe la necesidad de importar estos productos, lo que agrava aún más el precio del fármaco.

Algunos miembros de la familia de compuestos llamados Casiopeínas®, de tecnología nacional, han demostrado tener actividad antineoplásica y están siendo investigados en el ámbito preclínico. Una de esas moléculas es la casiopeína IIgly, compuesto que se encuentra en evaluación a nivel preclínico. En esta etapa de la investigación es necesario realizar ensayos farmacocinéticos con al menos un modelo biológico no roedor como parte del tándem de estudios requerido para evaluar la factibilidad de que el candidato a medicamento puede acceder a la Fase clínica I. Este último objetivo sólo puede ser logrado si se cuenta con métodos bioanalíticos que permitan cuantificar el fármaco de manera confiable.

Cabe mencionar que debido a las características químicas de la esfera de coordinación de este analito, es necesario desarrollar metodologías analíticas no compendiales (estándares) con la finalidad de obtener señales cromatográficas con suficiente resolución y una aceptable forma gaussiana.

Por esta razón, el presente trabajo tiene como propósito desarrollar y validar métodos bioanalíticos para determinar las concentraciones de casiopeína IIgly en fluidos de perro beagle. Por otra parte, ya contando con dichos métodos, se realizarán estudios como la farmacocinética, unión a proteínas plasmáticas, relación sangre/plasma y la estabilidad en sangre, estudios fundamentales en el ámbito preclínico que ayudarán a determinar el probable ingreso de esta compuesto de coordinación en el ámbito clínico fase I.

4. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivos Generales

- Desarrollar, implantar y validar métodos bioanalíticos sensibles para la cuantificación de casiopeína Igly en fluidos biológicos
- Realizar diversos ensayos preclínicos a la casiopeína Igly.

Objetivos Particulares

- Obtener una metodología bioanalítica que con base en la intensidad y resolución del pico permita la determinación de la casiopeína Igly en el fluido biológico utilizando como sistema de cuantificación la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas.
- Desarrollar una técnica analítica que permita cuantificar concentraciones menores a $5 \mu\text{g/mL}$ de casiopeína Igly en plasma y sangre de perro beagle.
- Determinar el valor de los principales variables farmacocinéticas en la clínica (tiempo de vida media, volumen de distribución y depuración) de la casiopeína Igly después de la administración de este fármaco en perros de la raza beagle.
- Determinar el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas *in vitro* a concentraciones inferiores a $10 \mu\text{g/mL}$ en plasma de rata, perro y humano.
- Determinar la relación sangre total/plasma del a casiopeína Igly en tres especies diferentes.

5. HIPÓTESIS

- Ha: Si el comportamiento cinético de la casiopeína IIgly en ratas Wistar mostró un tiempo de vida media corto, entonces las variables farmacocinéticas obtenidas en perros beagle indicarán una alta tasa de eliminación del analito en el tejido muestreado.
- Ho: Si el comportamiento cinético de la casiopeína IIgly en perros beagle indica un tiempo de vida media larga, entonces los valores de eliminación reportados en ratas Wistar no guardan una relación directamente proporcional con la de los perros.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Insumos

6.1.1 Equipos

- Cromatógrafo de líquidos modelo 1100 de la marca Agilent (Waldbronn, Alemania) el cual consiste de un desgasificador (G1322A), inyector (G1313A), bomba cuaternaria (G1311A) y detector UV con arreglo de diodos (G1315B).
- Espectrómetro de masas del tipo trampa de iones VL (Palo Alto, California, USA) equipado con un sistema de ionización del tipo electrospray (1100 Series, LC/MSD Mass Trap, Agilent Technologies)
- Infusionador marca KDS Modelo “100 Series”.
- Equipo desionizador de agua Marca Millipore Modelo Milli-Q (MA., USA).
- Agitador Oscilatorio Orbit Shaker, Lab-Line.
- Centrífuga Microbase RF, Termo IRC.
- Centrífuga modelo 5416, Eppendorf.
- Balanza Analítica A210P, Sartorius.
- Potenciómetro modelo 410, Termo-Orión.
- Congelador modelo 3552, Lab-Line Instruments, Inc.
- Vortex Genie 2, Scientific Industries.
- Manifold modelo WAT200677, Waters (Milford, MA. USA).
- Evaporador Aquabath provisto con un sistema de inyección de Nitrógeno.
- Sistema para agitación de eppendorf con 15 espacios.
- Columna Synergy Max RP (C12), 150X4.6 mm, 4 μ , 80A, Phenomenex.
- Columna Zorba Eclipse XDB-C8, 4.6 X 150 mm, Agilent.
- Columna Synergy Hidro-RP (C18), 150X4.6 mm, 4 μ , 80 a, Phenomenex.
- Columna Luna Phenyl-Hexyl (5 μ), 150X4.6 mm, 5 μ , Phenomenex.
- Columna Synergy Polar RP (4 μ), 30 X 2.0 mm, Phenomenex.
- Filtros Amicon Ultra-4 PGLC. Membrana de celulosa.
- Cartuchos de extracción Bond-Elute C18, 3cc, 60 A.
- Cartuchos de extracción de fase sólida Strata-X, 33 μ m, 60 mg, 1cc, Phenomenex).
- Insertos para viales de 100 μ L de vidrio desactivado, con base de polímero, Agilent Technologies.

6.1.2 Reactivos

- Casiopeína Iigly lote 170MBG030305 sintetizada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM, según las patentes [61-64] y bajo establecidos parámetros de control de calidad.
- Ketoprofeno, Laboratorios Kendrick, México.
- Ácido Heptafluorobutírico (HFBA), 98%, Aldrich.
- Ácido Trifluoroacético (TFA), 98% Sigma-Aldrich.
- Ácido Fórmico, 98%, Fluka.
- Formiato de Amonio, 97%, Aldrich.
- Acetato de Amonio, 98%, Aldrich.
- Bicarbonato de Amonio, 99%, Sigma-Aldrich.
- Ácido acético glacial, JT Baker.
- Hexansulfonato de sodio, 98%, Sigma.
- Laurilsulfato de Amonio (Dodecil sulfato de amonio), 99%, Sigma.
- Etilendiamintetracético trisódico (EDTA Na₃), 98%, Fluka.
- Metanol grado cromatográfico, TECNOLAB.
- Acetonitrilo grado cromatográfico, JT Baker.
- Agua desionizada, generada en el laboratorio con el sistema Millipore con resistencia entre 10 y 18 megaOhms-cm.

6.1.3 Soluciones

6.1.3.1 Fase móvil MeOH/HFBA 0.1% (2:3) y MeOH/HFBA (3:2)

HFBA: C₄HF₇O₂, PM 214.04 g/mol, b.p. 120 °C, d 1.645, pKa 0.4.

Se colocó en un matraz aforado con capacidad de 500 mL, 200 mL de agua grado HPLC. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de HFBA (concentrado) y se aforó con agua desionizada hasta los 500 mL. La solución se vertió en un frasco de 0.5 L ámbar (reservorio del HPLC) y se agitó 3 minutos. Por otra parte, utilizando un filtro con porosidad de 0.45 μ m, se filtraron 500 mL de metanol y se transvasaron a un frasco transparente de 1L. El solvente orgánico y la solución de HFBA antes mencionada se sonicaron 10 minutos. La bomba cuaternaria del HPLC realizó la mezcla de los solventes MeOH/HFBA 0.1% (2:3) ó MeOH/HFBA 0.1% (3:2).

6.1.3.2 HFBA al 5% en agua desionizada

HFBA: C₄HF₇O₂, PM 214.04 g/mol, b.p. 120 C, d 1.645, pKa 0.4, 10 mL

En un matraz de 10 mL se colocaron 2 mL de agua desionizada. Posteriormente se vertieron en este recipiente 500 μ L de HFBA (concentrado) y se llevó a 10 mL con agua desionizada. Se agitó por un lapso de 3 minutos.

6.1.3.3 HFBA al 7% en agua desionizada

En un matraz de 10 mL se colocaron 2 mL de agua desionizada. Posteriormente se vertieron en este recipiente 700 μ L de HFBA (concentrado) y se llevó a 10 mL con agua desionizada. Se agitó por un lapso de 5 minutos.

6.1.3.4 Solución de MeOH/HFBA 0.1% (4:1)

HFBA: $C_4HF_7O_2$, PM 214.04 g/mol, b.p. 120 C, d 1.645, pKa 0.4.

En un matraz volumétrico de 10 mL se colocaron 2 mL de agua grado HPLC. A continuación se adicionaron 10 μ L de HFBA conc. y se aforó con agua. La mezcla se agitó 5 minutos. De dicha solución, se tomaron 8 mL de manera exacta y se depositaron en otro matraz de 10 mL el cual se aforó con metanol. La nueva solución fue agitada en vortex 3 minutos.

6.1.3.5 Solución de estándar Interno. Ketoprofeno en MeOH/HFBA (4:1)

Ketoprofeno: $C_{16}H_{14}O_3$, 254.28 g/mol.

Se pesó con exactitud 0.01g de Ketoprofeno y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL. Dicho matraz fue aforado utilizando metanol grado HPLC y se agitó en el vortex por un lapso de 5 minutos. Esta solución contuvo una concentración de 1 mg/mL de ketoprofeno. Posteriormente, se tomaron 0.250 mL de la pasada solución y se dispusieron en un matraz aforado de 10 mL el cual fue aforado con fase móvil previamente preparada y finalmente fue agitada por 3 minutos.

6.1.3.6 Solución de estándar interno. Prednisona 20 μ g/mL

Prednisona: $C_{12}H_{26}O$, 358.428 g/mol.

Se pesó con exactitud 0.01g de Prednisona y se colocó en un matraz de 10 mL. Posteriormente fue aforado con metanol y agitado por espacio de 6 minutos. De la solución anterior, se tomaron 200 μ L, se trasvasaron en un matraz de 10 mL, se aforó con metanol y se agitó 3 minutos.

6.1.3.7 Solución stock de casiopeína IIgly en agua (1 mg/mL)

Casiopeína IIgly: $C_{16}H_{16}CuN_3O_2 \cdot NO_3 \cdot 2H_2O$, PM 443.07 g/mol.

En un matraz aforado de 10 mL se colocaron 0.01g de casiopeína IIgly, previamente pesada con exactitud. Posteriormente se llevó hasta el aforo con agua desionizada. La mezcla se agitó durante 10 minutos, hasta la completa disolución del analito en cuestión. El matraz fue cubierto con papel aluminio con la finalidad de evitar que la solución de casiopeína IIgly tuviera interacción con la luz.

6.1.4 Material biológico

- Seis lotes diferentes de plasma de perro beagle, rata y humano, libre de fármaco para la preparación de blancos y muestras cargadas.
- Seis lotes de sangre fresca de perro beagle para preparación de muestras blanco y cargadas.
- 6 perros de la raza beagle clínicamente sanos, edades desde 7 meses a 1.2 años, con un peso promedio de 14.4 ± 2.86 Kg.

6.1.5 Software (programas computacionales)

- ChemStation Rev A.10.02, Copyright © Agilent Technologies
- LC/MSD Trap Software 5.2, Copyright © Bruker Daltonic GmbH
- WINNONLIN Versión 5.2, Pharsight Products.
- IBM SPSS Statistics 19, IBM.

6.2 Procedimientos experimentales

6.2.1 Farmacocinética de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS.

Con el fin de preparar a los sistemas biológicos, 12 horas antes del estudio preclínico, 2 perros de la raza beagle con un peso promedio de $14 \text{ kg} \pm 1.5 \text{ kg}$ y 1.2 años (misma camada) fueron aislados y dejados en ayuno durante toda la noche con acceso a agua *ad libitum*. El día del estudio farmacocinético se administró una dosis de 0.9 mg/Kg de casiopeína IIgly disuelta en solución glucosada a cada perro vía infusión intravenosa por espacio de 30 minutos. A los tiempos designados (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 6, 12 y 24 horas) después de la infusión, se tomaron muestras de sangre (1 mL) en tubos heparinizados. La sangre obtenida fue centrifugada (3000 rpm, 5 min) y el sobrenadante fue transvasado a un tubo limpio, protegido de la luz ambiental. Finalmente, el plasma fue colocado en el refrigerador a una temperatura de -30°C .

6.2.2 Farmacocinética de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle durante un proceso de infusión constante

Se trabajaron con cuatro perros de la raza beagle, de entre 7 y 9 meses de edad y con peso promedio de 14.4 ± 2.86 Kg. Previo al estudio farmacocinético los animales de experimentación fueron mantenidos en ayuno de 12 horas con acceso libre a agua *ad libitum*. El ensayo preclínico fue llevado a cabo administrando casiopeína IIgly (1.5 o 3 mg/Kg, n=2) por infusión intravenosa con duración de 1 hora. El diseño del protocolo contempló caracterizar la fase de infusión y el obtener concentraciones plasmáticas al estado estacionario. La administración del compuesto antineoplásico se administró por la arteria femoral de la pata derecha y las muestras fueron tomadas en la pata izquierda del animal de experimentación. Los tiempos de muestreo para ambas dosis fueron tomados desde la aplicación de la infusión intravenosa. A cada intervalo determinado (20, 40, 60 minutos, 2, 4, 8, 12 y 24 horas) y utilizando tubos heparinizados, se tomaron muestras sanguíneas que inmediatamente después de su obtención fueron protegidas de la luz cubriendo los tubos con papel aluminio y almacenándolas en el refrigerador a una temperatura promedio de -30°C hasta el momento de su análisis (12 horas después). El análisis de estas muestras fue realizado utilizando el método del apartado 6.2.8 para cuantificar casiopeína IIgly en sangre.

6.2.3 Estudio de biodistribución (relación sangre total/plasma) de la casiopeína IIgly

Las muestras de ensayo fueron preparadas a dos diferentes concentraciones de casiopeína IIgly: 300 ng/mL y 1 $\mu\text{g/mL}$ (4 mL, n=4). En un tubo de ensayo de vidrio desactivado se colocó una alícuota específica de una solución metanólica de casiopeína IIgly. Posteriormente el metanol fue evaporado a través de un sistema de burbujeo de Nitrógeno y se adicionó 5 mL de sangre de rata, perro o humana con la finalidad de obtener las concentraciones requeridas. Las muestras fueron agitadas y después se incubaron por espacio de 15 minutos a 37°C . Al término del tiempo establecido, 500 μL de sangre fueron analizados de acuerdo al método analítico. De manera paralela, los 3 mL restantes de sangre fueron centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos, el plasma fue separado y analizado por HPLC-MS. Con los resultados de las concentraciones en los dos fluidos se calculó la relación sangre total/plasma ($K_{b/p}$). Adicionalmente, con el valor del hematocrito experimental (H_c), se determinó el coeficiente de partición células rojas vs plasma ($k_{e/p}$) a través de la siguiente ecuación:

$$K_{b/p} = K_{e/p} * H_c + (1 - H_c)$$

6.2.4 Perfil farmacocinético de la casiopeína IIgly en sangre de perro después de una administración intravenosa (bolus).

Se trabajaron con 6 perros de la raza beagle, con peso comprendido entre 13.6 y 15.9 Kg. Previo al estudio farmacocinético los animales de experimentación fueron mantenidos en ayuno de 12 horas con acceso libre a agua *ad libitum*. El día de la experimentación, a cada animal de experimentación se le administró por vía cefálica 2 mg/kg de casiopeína II gly disuelta en solución glucosada. A los tiempos de 10, 20, 40, 60, 80, 120 y 240 minutos, se tomaron muestras sanguíneas e inmediatamente fueron analizadas, utilizando el método 2 para cuantificar este complejo de coordinación en sangre. Los datos obtenidos de la farmacocinética de casiopeína IIgly fueron vertidos en el programa WinNonLin versión 5.2 y se ensayaron los sistemas compartimentales y no compartimentales. El proceso de modelado se realizó de manera individual para cada animal en estudio. Con base en algoritmo del modelo, la correlación predicha-observada y el criterio de Akaike, se seleccionó el mejor modelo y se determinaron los parámetros farmacocinéticas relevantes para la clínica, como son el tiempo de vida media y la depuración.

6.2.5 Estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre total de rata, perro y humana.

A partir de una solución stock de casiopeína IIgly disuelta en metanol, se colocó la cantidad necesaria del compuesto a estudio en tubos de ensaye para preparar 12 mL de muestras de sangre con concentraciones de 0.3 y 1 $\mu\text{g/mL}$ (n=4). Después de la adición del compuesto, el metanol fue removido haciendo pasar al sistema nitrógeno molecular. Posteriormente, se adicionó 12 ml de sangre fresca con heparina de rata, de perro o humana y se agitó gentilmente por espacio de 10 minutos. Las muestras (protegidas de la luz) fueron colocadas en un baño de agua con agitación a 37° C. A los tiempos de 0, 10, 20, 40 60 minutos, 2, 4 y 6 horas, 500 μL de sangre fueron tomados y después de aplicar 3 ciclos de congelación/descongelación, se procedió a realizar en análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. Se determinó si las muestras eran estables a través del porcentaje de recobro y con base en el criterio de las recomendaciones de la FDA para la estabilidad bioanalítica.

6.2.6 Determinación de la unión a proteínas plasmáticas de la casiopeína IIgly en tres especies diferentes.

La unión a proteínas plasmáticas fue realizada a partir de plasma de rata, perro y humano a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$ (n=6). Alícuotas de casiopeína II gly disueltas en agua fueron colocadas en el plasma con la finalidad de obtener las concentraciones requeridas para el ensayo. Posteriormente fueron agitadas por 30 segundos e incubadas a 37°C por espacio de 60 minutos . Un mililitro de la muestra fue colocada en los tubos de separación Amicon y centrifugadas durante 30 minutos a 4000 rpm, manteniendo la temperatura constante de 37°C. Finalmente, 0.5 mL del ultrafiltrado fue analizado por HPLC-MS. La concentración del compuesto fue obtenida por interpolación de la respuesta analítica en una



curva de calibración preparada el mismo día del experimento. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\%UP = \left(1 - \frac{[Farmaco_{ultrafiltrado}]}{[Farmaco_{total}]} \right) * 100$$

6.2.7 Método para cuantificar casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS

6.2.7.1 Preparación de la curva de calibración y puntos control de casiopeína IIgly en agua y plasma de perro beagle

La curva de calibración para este método bioanalítico estuvo constituida por las siguientes concentraciones de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle (método) o en agua (sistema): 0.1, 0.5, 1, 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte los puntos control preparados fueron: 0.3, 5 y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El esquema de preparación se muestra en la figura 4 .

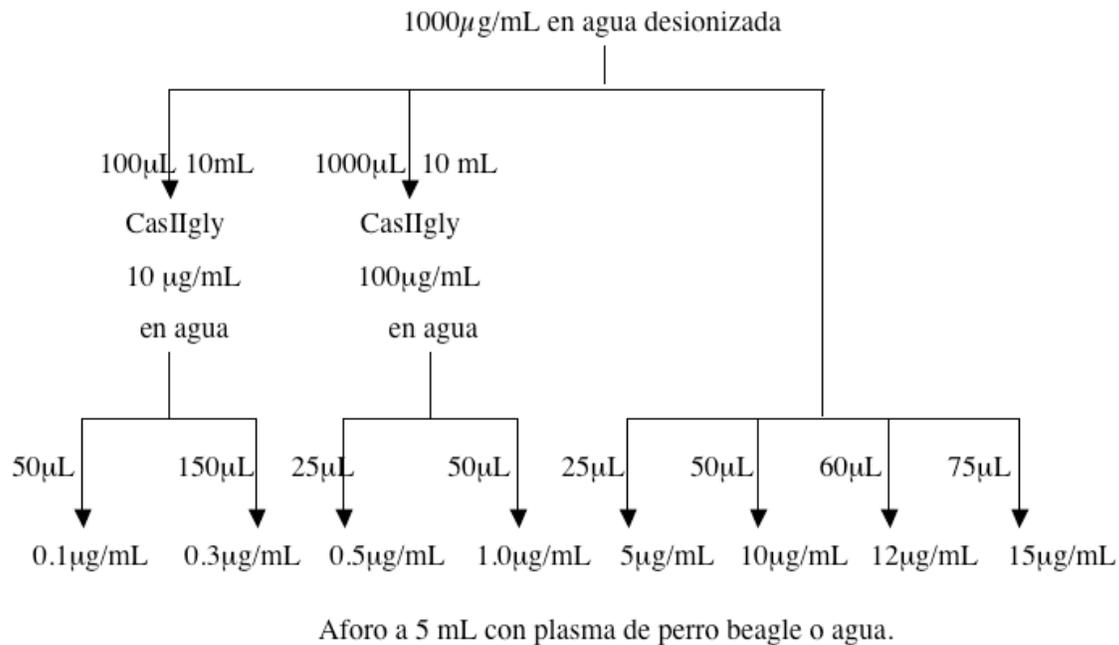


Figura 4. Preparación de la curva de calibración y puntos control de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle (curva en método) o en agua (evaluación del sistema).

6.2.7.2 Método de extracción de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle

A 0.5 mL de plasma de perro beagle (blanco, blanco dopado con casiopeína IIgly ó muestra de perfil farmacocinético) se le agregaron 100µL de HFBA al 5% (acuoso) y se agitó por espacio de 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 15000 rpm X 5 minutos. Se tomó el sobrenadante con una pipeta pasteur y se colocó en un cartucho de extracción de fase sólida (Strata X, 30mg/1mL) previamente acondicionado (1ml X 2 de metanol, 1 mL de HFBA 0.1%). El cartucho conteniendo el analito de interés se lavó con 300µL de HFBA al 5% y se dejó secar 5 minutos. Posteriormente se eluyó utilizando diclorometano (grado reactivo) y se concentró a una temperatura de 37 °C bajo inyección de nitrógeno (grado industrial). Finalmente el sólido obtenido fue reconstituido en 100 µL de MeOH/HFBA 0.1% (4:1) y fue inyectado al sistema HPLC-MS.

6.2.7.3 Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS

Los parámetros optimizados del cromatógrafo de líquidos de alta resolución y el espectrómetro de masas para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma se enuncian en los cuadro 9 y 10, respectivamente.

Cuadro 9. Condiciones cromatográficas en la cuantificación de la casiopeína IIgly.

Parámetro	Valor
Columna	Synergy Polar RP (4m) 30mm X 2mm (Phenomenex)
Fase Móvil	MeOH/HFBA 0.1%(ac) 4:6
Flujo	Por gradiente: 0.5 mL/min (0-4.5min) y 0.9 mL/min (4.6-10 min)
Volumen de Inyección	1 µL
Programa de Lavado	Extenso. Lavado de la aguja e inyector post-inyección (2 ciclos) 2 Inyecciones de MeOH/HFBA 0.1% (10 µL) antes de cada corrida cromatográfica.
Velocidad de Toma de Muestra (Draw Speed)	100 µL/min
Velocidad de inyección (Eject speed)	25 µL/min
Temperatura de columna	30°C
Estándar interno	Ketoprofeno (25µg/mL)

Cuadro 10. Parámetros espectrométricos para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-IT-MS.

Parámetros	Casiopeína IIgly	Ketoprofeno
Segmento	(0-4.5 min)	(4.6-10 min)
Nebulizador	40 psi	50 psi
Gas de secado (Dry Gas)	8 L/min	10 L/min
Temperatura de secado (Dry Temp)	350°C	350° C
Scan	(SIS 484m/z)	(SIS 299 m/z)
Capilar	-4500 V	-2385 V
Capilar exit offset	61.48 V	50 V
Skim 1	54.02 V	41.5 V
Octapolo	2.51 V	3.16 V
Octapolo Δ	1.13 V	1.53 V
Trap Drive	47.44	49
Skim 2	6.39V	7.87 V
Oct RF	152.46 V	107.38 V
Lens1	-3.36 V	-3.36 V
Lens 2	-57.54 V	-58.69 V
Lens 1 y 2	-1.2, -32.3 V	-3.61 V, -62.13V
Polaridad	Positiva	
Ion Charge Control (ICC)	On	
Target	200,000	
Max. Accu time	50 ms	
Average	17	
Rolling Average	4	
Presión de Vacío Frontal	2.45 mbar	
Presión de Alto Vacío	1.22X10 ⁻³ mbar	
Gas de colisión	He ultrapuro (5.0)	
Gas de Secado	N ₂ (generador de Nitrógeno,	

6.2.7.4 Validación del método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS

La evaluación de los parámetros de la validación reportados en la presente tesis de investigación fueron llevados a cabo de acuerdo a las recomendaciones de FDA-CDER (Food and Drug Administration – Center for Drug Evaluation and Research).

- Selectividad. Se procesaron e inyectaron blancos de plasma por duplicado de perro beagle provenientes de 6 lotes diferentes además de muestras cargadas con heparina, fenantrolina y glicina. Se determinó si existía interferencia debido a los compuestos mencionados o componentes del plasma con el ión de cuantificación en el mismo tiempo de retención del analito o del estándar interno.
- Efecto de la Matriz. En la determinación de este parámetro se realizó un experimento de doble infusión (ensayo “T”). En un sistema acoplado HPLC-MS y utilizando un conector T se infundió al sistema de ionización electrospray (ESI) casiopeína IIgly a una velocidad de 10 μ L/min y por el otro conducto fase móvil (MeOH/HFBA 0.1% (2:3) a un flujo de 0.9 mL/min. Posteriormente, se inyectaron en el cromatógrafo muestras de plasma provenientes de 6 perros beagle diferentes. En el cromatograma se determinó si el ión de cuantificación (484 m/z) al tiempo de retención de la casiopeína IIgly presentaba un pico negativo (evidencia de supresión de iones) o algún efecto de la matriz.
- Linealidad del sistema de medición. Se prepararon por triplicado 5 puntos de casiopeína IIgly en fase móvil con concentraciones 0.1, 0.5, 1, 10 y 15 μ g/mL, las cuales fueron preparadas a partir de una solución stock de 1000 μ g/mL de este complejo de coordinación en agua y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos acoplado al detector de masas. La linealidad fue ensayada en función de la relación de áreas entre la casiopeína IIgly y el estándar interno. El comportamiento lineal fue evaluado a través coeficiente de correlación, con base en las recomendaciones de la FDA.
- Precisión del sistema de medición. Se preparó en fase móvil de manera independiente y del mismo stock la concentración más alta de la curva por quintuplicado. Los resultados fueron utilizados para determinar el coeficiente de variación.
- Linealidad del método. Este parámetro fue determinado al realizar 3 curvas de calibración (5 puntos) en plasma de perro Beagle a las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 10 y 15 μ g/mL y obteniendo el coeficiente de correlación (r) para todos los datos. El resultado de r fue evaluada según las directrices del la FDA.

- Precisión del método. Repetibilidad. Los puntos controles (0.3, 5 y 12 $\mu\text{g/ml}$) en plasma fueron preparados por quintuplicado y analizados e un mismo día de acuerdo a la metodología reportada y para cada concentración se calculó el %CV.
- Precisión del método. Reproducibilidad (FDA) ó precisión intermedia (ICH). En cada uno de los tres días de validación, se realizaron por triplicado los puntos control en plasma. Posteriormente, utilizando el cálculo de porcentaje de coeficiente de variación, se determinó la variabilidad entre los puntos en tres días por cada nivel.
- Exactitud del método. Este parámetro fue determinado por el porcentaje recuperado (porcentaje de la concentración experimental obtenida con respecto a la concentración nominal) para los puntos controles a tres concentraciones utilizando los resultados de los 3 días de validación. Para ello se comparo el valor obtenido experimentalmente vs el valor nominal (concentración teórica).
- Recobro. En este caso se comparó la relación para cada concentración de la respuesta obtenida de la curva de calibración en plasma versus la observada en la curva preparada en fase móvil (sistema de medición).
- Límite de cuantificación. Se definió como la mínima concentración de la curva de calibración que puede ser medida de manera exacta y precisa bajo los lineamientos establecidos para estos parámetros. Para ello se procesaron 5 muestras con concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle. Los resultados fueron expresados en %CV.
- Límite de detección. Se procesaron 5 blancos de plasma siguiendo la metodología reportada. Se determinó con base en las áreas obtenidas la desviación estándar muestral (DE). Por otra parte, de tres curvas de calibración de casiopeína IIgly (intervalo de 0.1 a 15 $\mu\text{g/mL}$) en plasma preparada de forma reciente se determinó la pendiente (m). Finalmente, se calculó el límite de detección con base en el siguiente algoritmo matemático:

$$LD = \frac{3DE}{m}$$

El resultado de la operación matemática indicó la mínima concentración de casiopeína IIgly en plasma que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada.

- Estabilidad. (Ciclos congelación/descongelación). Tres muestras de puntos control con concentraciones de 0.1, 5 y 12 $\mu\text{g/mL}$ fueron preparados por triplicado y sometidos a 3 ciclos congelación/descongelación en donde cada ciclo duró 24 horas. Al tercer día, las muestras antes mencionadas fueron procesadas y se determinó la concentración del analito con base en una curva preparada ese mismo día.



- Estabilidad a largo plazo. Muestras de casiopeína IIgly a tres niveles (0.1, 5 y 12 $\mu\text{g/mL}$) por duplicado fueron colocados en refrigeración ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y analizados en tiempos determinados (24, 48, 72 h, 7 y 15 días). En los días indicados, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se tomaron 0.5 mL y se analizó por el método reportado en este trabajo.
- Estabilidad pospreparativa. Se procesaron 3 puntos control por duplicado con base en el método bioanalítico desarrollado. Posteriormente, después del proceso de reconstitución en fase móvil, las muestras fueron colocadas en el inyector del cromatógrafo (temperatura ambiente) y se realizaron las inyecciones a los siguientes tiempos: 0, 6, y 12 horas.

6.2.8 Método para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle por HPLC-MS

6.2.8.1 Preparación de la curva de calibración y puntos control de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle

Para obtener la curva de calibración de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle, a partir del stock de casiopeína IIgly con concentración de $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ en agua desionizada, se prepararon 2 soluciones de 100 y $10\text{ }\mu\text{g/mL}$. La cantidad tomada de cada stock fue calculada para obtener 1 mL de muestra (sangre cargada con el analito) a la concentración deseada. En el cuadro 11 se resume el proceso de preparación de las muestras.

Cuadro 11 . Proceso de preparación de la curva de calibración (CC) y puntos control (PC) en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle.

Concentración de CasIIgly en sangre $\mu\text{g/mL}$	Tipo de muestra	Solución Stock de CasIIgly $\mu\text{g/mL}$	Alicuota a tomar μL	Aforo con sangre de perro μL
0.1	CC	10	10	990
0.3	PC	10	30	970
0.5	CC	10	50	950
1	CC	100	10	990
5	PC	100	50	950
10	CC	1000	10	990
12	PC	1000	12	988
15	CC	1000	15	985

6.2.8.2 Método de extracción de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle

A la muestra de sangre de perro beagle con volumen de 500 μL (blanco, dopado con casiopeína IIgly ó muestra de perfil farmacocinético) se le adicionaron 600 μL de acetonitrilo seguido de 300 μL de HFBA 5%. En cada etapa la muestra se agitó por un lapso de 1 minuto. Posteriormente, se centrifugó a 5 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante fue colocado en el cartucho de extracción en fase sólida (STRATA X), utilizando para ello una pipeta pasteur. El cartucho fue lavado con HFBA al 5% (acuoso) y se dejó secar por 3 minutos. Posteriormente, la muestra retenida fue eluída utilizando Diclorometano (Grado Reactivo), concentrado bajo N_2 y reconstituido con 100 μL de MeOH/HFBA 0.1% (4:1). 1 μL fue inyectado al sistema acoplado HPLC-MS.

6.2.8.3 Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle por HPLC-MS

Los parámetros cromatográficos y espectrofotométricos utilizados en la validación y la cuantificación de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle se indican en los cuadros 12 y 13, respectivamente.

Cuadro 12. Condiciones cromatográficas optimizadas para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle por HPLC-IT-MS.

Parámetro	Valor
Columna	Synergy Polar RP (4m) 30mm X 2mm (Phenomenex)
Fase Móvil	MeOH/HFBA 0.1%(ac) 4:6
Flujo	Por gradiente: 0.5 mL/min (0-4.5min) y 0.9 mL/min (4.6-10 min)
Volumen de Inyección	1 μL
Programa de Lavado	Extenso. Lavado de la aguja e inyector post-inyección (2 ciclos) 2 Inyecciones de MeOH/HFBA 0.1% (10 μL) antes de cada corrida cromatográfica.
Velocidad de Toma de Muestra (Draw Speed)	100 $\mu\text{L}/\text{min}$
Velocidad de inyección (Eject speed)	25 $\mu\text{L}/\text{min}$
Temperatura de columna	30°C
Estándar interno	Ketoprofeno (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Cuadro 13. Parámetros del espectrómetro de masas para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle.

Parámetros	Casiopeína IIgly	Ketoprofeno
Segmento	(0-4.5 min)	(4.6-10 min)
Nebulizador	40 psi	50 psi
Gas de secado (Dry Gas)	8 L/min	10 L/min
Temperatura de secado (Dry Temp)	350°C	350° C
Scan	(SIS 484m/z)	(SIS 299 m/z)
Capilar	-4500 V	-2385 V
Capilar exit offset	61.48 V	50 V
Skim 1	54.02 V	41.5 V
Octapolo	2.51 V	3.16 V
Octapolo Δ	1.13 V	1.53 V
Trap Drive	47.44	49
Skim 2	6.39V	7.87 V
Oct RF	152.46 V	107.38 V
Lens1	-3.36 V	-3.36 V
Lens 2	-57.54 V	-58.69 V
Lens 1 y 2	-1.2, -32.3 V	-3.61 V, -62.13V
Polaridad	Positiva	
Ion Charge Control (ICC)	On	
Target	200,000	
Max. Accu time	50 ms	
Average	17	
Rolling Average	4	
Presión de Vacío Frontal	2.45 mbar	
Presión de Alto Vacío	1.22X10 ⁻³ mbar	
Gas de colisión	He ultrapuro (5.0)	
Gas de Secado	N ₂ (generador de Nitrógeno,	

6.2.8.4 Validación del método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle

Los puntos que se llevaron a cabo para validar el método bioanalítico que permitió cuantificar la casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle se describen a continuación.

- Selectividad. Con la finalidad de identificar la existencia de compuestos que pudieran interferir en la cuantificación del ión 484 m/z correspondiente a la reacción de interfase entre la casiopeína IIgly y el HFBA y el ión 299 m/z perteneciente al estándar interno, se procesaron muestras de sangre de perro beagle provenientes de 6 diferentes lotes. Se estableció la selectividad a partir del análisis de los cromatogramas de los iones antes mencionados y verificando la ausencia de picos en los tiempo de retención de los analitos de interés.
- Efecto de la Matriz: Fue basado en la metodología reportada por Matuzewsky *et al.* Diferentes blancos de sangre provenientes de 5 lotes diferentes fueron procesados de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 6.2.8.2. Posteriormente, después de la evaporación bajo N₂, a los blancos procesados se les adicionaron casiopeína IIgly disuelta en fase móvil a una concentración determinadas (0.3, 5 ó 12 µg/mL). El porcentaje de supresión iónica (%EM) fue determinada comparando la respuesta obtenida por el blanco cargado con casiopeína IIgly (B) en relación a la observada por el analito disuelto en fase móvil (A) a la misma concentración.

$$\%EM = \frac{B}{A} * 100$$

- Linealidad del método. Este parámetro fue determinado con base en comportamiento cromatográfico observado de 3 curvas de calibración en sangre de perro beagle. Con estos datos, se calculó el coeficiente de correlación y el resultado fue comparado con la especificación que indica la FDA en su guía de validación bioanalítica.
- Recobro (relativo). Para conocer la recuperación relativa de la casiopeína IIgly, se prepararon muestras de sangre dopadas con el complejo de coordinación a tres niveles de concentraciones (0.3, 5 y 12 µg/mL) por triplicado. Por otra parte, se procesaron blancos de sangre de acuerdo al procedimiento 6.2.8.2 y posteriormente, después del paso de la evaporación, fueron reconstituidos con casiopeína IIgly a las concentraciones de 0.3, 5 y 12 µg/mL (triplicado). Finalmente se relacionó los valores de las respuestas entre las muestras totalmente procesadas y aquellas (blancos de sangre) que fueron cargadas posextracción a la misma concentración. El cálculo del porcentaje de recobro en su modalidad relativa se calculó con base en la siguiente expresión matemática:

$$Recobro_{rel} = \frac{R_{procesada}}{R_{posextracción}}$$

- Exactitud del método. Se determinó con base en los resultados obtenidos de los puntos control en los cinco días de validación. Para ello, se calculó el promedio a cada concentración por día y el porcentaje recuperado.
- Precisión del método. Repetibilidad (guía FDA) o precisión intermedia (guía ICH). Este punto de la validación fue evaluada a partir de los puntos control a 3 niveles (0.3, 5 y 12 $\mu\text{g/mL}$) por quintuplicado en un día. Con los resultados para cada concentración se calculó el porcentaje de coeficiente de variación.
- Precisión del método. Reproducibilidad (precisión intermedia). En cada uno de los cinco días de validación se prepararon los puntos control a 3 niveles por quintuplicado. Con estos datos se calculó, por cada concentración el %CV.
- Límite de cuantificación. Se definió como la mínima concentración de la curva de calibración de casiopeína IIgly en sangre que cumple con los criterios de precisión y exactitud de acuerdo a la normatividad.
- Límite de detección. Se determinó con base en la desviación estándar de los blancos de sangre y la pendiente de la curva de calibración de casiopeína IIgly. El resultado fue obtenido a través de la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3DE}{m}$$

- Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación. En esta determinación, muestras de sangre cargadas con casiopeína IIgly a 3 concentraciones (0.3, 5 y 12 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado fueron congeladas a -20°C y descongeladas en tres ciclos de 24 horas. Al tercer día, las muestras fueron procesadas y se obtuvo la concentración para cada una de ellas, las cuales fueron comparadas con puntos de reciente preparación (n=5). Con los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje relativo al valor nominal.
- Estabilidad pospreparativa (en el inyector). Con la finalidad de determinar la posible degradación del analito en el inyector, muestras de casiopeína IIgly (0.3 y 12 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado se colocaron en el sistema de HPLC-MS después de la aplicación de la metodología de extracción. En intervalos de 3 horas, las muestras fueron inyectadas hasta cumplirse las 24 horas. A través del porcentaje relativo al valor nominal se realizó el dictamen.

6.2.9 Método para cuantificar la casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle por HPLC-MS (método 2)

6.2.9.1 Preparación de la curva de calibración y puntos control de la casiopeína IIgly en sangre de perro Beagle (método 2)

La preparación de la curva de calibración y los puntos control se llevaron a cabo a partir de la transferencia de un volumen determinado de stock de casiopeína IIgly en metanol a un tubo de ensaye. Posteriormente se evaporó el disolvente bajo un sistema de nitrógeno y finalmente se adicionó 1 mL de sangre fresca. En el cuadro 14 se indica los volúmenes tomados para la preparación de dichos puntos.

Cuadro 14. Preparación de la curva de calibración y puntos control para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre (método 2). Los volúmenes tomados del stock fueron colocados en el tubo, evaporado el disolvente y finalmente se adicionó 1 ml de sangre.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Tipo de punto	Stock ($\mu\text{g/mL}$)	Volumen(mL) tomado y evaporado	Vol Sangre (mL)
0.025	CC	1	0.025	1
0.1	PC	1	0.1	1
0.5	CC	1	0.5	1
1	CC	10	0.1	1
3	PC	10	0.3	1
5	CC	10	0.5	1
7	PC	10	0.7	1
10	CC	10	1	1

6.2.9.2 Método de extracción de la casiopeína IIgly en sangre (método 2)

En un tubo eppendorf con capacidad de 1.5 mL se colocó 0.5 ml de sangre total. Posteriormente la muestra se sometió a 3 ciclos congelación /descongelación con la finalidad de lisar los eritrocitos, utilizando para ello un baño que contenía hielo y acetona. Como siguiente paso se adicionaron 100 μL de una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de prednisona, seguido de 700 μL de TFA acuoso al 7%. La mezcla se agitó por espacio de 45 segundos y fue centrifugada 5 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante fue colocado en un cartucho de extracción en fase sólida (Strata X, 33 μm , 60mg, 1cc) previamente equilibrado (1 mL de metanol X 2, 1 mL MeOH:TFA 7% 1:1) y eluído con diclorometano. El filtrado fue concentrado bajo nitrógeno molecular, el residuo fue reconstituido con fase móvil y finalmente inyectado al sistema HPLC-MS.

6.2.9.3 Parámetros cromatográficos y espectrométricos

Los parámetros cromatográficos y espectrométricos se indican en los cuadros 15 y 16, respectivamente.

Cuadro 15. Parámetros cromatográficos usados en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre (método 2).

Parámetro	Valor
Columna	Synergy Polar RP (4m) 30mm X 2mm (Phenomenex)
Fase móvil	MeOH/HFBA 0.1%(ac) 3:2
Flujo	0.7 mL/min (isocrático)
Volumen de inyección	3 μ L
Programa de lavado	Extenso. Lavado de la aguja e inyector con metanol (2 ciclos) posinyección. 2 inyecciones de MeOH/HFBA 0.1%
Temperatura de columna	30°C
Estándar interno	100 μ L de prednisona (20 μ g/mL)

Cuadro 16. Parámetros espectrométricos usados en el método para cuantificar casiopeína IIgly en sangre (método 2).

Parámetros	Casiopeína IIgly
Nebulizador	40 psi
Gas de secado	8 L/min
Temperatura de secado	330°C
Scan	484m/z
Capilar	-4500 V
Capilar exit offset	61.48 V
Skim 1	54.02 V
Octapolo	2.51 V
Octapolo Δ	1.15 V
Trap Drive	47.44
Skim 2	6.39V
Oct RF	152.46 V
Lens1	-3.36 V
Lens 2	-57.54 V
Lens 1 y 2	-1.2, -32.3 V
Polaridad	Positiva
Ion Charge Control (ICC)	On
Target	200,000
Max. Accu time	50 ms
Average	17
Rolling Average	4
Presión de Vacío Frontal	2.45 mbar
Presión de Alto Vacío	1.22X10 ⁻⁵ mbar
Gas de colisión	He ultrapuro (5.0)
Gas de Secado	N ₂ (generador de Nitrógen)

6.2.9.4 Validación del método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total de perro Beagle (método 2)

Al igual que los métodos anteriores, la metodología para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total (método 2) fue realizada con base en las recomendaciones de la guía de la FDA.

- Selectividad. Se procesaron blancos de sangre correspondiente a 5 lotes diferentes de sangre y se compararon con aquellos cromatogramas en donde se apreciaba la casiopeína IIgly en fase móvil. También se verificó que la heparina no interfiriera en el tiempo de retención del pico del analito y el estándar interno (prednisona).
- Efecto de la matriz. Se prepararon muestras de casiopeína IIgly en sangre total a las concentraciones de 0.1, 3 y 7 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$) y se procesaron según la metodología para este método. Por otra parte, se prepararon muestras de casiopeína IIgly a las mismas concentraciones pero disueltas en agua y se inyectaron el sistema HPLC-MS. Con los datos obtenidos se calculó el efecto de la matriz según la técnica publicada por Matuszewski y colaboradores [45].
- Linealidad. Para evaluar este parámetro, se prepararon muestras de sangre fresca cargadas con casiopeína IIgly con concentraciones de 0.025, 0.5, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$). Posteriormente se realizó la regresión lineal utilizando todos los puntos y se calculó el coeficiente de correlación como parámetro discriminante.
- Precisión. Repetibilidad. Para evaluar este punto en un solo día se prepararon muestras de casiopeína IIgly en sangre fresca a 3 niveles de concentración (0,1, 3 y 7 $\mu\text{g/mL}$) por quintuplicado. Posteriormente se procesaron según el método descrito y la relación de áreas obtenidas (casiopeína IIgly/prednisona) fueron usadas para calcular el %CV a cada nivel de concentración.
- Precisión. Reproducibilidad (guía FDA) o precisión intermedia (guía ICH). La evaluación de la reproducibilidad se realizó por tres días consecutivos utilizando muestras frescas de sangre para cada día. Se comparó la variación utilizando como valor discriminante el %CV a cada nivel de concentración.
- Exactitud. Con la finalidad de obtener la exactitud, se doparon con casiopeína IIgly muestras de blanco para obtener concentraciones de 0,1, 3 y 7 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$). Las muestras fueron procesadas según el procedimiento 6.2.9.2 e inyectadas al sistema acoplado del HPLC-MS. Con esos resultados se obtuvieron las concentraciones experimentales. Posteriormente, con el fin de obtener el grado de concordancia entre los resultados experimentales y teóricos, se determinó el porcentaje de desviación absoluta.
- Recobro: Se prepararon 15 blancos de sangre y se procesaron según la metodología antes mencionada. Después de la evaporación, se adicionó la cantidad necesaria de

solución de casiopeína IIgly para obtener muestras cargadas posextracción con concentraciones de 0.3, 3 y 7 $\mu\text{g/mL}$ ($n=5$). Paralelamente, se prepararon muestras de casiopeína IIgly en agua a las mismas concentraciones. Con la relación de áreas obtenidos por los dos procesos antes mencionados se determinó el porcentaje de recobro.

- Estabilidad. En este caso, se trabajaron dos tipos de estabilidades: ciclos congelación descongelación y estabilidad a corto plazo. En el primer caso muestras en sangre de casiopeína IIgly a las concentraciones de 0.3 y 7 $\mu\text{g/mL}$ fueron congeladas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y descongeladas (temperatura ambiente) por ciclos de 24 horas. Al tercer día se tomó una muestra y se analizó por cromatografía de líquidos acoplada a HPLC. La concentración de cada muestra fue calculada utilizando para ello un curva de calibración fresca preparada el día del análisis. Por otra parte, en el caso de la estabilidad a corto plazo, los puntos control ($n=3$) fueron colocados en la mesa de trabajo por 6 horas y finalmente fueron analizados.

6.2.10 Desarrollo de un método analítico cualitativo para determinar los posibles metabolitos de la casiopeína II gly *in vivo*

Con la finalidad de determinar posibles metabolitos de la casiopeína IIgly durante el proceso de investigación farmacocinética y de bidistribución *in vitro*, se desarrolló un método analítico cualitativo. Para este fin, se utilizó el mismo proceso de extracción en plasma y sangre descrito en los apartados anteriores y las condiciones de la cromatografía de líquidos y espectrometría de masas fueron desarrollados y optimizados con base en las características fisicoquímicas y el peso molecular de los probables metabolitos (hidroxilación en el anillo aromático, desalquilación, glucoronidación, etc.) resultado de la biotransformación de la casiopeína IIgly *in vivo*. El intervalo de masas establecido fue de 200 a 1700 m/z y la búsqueda de compuestos se realizó a través del cromatograma de iones totales y el cromatograma de extracción de iones. El método también se planeó para poder identificar a la 4,7-dietilfenantrolina, parte constituyente del compuesto de coordinación pensando en un proceso probable de escisión. Los parámetros optimizados para este método se muestran en los cuadros 17 y 18.

Cuadro 17. Condiciones cromatográficas para la determinación de posibles metabolitos de la casiopeína IIgly *in vivo*.

Parámetros	HPLC
Fase estacionaria	Fenoxilos (Synergy Polar RP, 30 mm)
Fase móvil	MeOH/HFBA 0.1% en H ₂ O (6:4)
Inyección	1 μ L
Flujo	0.03 mL/min
Velocidad de inyección	100 μ L/min
Draw position	2 mm
Temperatura del horno	30°C
Tiempo de corrida	30 min

Cuadro 18. Parámetros de espectrómetro de masas en el método cualitativo para determinar los posibles metabolitos de la casiopeína IIgly *in vivo*.

Parámetros MS	Valor
Nebulizador	20 psi
Dry Gas	5 L/min
Dry temp	350 C
Capilar	-3500 V
Capilar exit offset	61.48 V
Skim 1	54.02 V
Octapole	2.51 V
Octapole D	1.13V
Trap drive	47.44
Skim 2	6.39 V
Oct RF	152.46 V
Lens 1, 2	-1.2 V, -32.3 V
Polaridad	Positiva
ICC	On
Target	200 000
Max accumulation time	50 ms
Scan	200-1700m/z
Average	17
Rolling averaging	4

6.3 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

6.3.1 Método bioanalítico para cuantificar casiopeína Igly en plasma de perro beagle

6.3.1.1 Desarrollo del método

Con el propósito de encontrar una metodología analítica para cuantificar la casiopeína Igly en plasma de perro, los primeros ensayos exploratorios para la obtención de retención cromatográfica del analito fueron realizados en HPLC-UV utilizando diversos tipos de fases estacionarias consideradas como clásicas (C8, C12 y C18) y varios sistemas de fases móviles, teniendo en cuenta las características fisicoquímicas del analito (como la estabilidad dependiente del pH, la solubilidad, etc.). Las columnas cromatográficas que se ocuparon en esta etapa de la investigación fueron las siguientes: Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6 X 150 mm (Agilent), Synergy Max RP (C12) 150X4.6 mm, 4 μ , 80 a (Phenomenex) y Synergy Hidro-RP (C18), 150X4.6 mm, 4 μ , 80 a, Phenomenex. El criterio de selección de las proporciones de disolvente fue establecido de acuerdo a los primeros ensayos empíricos y con base en las características fisicoquímicas de la casiopeína Igly como por ejemplo, su estabilidad de pH mayor a 4. Los sistemas de elución y proporciones se indican en el cuadro 19.

Cuadro 19. Experimentos iniciales para la obtención de una retención adecuada y un pico gaussiano en HPLC-UV, (n=3).

Disolvente		pH	Proporción A:B
A	B		
Metanol	Agua	5.4	4:1, 1:1, 1:4
Acetonitrilo	Agua	5.4	4:1, 1:1, 1:4
Metanol	Agua (ajuste con CH ₃ COOH)	3.5	4:1, 1:1, 1:4
Acetonitrilo	Buffer H ₂ PO ₄ /HPO ₄	7.5	4:1, 1:1, 1:4
Metanol	Buffer H ₂ PO ₄ /HPO ₄	7.3	4:1, 1:1, 1:4
Metanol	Buffer CH ₃ COOH/ CH ₃ COONH ₄	4.5	4:1, 1:1, 1:4
Metanol	Agua (Ajuste con NaOH 0.1M)	7.9	4:1, 1:1, 1:4

Los resultados obtenidos demostraron que el compuesto de coordinación en estudio no posee retención cuando se utilizan proporciones mayoritarias de disolvente orgánico. En condiciones 1:1, el pico cromatográfico en cada uno de los experimentos antes mencionados se observan asimétricos. En sistemas en donde la cantidad de mezcla acuosa es mayoritaria, el complejo de coordinación se escinde, observándose 2 señales cromatográficas extendidas. Dos cromatogramas representativos de este fenómeno se muestran en las figuras 5 y 6.

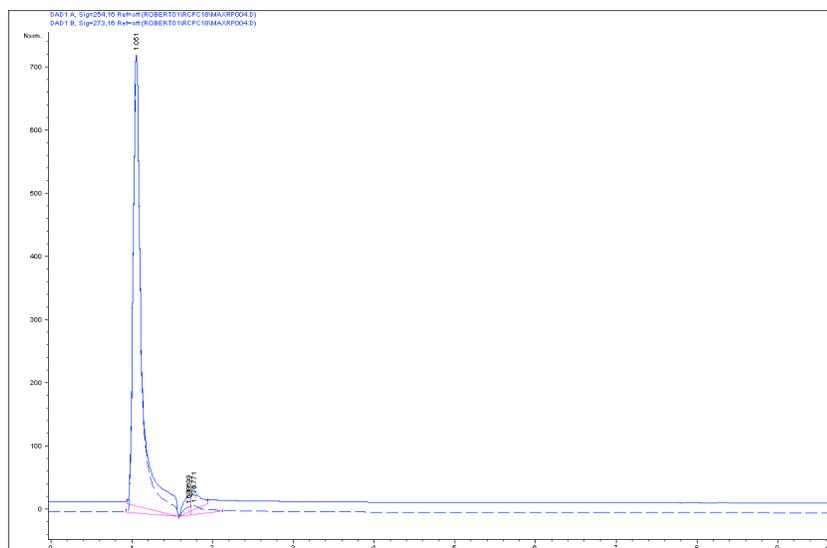


Figura 5. Casiopeína IIgly® 50µg/mL, FM: MeOH/H₂O c/ CH₃COOH (4:1), flujo 1ml/min, Columna: Synergy Hydro RP (Phenomenex), C18, endcapping.

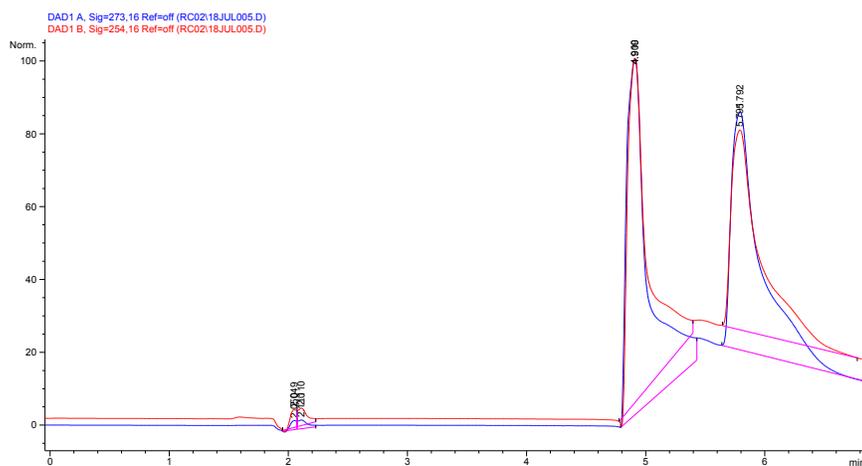


Figura 6. Casiopeína IIgly® 50µg/mL FM: MeOH/H₂O c/ CH₃COOH 5mM (1:4), flujo 1ml/min Columna: Synergy Hydro RP (Phenomenex) C18, endcapping

Con base en estos resultados, se diseñó un método bioanalítico para obtener una retención adecuada y un pico con características cercanas a un comportamiento gaussiano. Las concentraciones esperadas de casiopeína IIgly en el fluido biológico se estimaban menores a $5 \mu\text{g/mL}$, por lo tanto, se seleccionó un detector de masas para mejorar la sensibilidad. Además, en un sistema de trampa de iones se podrían realizar fragmentaciones sucesivas (MS^n) en el caso de obtener algún metabolito *in vivo* con la finalidad de determinar la probable estructura del compuesto biotransformado. La casiopeína IIgly es un complejo de coordinación altamente hidrofílico, por lo que para obtener retención en sistemas cromatográficos de fase reversa, se utilizó la tecnología de par iónico volátil, seleccionando al ácido heptafluorobutírico como agente mitigante de la carga del analito. El complejo de coordinación demostró ser lábil en la cromatografía de partición convencional, por lo tanto se escogieron columnas aromáticas para evitar en lo posible la ruptura del compuesto de cobre en el sistema de separación. Por último se seleccionó una fase estacionaria basada en metanol debido a que este disolvente podría ayudar a la interacción aromática entre la porción fenantrolínica de la casiopeína IIgly y la fase estacionaria, disminuyendo la posibilidad de fragmentación del analito de interés en la columna debido al proceso de partición.

En los primeros ensayos de infusión de la casiopeína IIgly disuelta en metanol agua (1:1) se observó el ion molecular 345 m/z , además de los fragmentos principales $[\text{Cu} (4,7 \text{ dimetil fenantrolina})]^+$ (271 m/z), $[\text{Cu} (4,7 \text{ dimetil fenantrolina}) (\text{OH})]^+$ (289 m/z) y $[\text{Cu} (\text{bisfenantrolina})]$ (479 m/z), siendo este último el resultado de una reacción interfase (figura 7). Cabe mencionar que debido a que este compuesto es un complejo de coordinación, no cumple con algunas reglas de la espectrometría de masas aplicada a compuestos orgánicos como la regla del nitrógeno, en donde se indica que el pico molecular presenta masa par si presenta un número par de átomos de nitrógeno, o por el contrario, el pico molecular presentará masa impar si presenta un número impar de átomos de nitrógeno. Como se observa en las estructuras **3** y **4**, no se cumple esta regla. El nitrógeno en estos casos cede sus electrones no compartidos a los orbitales del cobre, dando como resultado la coordinación. En el caso de las moléculas **1**, **2**, **3**, **4**, **6** y **8** el átomo que confiere carga al sistema es el cobre. El patrón de fragmentación de la casiopeína IIgly en $\text{MeOH} / \text{H}_2\text{O}$ (1:1) se muestra en la figura 8.

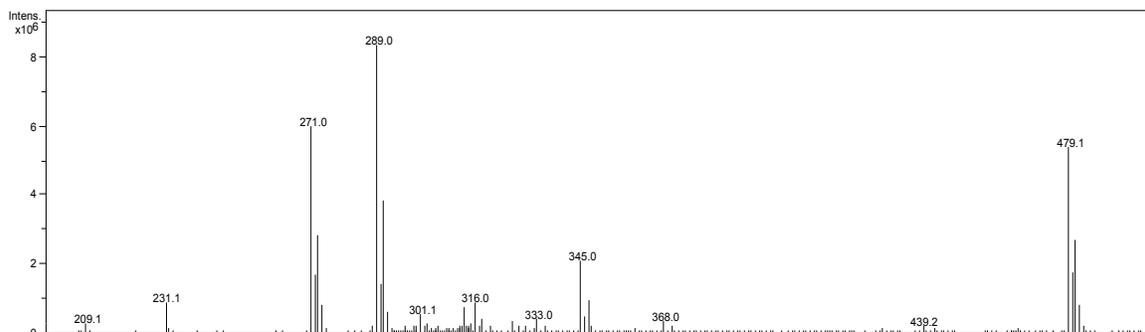


Figura 7. Espectro de masas (modo positivo) de la casiopeína IIgly $10 \mu\text{g/mL}$ en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1). Velocidad de infusión 0.3 mL/min .

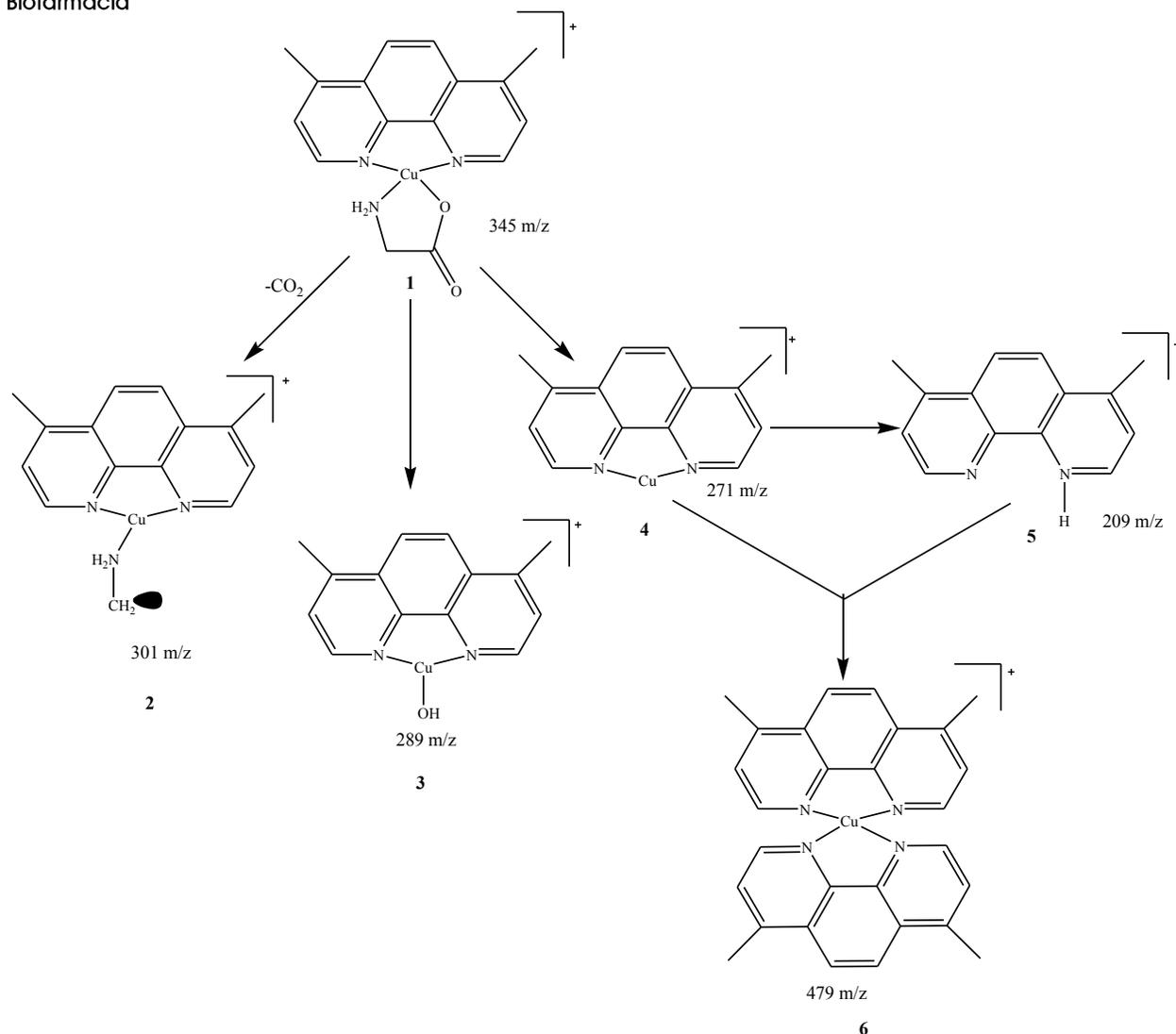


Figura 8. Patrón de fragmentación de la casiopeína IIgly en MeOH/H₂O 1:1.

La adición de ácido heptafluorobutírico en la fase móvil inhibe la formación del compuesto **6** y en su lugar se produce la especie [Cu (4,7-dimetilfenantrolina) (C₄F₇O₂)]⁺ (**8**) como resultado de una reacción interfase. Esta especie despliega una mayor intensidad en comparación con los otros fragmentos e incluso con el ión molecular. Por esta razón, el ión 484 m/z fue seleccionado como ión de cuantificación. Con la finalidad de obtener la mayor intensidad posible de este fragmento, los parámetros del espectrómetro de masas fueron optimizados al igual que la proporción de HFBA en la solución de elusión.

Experimentos reportados indican que la formación de sistemas del tipo $[\text{Cu}^{2+}(\text{N-N})(\text{O-O})]$ en electrospray son altamente favorecidas a partir de los precursores individuales y su producción depende, entre otros factores, de la densidad electrónica que poseen los ligantes [89]. Los estudios de infusión de la casiopeína IIgly revelaron este comportamiento, en donde la formación de la especie **6** es totalmente inhibida, probablemente debido a las mejores características como base dura que posee el ligante $\text{C}_4\text{F}_7\text{O}_2\text{H}$ (HFBA) en comparación con la glicina, dando paso a la generación de **8**. El espectro de masas y el esquema de fragmentación de la casiopeína IIgly disuelta en una solución MeOH/HFBA se muestra en la figuras 9 y 10, respectivamente.

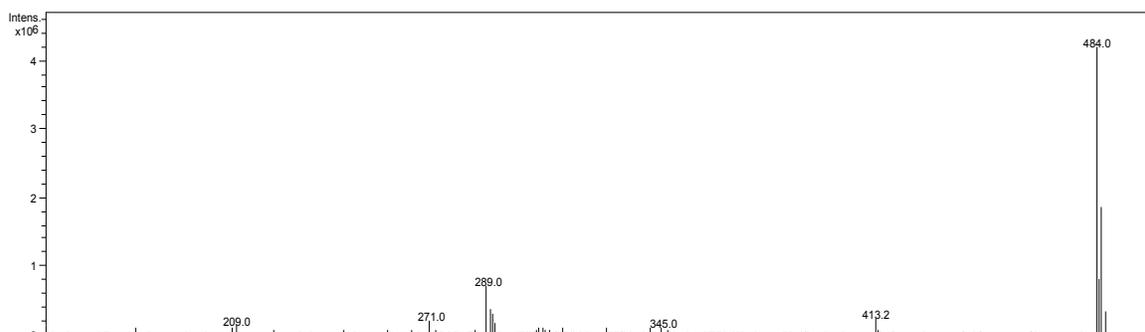


Figura 9. Espectro de masas ESI-IT-MS de la casiopeína IIgly disuelta en FM (MeOH/HFBA 0.1% en H_2O , 1:1).

Los ensayos cromatográficos indicaron que la casiopeína IIgly presentaba una retención y simetría del pico aceptables. Un cromatograma característico se muestra en la figura 11.

Uno de los problemas que puede presentarse en el desarrollo de métodos bioanalíticos en donde se utiliza como detector un espectrómetro de masas es el fenómeno del efecto de memoria o también llamado de acarreo (“carry over”). Esta situación se manifiesta cuando residuos del compuesto a cuantificar se unen al material y/o partes del cromatógrafo después de una inyección. Posteriormente, al analizar la siguiente muestra, el analito adherido se desprende y se adiciona, incidiendo fuertemente en la precisión y exactitud del método si no es eliminado.

Las pruebas realizadas (vía inyección de analito y posteriormente blanco de sistema) demostraron que la casiopeína IIgly se adhiere considerablemente a algunas partes del sistema de inyección del equipo, presentándose en el método el fenómeno de acarreo. Un cromatograma en donde se observa este hecho se encuentra en la figura 12.

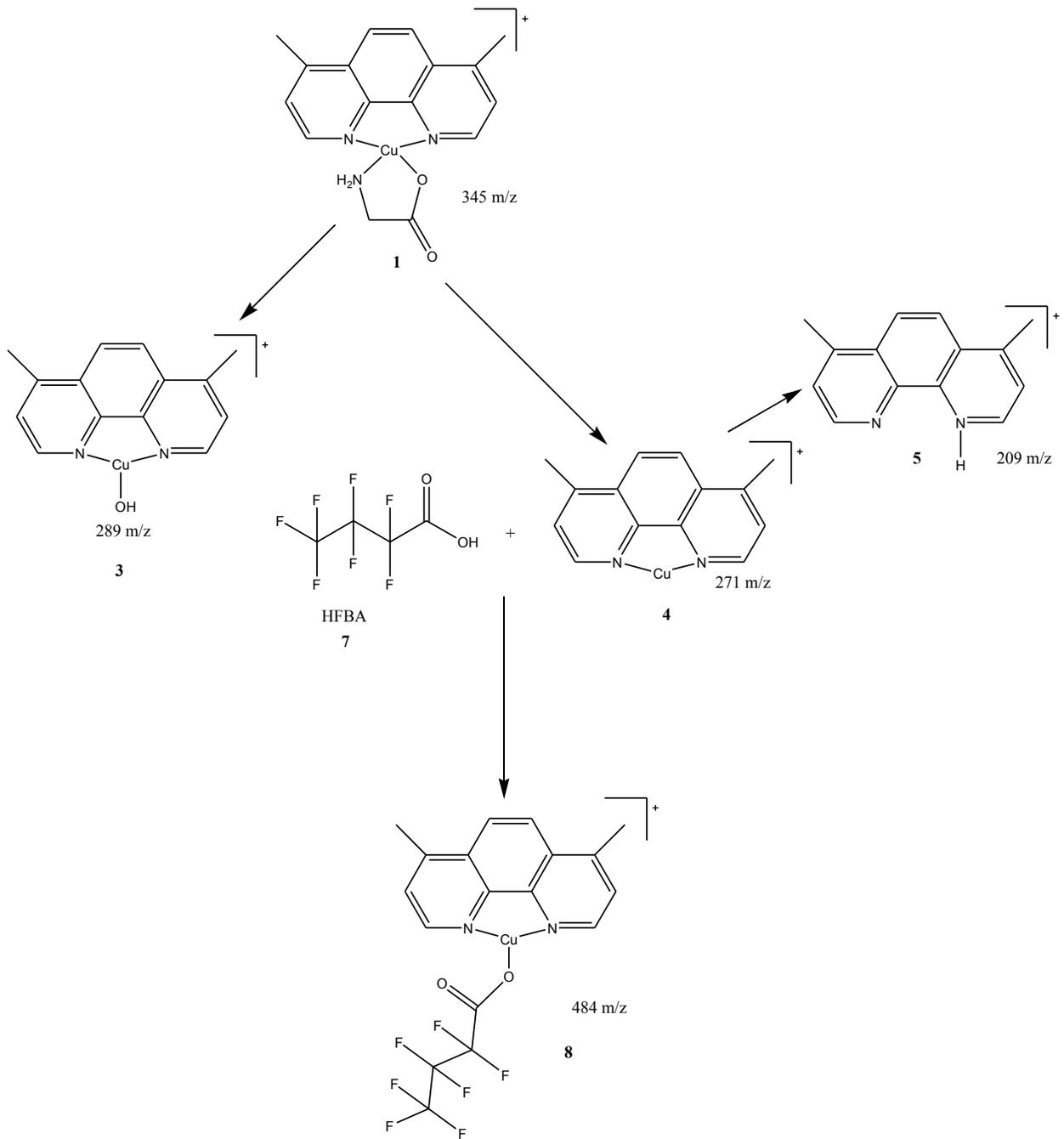


Figura 10. Esquema de fragmentación de la casiopeína IIgly disuelta en MeOH/HFBA en ESI-IT-MS (modo positivo).

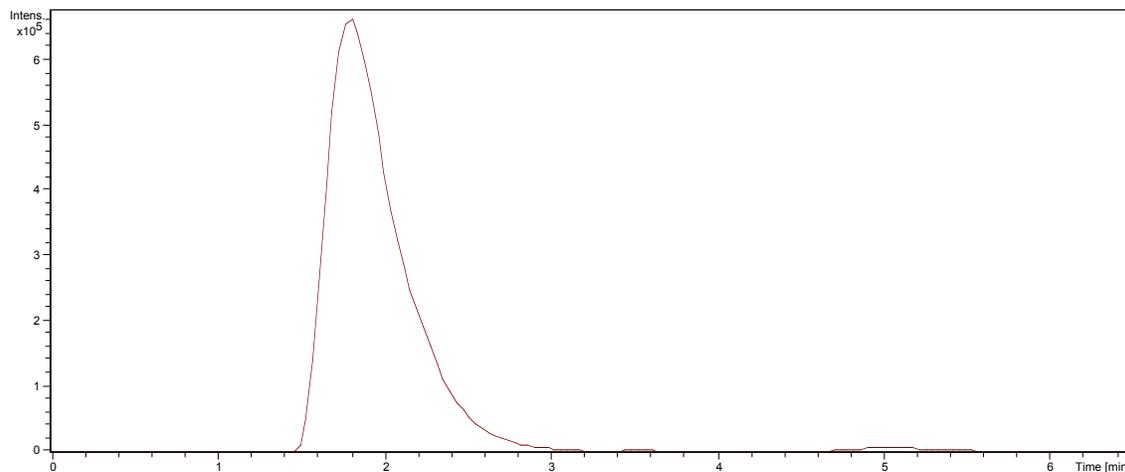


Figura 11. Casiopeína IIgly 10 $\mu\text{g/mL}$ disuelta en FM [MeOH/HFBA 0.1% (2:3)]. SIS al ión 484 m/z . Columna Synergy Polar RP 30mm X 2mm.

Con la finalidad de eliminar este problema, se programó en el cromatógrafo un método energético de lavado entre corridas, en donde la aguja, válvula y sistemas de conducción fueron limpiadas a través de inyecciones sucesivas de metanol y fase móvil. Cabe mencionar que con sistemas convencionales de lavado precargados en los programas del HPLC son insuficientes y sólo atenúan el problema. En la figura 13 se demuestra la eliminación del efecto de memoria al realizar los lavados al sistema.

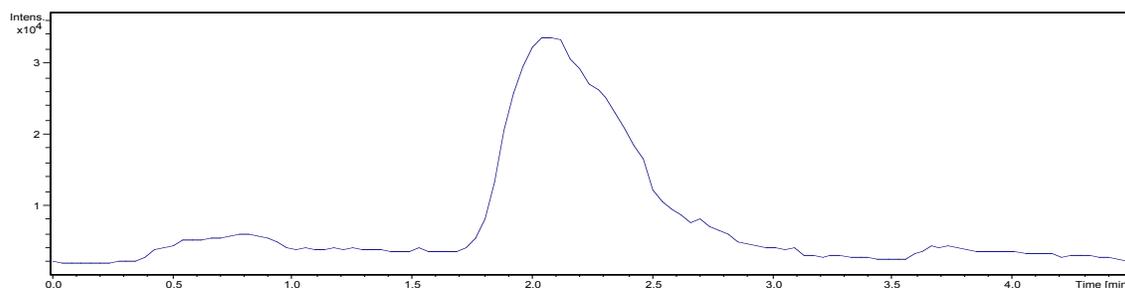


Figura 12. Efecto carry-over. Blanco de fase móvil después de la inyección de una muestra de casiopeína IIgly (5 $\mu\text{g/mL}$) disuelta en agua.

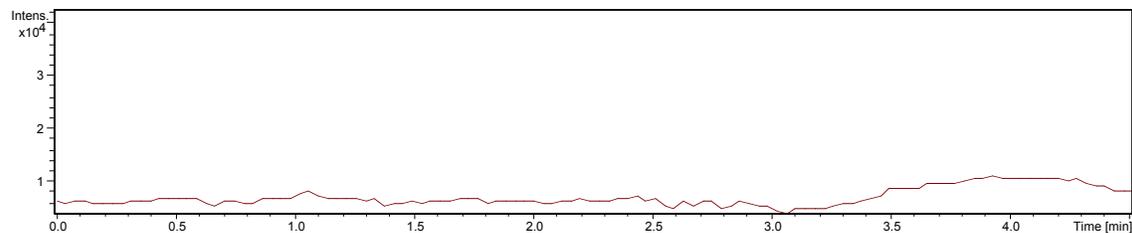


Figura 13. Blanco de sistema después de la inyección de casiopeína IIgly, lavado y análisis de un blanco de fase móvil.

En los experimentos de selección del estándar interno se utilizaron compuestos de cobre análogos a la casiopeína IIgly como bis 4, 7-dimetil fenantrolina de cobre, bis glicina de cobre, $[\text{Cu}^{2+} (4, 4'\text{-dimetil-2,2'\text{-bipiridina)}(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y por otra parte fenitoína, guayfenisina, acetaminofén y ketoprofeno. Los resultados indicaron que el sistema de bis 4,7-dimetil fenantrolina se dividía en dos picos. Por relación carga /masa (m/z) y el tiempo de retención, se deduce que las dos especies resultantes corresponden a la 4,7-dimetil fenantrolina y el compuesto bis de la misma. La bis glicina en este sistema no se observa y los demás estándares, a excepción de la ketoprofeno, poseían un tiempo de retención inadecuado (tr muy grande o demasiado corto). Con base en estos resultados, se seleccionó el ión $299\ m/z$, que corresponde al aducto disódico del ketoprofeno (figura 14).

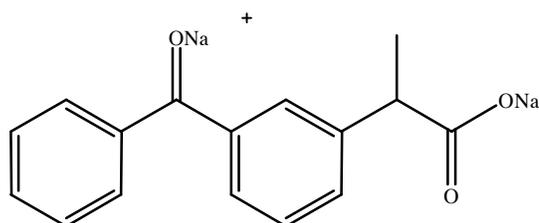


Figura 14. Aducto disódico de ketoprofeno utilizado como estándar externo.

Los ensayos de extracción del compuesto de coordinación en plasma se iniciaron con el uso de metanol como agente precipitante y el HFBA como atenuador de la carga del compuesto de coordinación para su posterior extracción en sistemas de cartuchos de extracción en fase sólida. Se seleccionó empaques aromáticos tratando de que la retención principalmente fuera por interacciones electrónica del tipo π . Finalmente la elución fue hecha con diclorometano, concentrada a sequedad y el residuo (colocado en microviales inactivados) fue reconstituido en fase móvil e inyectado al sistema HPLC-MS-IT. Al término del desarrollo se encontró un tiempo de retención de la casiopeína IIgly de 2 minutos y 7.8 minutos para el ketoprofeno (estándar interno) (Figura 15).

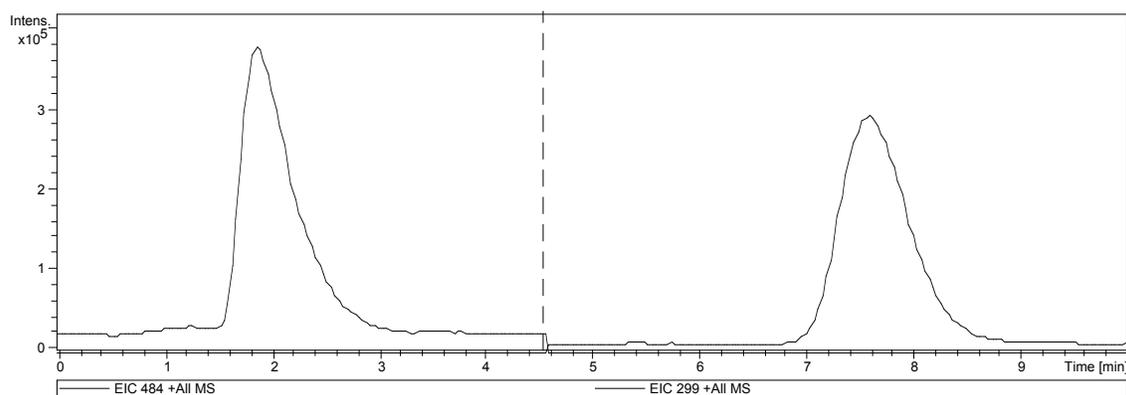


Figura 15. Casiopeína II gly ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) y ketoprofeno ($25\ \mu\text{g}/\text{mL}$)

6.3.1.2 Validación del método

Después del proceso del desarrollo, se procedió a validar el método bioanalítico para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle. Los puntos que conformaron la validación fueron los siguientes: selectividad, supresión iónica, linealidad, límite de cuantificación, recobro, exactitud, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y las diferentes pruebas de estabilidad, las cuales fueron evaluadas a lo largo de todo el proceso. Los procedimientos a detalle para realizar los ensayos de los parámetros de validación se indican en el apartado 6.2.7.4.

6.3.1.2.1 Selectividad

Las pruebas realizadas con los 6 diferentes lotes de plasma de perro beagle indicaron que no existen compuestos endógenos que interfieran con el ión de cuantificación en el tiempo de retención de la casiopeína IIgly. Por otra parte los compuestos como la heparina (utilizado como anticoagulante), fenantrolina y glicina no presentan fragmentos que interfieran con la detección del compuesto de coordinación con 484 m/z o con el ión 299 m/z perteneciente al estándar interno. También se doparon blancos de plasma con casiopeína IIgly para verificar el comportamiento del analito de interés en el fluido y se compararon los resultados antes mencionados. El espectro de masas totales del blanco de plasma y los cromatogramas representativos de la extracción de los iones para la detección del analito y el ketoprofeno se muestran en las figuras 16 y 17, respectivamente.

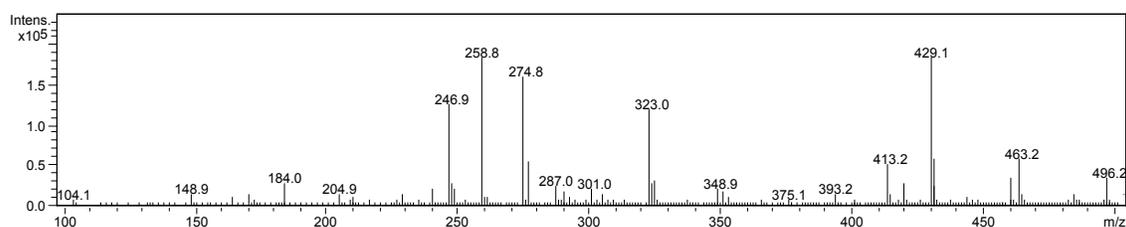


Figura 16. Iones encontrados en el rango de 100 a 500 m/z durante el análisis de blancos de plasma de perro Beagle.

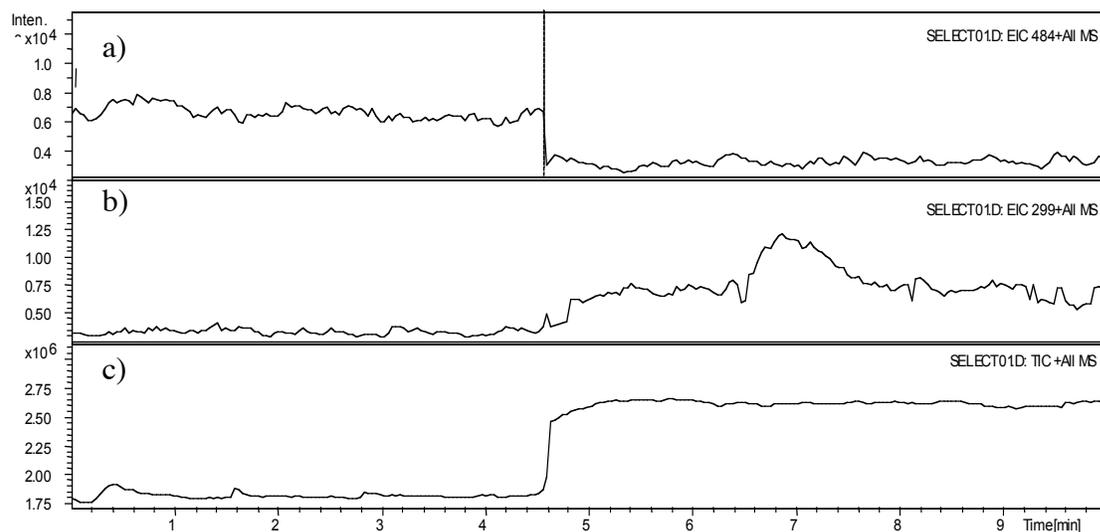
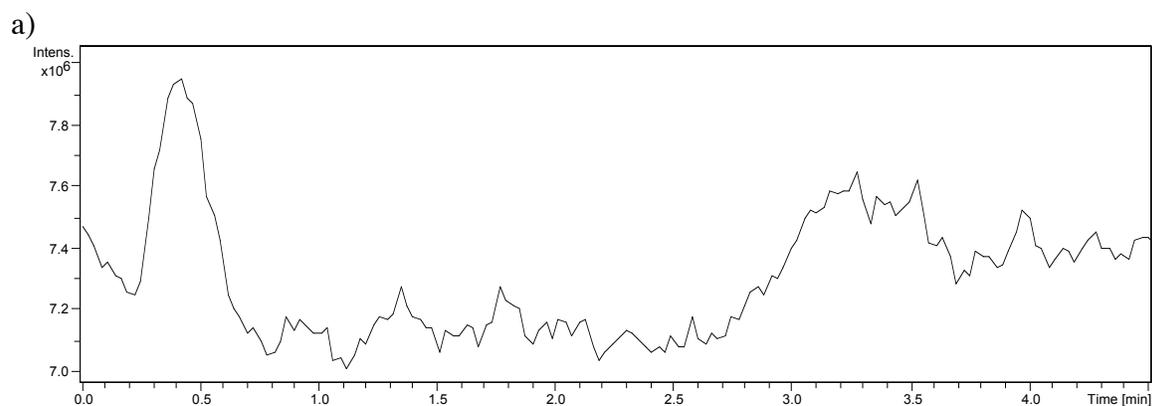


Figura 17. Cromatogramas de un blanco de plasma de perro beagle a) Extracción del ión 484 m/z, b) extracción del ión 299 m/z y c) iones totales.

6.3.1.2.2 Efecto de la matriz

Con el fin de verificar si algún compuesto endógeno suprimía o aumentaban la intensidad del ión de cuantificación, se realizó la prueba del efecto de la matriz, utilizando el método de doble infusión y 6 diferentes lotes de plasma de perro. En todos los casos, no se observó la presencia de picos negativos o positivos en el tiempo de retención de la casiopeína IIgly y el estándar interno. Un cromatograma que representa los resultados obtenidos de este ensayo se muestra en la figura 18.



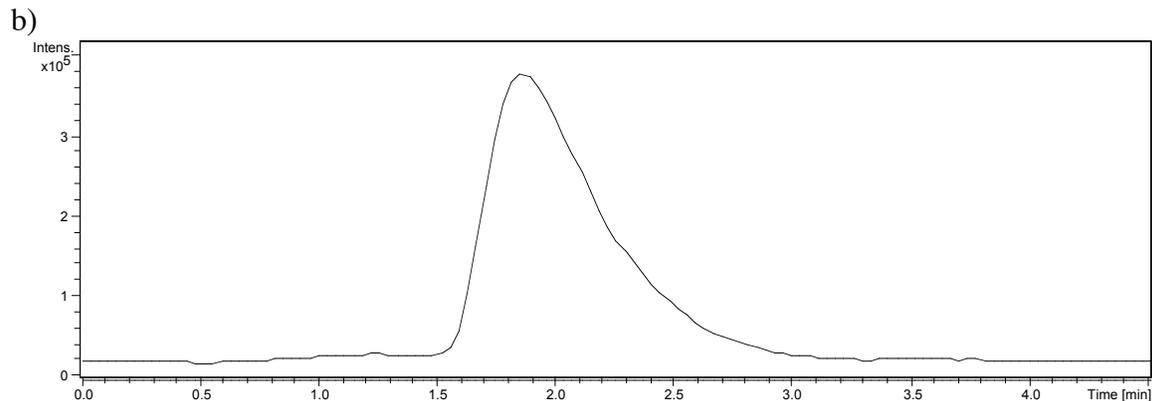


Figura 18. a) Cromatograma resultado del ensayo de doble infusión para investigar el efecto de la matriz sobre la casiopeína IIgly al tiempo de retención del compuesto y b) cromatograma de la casiopeína II gly ($1\mu\text{g/mL}$).

6.3.1.2.3 Linealidad y precisión del sistema de medición.

En la prueba de linealidad del sistema de medición, se prepararon muestras de Casiopeína IIgly en fase móvil en el rango de concentraciones de $0.1\text{-}15\mu\text{g/mL}$. Los resultados de dicho experimento se resume en el cuadro 20 y en la figura 19 .

Cuadro 20. Resultados experimentales de la prueba de linealidad del sistema de medición para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	promedio	DE	%CV
0.1	0.019	0.018	0.019	0.019	0.0005	2.47
0.5	0.474	0.450	0.486	0.470	0.0184	3.92
1	0.955	0.971	0.992	0.972	0.0185	1.90
10	9.229	9.791	9.841	9.621	0.3397	3.53
15	14.710	14.736	15.549	14.998	0.4768	3.18

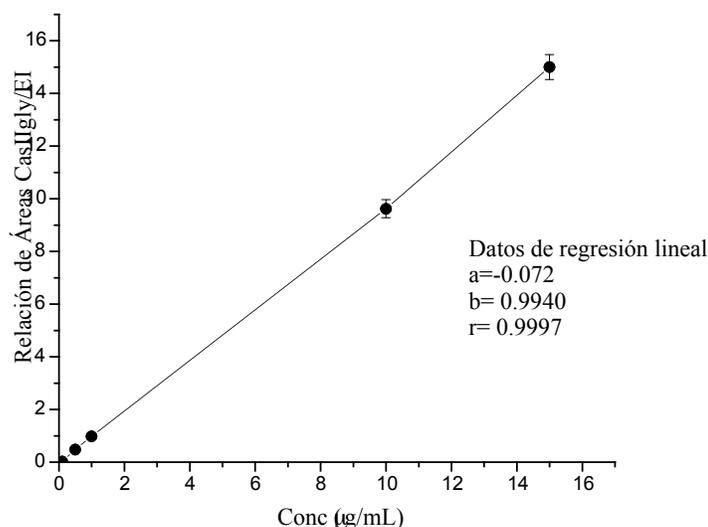


Figura 19. Gráfica de la linealidad del sistema de medición. casiopeína IIgly en fase móvil en el rango de concentraciones de 0.1 a 15 µg/mL.

Los datos de la desviación estándar de la curva a los diferentes niveles indican un probable comportamiento heterocedástico (la varianza de entre las respuestas en el intervalo de concentraciones establecido no posee un valor constante). Este hecho podría incidir en la estimación de la concentración plasmática, por lo que se investigó si el sistema mejoraría el realizar la transformación logarítmica de las variables. El resultado del coeficiente de correlación después de la mencionada transformación fue de 0.9829, valor menor en comparación con una regresión lineal simple (0.9940, figura 19). Por otra parte, la estimación de los valores de Cp son equiparables entre los dos métodos. Con base en estas razones se seleccionó el sistema mas sencillo ($y=mx+b$). De esta manera la ecuación general que describe el comportamiento es $y=0.9940X-0.072$.

Con la finalidad de determinar la precisión del sistema de medición, se calculó el coeficiente de variación para los 5 niveles utilizados en la curva de calibración. Como se aprecia en el cuadro 19, el coeficiente máximo de variación en todos los puntos es de 4%, lo que demuestra una óptima precisión.

6.3.1.2.4 Linealidad del método de medición.

Se determinó la linealidad del método de medición al preparar en un mismo día 3 curvas de calibración de casiopeína IIgly en plasma de perro beagle.. Los datos del mencionado experimento y la gráfica que demuestra el comportamiento se encuentran en el cuadro 21 y la figura 20.

Cuadro 21. Relación de áreas casiopeína IIgly (CasIIgly)/Estándar interno (EI) a 5 niveles de concentración para las tres curvas en el ensayo de linealidad.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	X
0.1	0.019	0.016	0.016	0.017
0.5	0.395	0.423	0.453	0.424
1	0.915	0.805	0.915	0.878
10	8.092	7.992	8.804	8.296
15	13.872	13.201	12.986	13.353

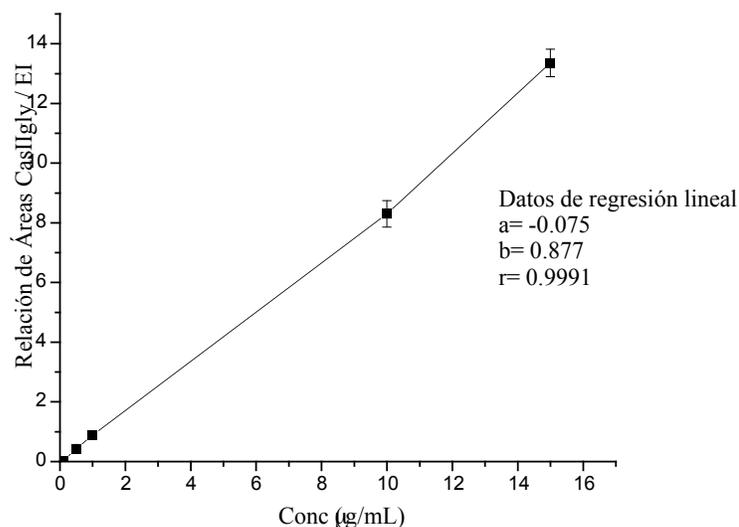


Figura 20. Curva de calibración de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle. Las concentraciones que la conforman son 0.1, 0.5, 1, 10 y 15 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados de las pruebas realizadas para la linealidad del método indican un coeficiente de correlación superior a 0.99, cumpliendo con la especificación de la guía de la FDA. El comportamiento lineal simple, sin utilizar transformaciones ó ponderaciones se describe de manera general con la ecuación $y = 0.877X - 0.075$, en donde el coeficiente de variación entre las pendientes de la curva es igual al 4 %.

6.3.1.2.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación del método para determinar casiopeína IIgly en plasma de perro fue definido como la mínima concentración de la curva de calibración la cual necesariamente debía acreditar una aceptable precisión y exactitud. La determinación de este valor también fue consecuencia del análisis de la relación de la señal analítica y el ruido instrumental. El ensayo se realizó a partir de la preparación y el análisis de muestras a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ por quintuplicado y verificado a lo largo de los 3 días de validación. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 22.

Cuadro 22. Resultados de la prueba del límite de cuantificación. Método en plasma.

Réplica	A	B	C	D	E			
Conc (mcg/mL)	Relación de Áreas CasIIgly/EI					X	DE	%CV
0.1	0.019	0.016	0.016	0.013	0.014	0.016	0.002	14.23
	Concentraciones experimentales							%DEA
	0.108	0.105	0.105	0.101	0.102	0.104		4.10

Las recomendaciones que emite la FDA con respecto a este parámetro, indican que en el nivel inferior la precisión deberá ser menor al 20% y la exactitud deberá encontrarse entre el 80-120% del valor nominal, por lo tanto, bajo ese criterio, el nivel de concentración con valor de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ se definió como el límite de cuantificación.

6.3.1.2.6 Límite de detección

El cálculo del límite de detección se determinó a partir de la ecuación $LD = (3.3 \text{ DEB}/m)$. En la figura 21 se puede observar la señal de ruido de un blanco de plasma, al igual que el cálculo del área en el tiempo de retención de la casiopeína IIgly. En el cuadro 23 se resumen las áreas relativas encontradas.

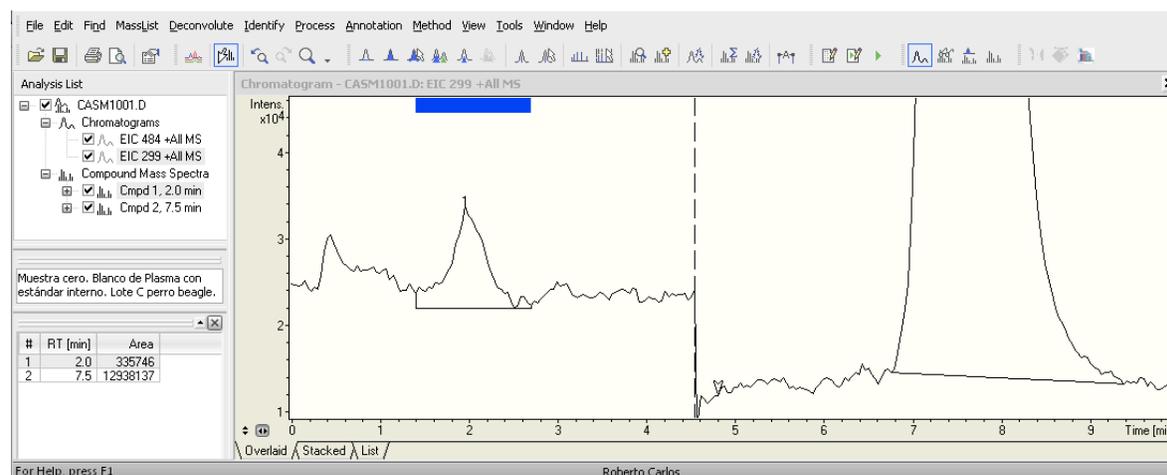


Figura 21. Muestra cero. Blanco de plasma de perro con estándar interno. El segundo pico corresponde a el ketoprofeno (EIC 299 m/z).

Utilizando los datos experimentales, se encontró que el límite de detección del método en plasma para cuantificar el compuesto de coordinación de cobre es de aproximadamente 40 ng/ mL.

Cuadro 23. Cocientes de las respuestas de los blancos entre el estándar interno. Método en plasma.

Áreas			
No	casiopeína IIgly	EI	Relación
1	335743	12938137	0.026
2	120563	13224741	0.009
3	78321	13248771	0.006
4	58964	12855053	0.005
5	292332	13441060	0.022
		$\Sigma =$	0.067
		$\bar{X} =$	0.013

6.3.1.2.7 Recobro absoluto

Con el fin de conocer la cantidad recuperada después del proceso de extracción, se determinó el recobro absoluto. Los datos obtenidos se muestran en el cuadro 24.

Cuadro 24. Recobro absoluto para el método de cuantificación de casiopeína IIgly en plasma de perro.

Recobro absoluto			
Conc (µg/mL)	Sistema	Método	Recobro%
0.1	0.019	0.017	89.78
0.5	0.470	0.424	90.21
1	0.972	0.878	90.33
10	9.621	8.296	86.23
15	14.998	13.353	89.03
		$\bar{X} =$	89.12
		DE=	1.689
		%CV=	1.90

Las guías internacionales de validación indican que el parámetro de recobro (recuperación) no necesariamente deberá ser del 100%, pero debe demostrarse que a los niveles trabajados sea constante. En el caso del método que compete, se obtuvo un recobro aproximado al 90%, además de que a los 5 niveles los valores son muy cercanos, por lo que se establece que este método de cuantificación en plasma cumple con estos parámetros según las indicaciones de la FDA. Por otra lado, el % de recobro del estándar interno fue aproximadamente del 90%.

6.3.1.2.8 Precisión del método

La determinación de la precisión del método se llevó a cabo en sus dos ramas; repetibilidad y reproducibilidad (FDA) ó precisión intermedia (ICH). En el primer caso se evaluó la variación de la respuesta analítica en el mismo día a los 3 niveles de concentración. Por otra parte, la reproducibilidad intermedia fue determinada a través de la variación de los puntos control entre los tres días de validación. Los cuadros 25 y 26 resumen el comportamiento encontrado de los dos parámetros antes descritos.

Cuadro 25. Resultados de la precisión del método en su modalidad de repetibilidad.

Réplica								
(Relación de áreas CasIIgly/EI)								
Conc (µg/mL)	A	B	C	D	E	X	DE	%CV
0.3	0.18	0.21	0.17	0.19	0.17	0.19	0.017	9.16
5	4.30	4.45	4.26	4.32	4.02	4.27	0.156	3.65
12	10.66	10.41	10.04	10.07	10.51	10.34	0.271	2.62

Cuadro 26. Resultados de la precisión del método en su modalidad de reproducibilidad intermedia.

Día						
(Relación de áreas CasIIgly/EI)						
Conc(µg/mL)	1	2	3	X	SD	%CV
0.3	0.185	0.202	0.228	0.205	0.021	10.35
5	4.270	4.034	4.139	4.148	0.118	2.84
12	10.340	9.315	9.104	9.586	0.661	6.90

Los datos de la prueba de reproducibilidad y repetibilidad indica que la máximas variaciones de estos dos parámetros son de 9 y 10% respectivamente y que corresponden al valor mínimo de los puntos control. La guía de validación postula que el valor de la precisión deberá ser menor al 20 % en el punto de concentración mínimo de la curva y para los demás niveles el %CV debe ser menor al 15%, por lo tanto, bajo ese criterio, el método de cuantificación en plasma cumple con los valores preestablecidos. En la figura 22 se presenta una curva de calibración típica que el equipo de masas despliega después de la adquisición y procesamiento de datos, en donde se puede apreciar la tendencia lineal de la curva de calibración así como la disposición espacial en torno a la línea de tendencia de los puntos control.

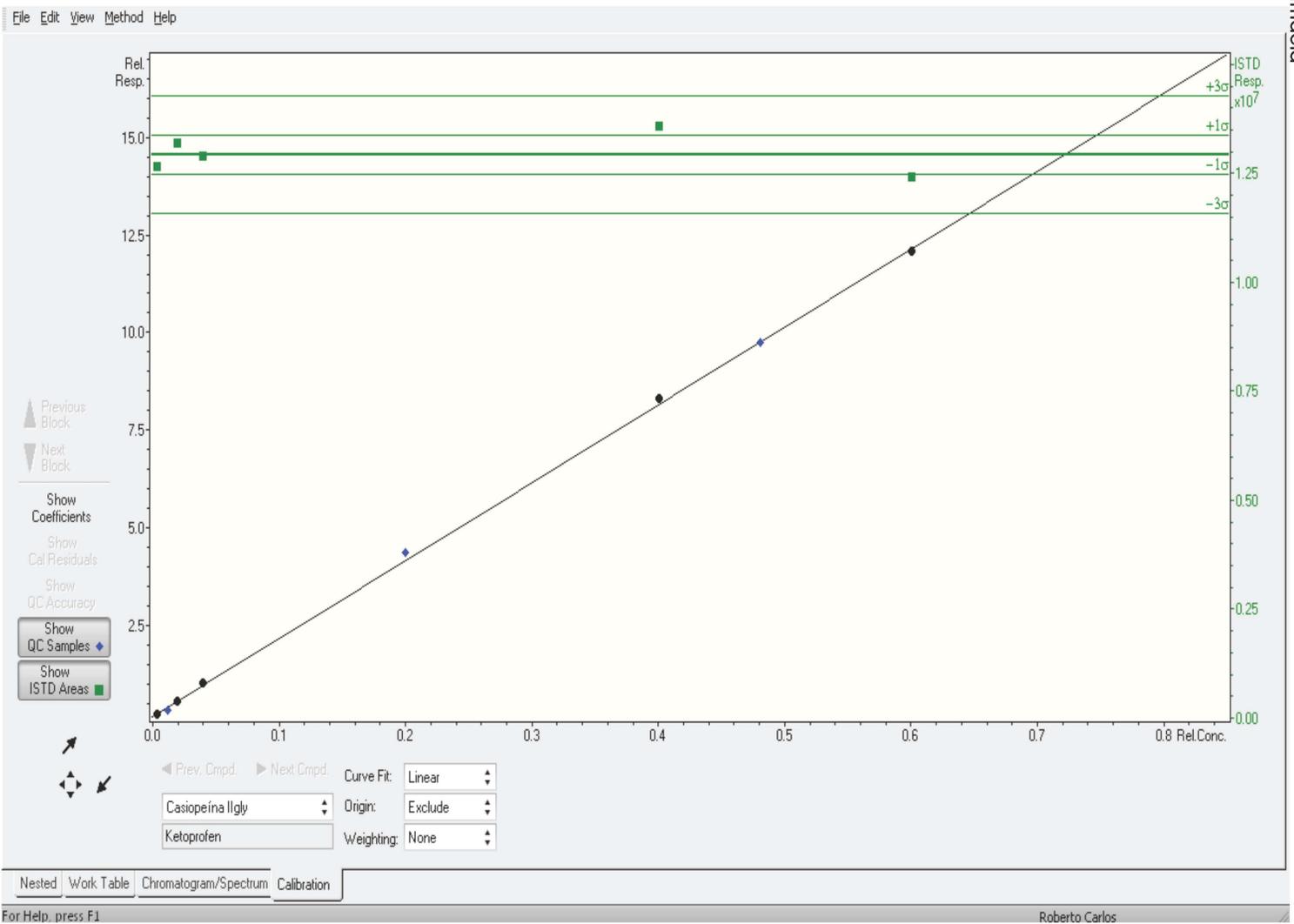


Figura 22. Vista de la curva de calibración de la casiopeína Ilgly en plasma en el software de adquisición y proceso de datos LC/MSD Trap versión 1.6. Los puntos circulares corresponden a los niveles de la curva de calibración, los rombos a los puntos control y los cuadrados son relativos a la dispersión en torno a la media del estándar interno.

6.3.1.2.9 Exactitud del método

Con el objetivo de determinar el grado de concordancia entre las concentraciones experimentales y teóricas se utilizaron los datos de los puntos control a tres niveles durante el transcurso de la prueba de validación. En el primer caso, blancos de plasma cargados con casiopeína IIgly fueron analizadas según el método indicado y se calculó la concentración experimental por interpolación de la respuesta normalizada del analito en una curva de calibración fresca. Los resultados encontrados se expresan en % recuperado y se muestran en el cuadro 27.

Cuadro 27. Exactitud del método en la determinación de casiopeína IIgly en plasma.

Valor nominal	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)			X	DE	%CV
	A	B	C			
0.3	0.30 (99.22)	0.32 (105.41)	0.35 (115.20)	106.61	8.06	7.56
5	4.95 (99.01)	4.68 (93.65)	4.80 (96.03)	96.23	2.69	2.79
12	11.87 (98.88)	10.70 (89.15)	10.46 (87.15)	91.73	6.28	6.84

En todos los casos, los valores del porcentaje recuperado se encuentran entre $\pm 15\%$ del porcentaje teórico (100%). Estos datos indican que el método presenta una aceptable precisión de acuerdo a la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA.

6.3.1.2.10 Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación.

El propósito de la prueba fue el determinar si las muestras no presentaban variación en la concentración después de ser sometidas a 3 ciclos de congelación/ descongelación. La prueba es determinante para validar los resultados después de procesos en donde la muestra sufre cambios de temperatura (almacenamiento-ambiente) debido al reanálisis o cambios de lugar. Los datos de este ensayo se encuentran en el cuadro 28.

Cuadro 28. Resultados de la prueba de estabilidad de la casiopeína IIgly en los ciclos de congelación / descongelación.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Replica (conc $\mu\text{g/mL}$)			X	SD	%CV	DEA
	1	2	3				
0.3	0.31	0.30	0.36	0.32	0.03	10.26	7.62
5	4.71	4.74	4.43	4.63	0.17	3.67	7.43
12	10.81	11.84	11.68	11.45	0.56	4.86	4.62



De acuerdo a los datos obtenidos, el % de desviación estándar absoluta (%DEA) se encuentra en el rango de $\pm 15\%$, lo que demuestra la ausencia de una degradación significativa de la casiopeína IIgly en plasma después de haber sido sometida a los ciclos congelación / descongelación.

6.3.1.2.11 Estabilidad a largo plazo

En ensayo fue determinado con el objetivo de investigar el posible cambio de la concentración de la casiopeína IIgly en plasma al ser almacenada en el refrigerador en un lapso de tiempo considerable. Los puntos a los cuales se realizó el análisis fueron 24, 48 y 72 horas, además de 7 días. Los resultados del ensayo se presentan en el cuadro 29.

Cuadro 29. Resultados de la estabilidad a largo plazo.

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo				X	%DEA	
	24h	48h	72h	7 días			
	Conc experimental ($\mu\text{g/mL}$)						
0.3	0.27	0.30	0.34	0.35	0.32	5.36	
5	5.22	4.99	4.30	4.26	4.69	6.14	
12	12.35	12.08	11.73	11.57	11.93	0.58	

Los datos demuestran que no existe degradación significativa del analito de interés al menos hasta los 7 días de almacenamiento en el frigorífico ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

6.3.1.2.12 Estabilidad pospreparativa.

Después del procesamiento, existe la posibilidad de que las muestras preparadas y listas para su inyección en el sistema HPLC-MS puedan degradarse. Con la finalidad de investigar este punto, se realizó un estudio de estabilidad de muestra procesada. Los resultados se muestran en el cuadro 30.

Cuadro 30. Resultados de la estabilidad post-preparativa

Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (h)				X	%DEA
	0	6	12	24		
	Conc. experimental ($\mu\text{g/mL}$)					
0.3	0.35	0.31	0.31	0.33	0.32	8.24
5	4.78	5.12	5.35	5.64	5.22	4.43
12	11.72	12.29	12.17	12.41	12.15	1.22

Los datos sugieren que las muestras procesadas de casiopeína IIgly son estables al menos 24 horas cuando se colocan en el inyector del equipo, debido a que no se presenta un cambio en el %DEA mayor al $\pm 15\%$. Cabe mencionar que en el ensayo farmacocinético el procesamiento de muestras se realizó de manera continua en conjunto con la inyección, por lo que ninguna muestra permaneció más de 6 horas en el inyector.

6.3.2 Método bioanalítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre total de perro beagle por HPLC-IT-MS

6.3.2.1 Desarrollo del método bioanalítico.

El desarrollo del método analítico para la cuantificación de sangre total del perro beagle se avocó primordialmente a la extracción del compuesto de coordinación del fluido biológico.

Se realizaron diversos experimentos para poder encontrar el mejor sistema de extracción en donde se involucró como agentes precipitantes sulfato de zinc, acetonitrilo, metanol, HFBA y mezclas de estas sustancias a diferentes concentraciones, con el fin de aislar el anticancerígeno en sangre y así poderlo cuantificar.

La adición de sulfato de zinc al blanco cargado con casiopeína IIgly provocó la descoordinación del complejo en estudio. Por otra lado, se observó una baja recuperación del analito cuando de manera unitaria y conjunta se utilizó los disolventes metanol y acetonitrilo. Los mejores resultados fueron obtenidos a través de la mezcla de HFBA y ACN; el primero funge como mitigador de la carga formal de la casiopeína y el segundo como agente precipitante de las proteínas plasmáticas, el cual posee una mayor capacidad de floculación que el metanol en relación volumen/volumen. Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones de la cantidad de acetonitrilo y el porcentaje de HFBA, se realizó un diseño de experimentos del tipo 2 factorial (2^n , $n=2$) con un número de repeticiones igual a 3 ($r=3$). En el cuadro número 31 se indica la matriz de experimentos realizados.

Cuadro 31. Matriz de experimentos para el diseño factorial 2^2 .

Tratamiento	Notación codificada	Factor 1	Factor 2
		Acetonitrilo (μL)	% HFBA
1	--	100	5
2	-+	100	8
3	+ -	300	5
4	++	300	8

La magnitud a cuantificar para cada experimento fue el área bajo la curva del pico cromatográfico. Ya teniendo los resultados, se llevó a cabo un análisis estadístico de los valores encontrados utilizando el programa computacional IBM SPSS 19 con la finalidad de determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos aplicados. La descripción estadística de las áreas bajo la curva del pico cromatográfico y valores del análisis de la varianza se muestran en los cuadros 32 y 33, respectivamente.

Cuadro 32. Media y desviación estándar del área bajo la curva de los picos cromatográfico para cada tratamiento.

Descriptive Statistics

Dependent Variable:Área

ACN	HFBA	Mean	Std. Deviation	N
100.00	5.00	3384397.0000	71660.08616	3
	8.00	3405441.3333	46243.92566	3
	Total	3394919.1667	55157.28993	6
300.00	5.00	9672049.6667	55395.04938	3
	8.00	5574232.0000	67695.75961	3
	Total	7623140.8333	2245148.86360	6
Total	5.00	6528223.3333	3444365.59162	6
	8.00	4489836.6667	1189026.64956	6
	Total	5509030.0000	2677384.30901	12

Cuadro 33. Resultados del análisis de la varianza para el diseño de experimentos 2x2.

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Área

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.882E13	3	2.627E13	7041.646	.000
Intercept	3.642E14	1	3.642E14	97606.174	.000
ACN	5.363E13	1	5.363E13	14374.161	.000
HFBA	1.247E13	1	1.247E13	3340.721	.000
ACN * HFBA	1.272E13	1	1.272E13	3410.056	.000
Error	2.985E10	8	3.731E9		
Total	4.430E14	12			
Corrected Total	7.885E13	11			

a. R Squared = 1.000 (Adjusted R Squared = .999)

Como se puede observar en el cuadro 33, la fila de modelo corregido posee un valor crítico asociado al estadístico F menor al 0.05, lo que indica que el modelo tiene la capacidad de explicar una parte significativa de la variación observada de la variable dependiente (áreas cromatográficas). El valor de R^2 indica que los tres efectos incluidos en el modelo contribuyen a aplicar el 99% de la varianza de la variable dependiente. Por otra parte, los efectos individuales de los dos factores incluidos en el modelo y la interacción entre ellos tiene significancia estadística, debido a que los niveles críticos (sig.) son menores a 0.05 ($0.00 < 0.05$). Estos resultados demuestran que los tratamiento aplicados para la extracción de la casiopeína IIgly son diferentes. De esta forma se estableció que la mezcla de HFBA al



5% y 0.6 mL de acetonitrilo era el mejor tratamiento para la extracción de la casiopeína IIgly con una recuperación aproximadamente del 65% del analito a partir de la sangre.

Con el objetivo de validar el modelo estadístico, se realizó la prueba de Levene para verificar la igualdad en el error de las varianzas y, utilizando los errores estandarizados obtenidos de la prueba del análisis de varianza, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, la cual sirve para determinar si los datos ingresados se comportan acorde con una distribución normal. Los resultados se muestran en los cuadro 34 y 35.

Cuadro 34. Prueba de Levine para determinar si existe igualdad entre los errores de la varianza.

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable:Área

F	df1	df2	Sig.
.243	3	8	.864

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + ACN + HFBA + ACN *

HFBA

Cuadro 35. Resultados de la Prueba de Shapiro-Wilk.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Área	.127	12	.200*	.940	12	.494

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Según el cuadro se observa que si existe igualdad en los errores de la varianza de los datos ingresados debido a que el nivel crítico es mayor a 0.05 ($0.864 > 0.05$) y además, se aprecia en el cuadro 35 que los errores estandarizados siguen un comportamiento normal ($0.494 > 0.05$). Estos resultados indican que el análisis de la varianza realizado es válido.

6.3.2.2 Validación del método bioanalítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre de perro beagle.

La validación del método analítico descrito fue realizado de acuerdo a las recomendaciones de las guías de validación de la FDA. Los puntos que fueron llevados a cabo para demostrar la confiabilidad de este método bioanalítico fueron los siguientes: selectividad, efecto de la matriz, linealidad del método, límite de cuantificación, límite de detección, recobro, precisión en sus dos modalidades (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y 3 tipos de estabildades: ciclos congelación-descongelación, estabilidad a largo plazo y estabilidad pospreparativa.

6.3.2.2.1 Selectividad.

Los cromatogramas resultado del procesamiento blancos de sangre de perro beagle (6 lotes) demostraron que no existen interferencias significativas provenientes de la matriz o la heparina con los iones de cuantificación del analito (484 m/z) y del estándar interno (299 m/z) al tiempo de retención correspondiente. En la figura 23 se muestra un cromatograma característico después del análisis de un blanco de sangre con el método desarrollado. Por otra parte, en la figura 24 se puede apreciar los picos cromatográficos de la Casiopeína y el estándar interno, los cuales tuvieron un tiempo de retención de 2.1 y 7.8 minutos, respectivamente.

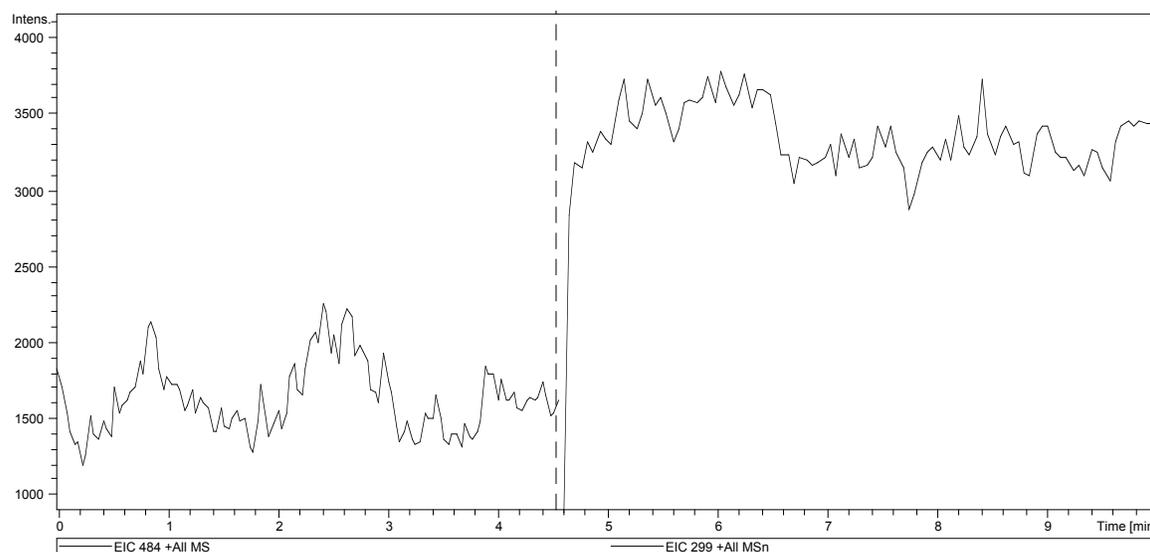


Figura 23. Cromatograma característico de un blanco de sangre.

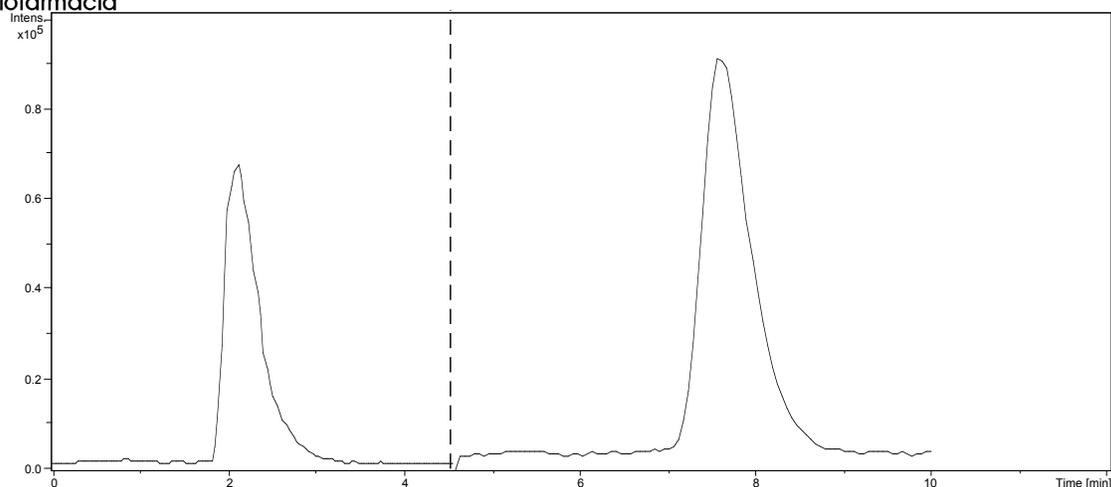


Figura 24. Cromatogramas de la casiopeína IIgly (484 m/z, $t_r = 2.1$ min) y ketoprofeno (299 m/z, $t_r = 7.8$ min) en sangre de perro beagle .

6.3.2.2.2 Efecto de la matriz

En esta metodología de determinación analítica, se realizó el ensayo del efecto de la matriz con base en la metodología reportada por Matuzsewski *et al.*, utilizando para ello la sangre de perro proveniente de 6 lotes diferentes, a 3 niveles de concentración. Los resultados de esta prueba en la cual se muestra el porcentaje recuperado como parámetro discriminante se resume en el cuadro 36.

Cuadro 36. Resultados del ensayo del efecto de la matriz a tres niveles de concentraciones.

Conc (µg/mL)	Rel. Áreas (postextracción/sistema)X100					Promedio	SD	%CV
	1	2	3	4	5			
0.3	92.41	94.47	115.08	99.37	103.98	101.06	9.030	8.93
5	99.89	105.61	91.64	95.38	94.98	97.50	5.401	5.54
12	93.97	84.86	99.30	99.85	91.35	93.87	6.179	6.58

La guía de la FDA para validación de métodos bioanalíticos indica que se deberá determinar el efecto de la matriz sobre la cuantificación del analito de interés, con la finalidad de no comprometer los parámetros como la precisión y la sensibilidad del método, sin embargo no provee de un valor límite. La EMEA, por su parte, en su reciente guía de validación, postula que el coeficiente de variación entre las determinaciones no deberá ser superior al 15% con una exactitud para el punto con concentración más bajo del 20%. Con base en esta última recomendación y debido a que se obtuvieron coeficientes de variación entre el 6.5 al 8.9%, la evidencia experimental demuestra que no existe un efecto de la matriz considerable en el método de determinación de casiopeína IIgly en sangre de perro.



Para la prueba de linealidad, se prepararon cinco curvas de calibración en sangre de perro beagle. Los resultados se encuentran en el cuadro 37. Es importante mencionar no se reporta en esta sección los datos de linealidad del sistema debido a que en el apartado 6.3.1.2.3 ya se describieron.

Cuadro 37. Prueba de linealidad del método. Relación de áreas de casiopeína IIgly/EI para cada concentración que conforman la curva de calibración.

Conc (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	X	DE	%CV
0.1	0.097	0.090	0.108	0.073	0.096	0.093	0.0125	13.52
0.5	0.362	0.354	0.311	0.357	0.342	0.345	0.0203	5.89
1	0.948	0.800	0.963	0.942	0.992	0.929	0.0747	8.04
10	9.474	8.533	8.444	8.656	8.570	8.735	0.4198	4.81
15	13.670	12.578	13.043	12.588	12.972	12.970	0.4456	3.44

Como se puede observar en el cuadro anterior, por los valores de la desviación estándar se infiere que el sistema se comporta de manera heteroscedástica. Con la finalidad de obtener una varianza menor, se comparó el comportamiento lineal simple vs la regresión lineal de los datos transformados (logarítmicos). En el primer caso se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9996 y para los datos transformados según el modelo se encontró un valor de 0.9811. Por otra parte, la exactitud del modelo lineal simple fue mejor que su contraparte. Por estas razones se seleccionó el sistema más sencillo.

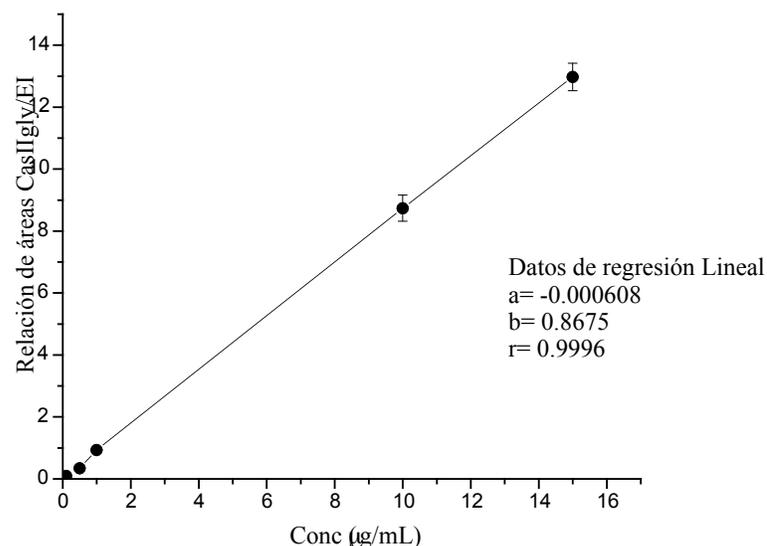


Figura 25. Curva de calibración de casiopeína IIgly en sangre de perro Beagle. Los niveles que la conforman son 0.1, 1, 5, 10 y 15 µg/mL.

La ecuación general que describe el comportamiento es $y = 0.896X + 0.0006$, con un coeficiente de variación entre las pendientes del 3.7%.

6.3.2.2.4. Límite de cuantificación.

En la determinación del límite de cuantificación, se estudió como valor el nivel menor de la curva de calibración. Los resultados del análisis por quintuplicado (cuadro 38) fueron confrontados con las especificaciones de precisión y exactitud de la normatividad para este parámetro.

Cuadro 38. Límite de cuantificación. Análisis de la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

	Réplica						SD	%CV	%DEA
	A	B	C	D	E	X			
Relación de Áreas (CasIIgly/EI)	0.097	0.090	0.108	0.073	0.096	0.093	0.013	13.52	
Conc experimental ($\mu\text{g/mL}$)	0.11	0.10	0.12	0.09	0.11	0.11	0.015		7.61
% a partir del Valor nominal	112.65	104.28	124.74	85.38	110.99	107.61			

Los datos indican que al nivel más bajo de la curva el coeficiente de variación es menor al 20%, además de que la exactitud, determinada a partir del porcentaje de la desviación estándar absoluta (%DEA) también tiene un valor inferior al ± 20 . Debido a que los resultados se comparten con suficiente consistencia y exactitud con base en las recomendaciones de la FDA, se definió como límite de cuantificación 0.1 $\mu\text{g/mL}$.

6.3.2.2.5 Límite de detección.

Este punto de la validación fue determinado a partir de los promedios de la respuesta de 5 blancos de sangre procesados y la ecuación que relaciona la pendiente con tres veces el valor de la desviación estándar. Se encontró como límite de cuantificación 50 ng/mL aproximadamente.

6.3.2.2.6 Recobro relativo

La capacidad de extracción del método fue investigado con base en la evaluación del recobro relativo, metodología que elimina la posible contribución de la matriz en la respuesta de medición analítica, en este caso el área obtenido con el detector de masas. Los resultados se resumen en el cuadro 39. El recobro de la casiopeína IIgly en sangre es del 65% aproximadamente, valor el cual es bajo, sin embargo debido a que la matriz es muy compleja y los valores obtenidos entre los niveles se aprecian constantes, se consideró como un valor aceptable. Cabe mencionar que la guía de validación de métodos bioanalíticos indica que no necesariamente debe obtenerse el cien porciento del recobro, pero debe ser constante y reproducible, lo cual cumple el método descrito.

Cuadro 39. Ensayo de recobro en el método bioanalítico para cuantificar la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle (n=5).

Conc (µg/mL)	Carga posextracción	Método	Recobro%
0.3	0.457	0.281	61.44
5	6.194	4.205	67.89
12	15.622	10.010	64.07
		X	64.47
		DE	3.244
		%CV	5.03

6.3.2.2.7 Precisión del método

La precisión fue evaluada en sus dos vertientes (repetibilidad y reproducibilidad o repetibilidad intermedia) utilizando el valor de las relación de áreas a tres niveles de concentración. Los resultados de estas pruebas se muestran en los cuadros 40 y 41.

Cuadro 40. Precisión del método de medición en su modalidad de repetibilidad (en el día).

Conc (µg/mL)	Réplica							%CV
	A	B	C	D	E	X	DE	
0.3	0.310	0.257	0.278	0.266	0.294	0.281	0.022	7.66
5	4.336	4.267	4.323	4.404	3.696	4.205	0.289	6.87
12	9.903	10.067	10.058	10.148	9.872	10.010	0.117	1.17

Cuadro 41. Precisión del método de medición en su modalidad de precisión intermedia.

Conc (µg/mL)	Día					X	DE	%CV
	1	2	3	4	5			
0.3	0.281	0.317	0.280	0.228	0.271	0.275	0.032	11.63
5	4.205	4.475	4.516	4.644	4.599	4.488	0.172	3.82
12	10.010	10.573	10.522	10.683	10.143	10.386	0.292	2.82

Los resultados de la evaluación de la precisión indican que el coeficiente de variación intra-día fluctúa entre el 1.2 y 7.7 % , lo que denota una aceptable repetibilidad. En al caso de la variación de la respuesta inter-día, los valores del %CV a los tres niveles ensayados son menores al 15%, lo que se traduce en una buena reproducibilidad (o precisión intermedia) del método. Una curva de calibración característica con sus correspondientes puntos control en la determinación de la repetibilidad se encuentra en la figura 26.

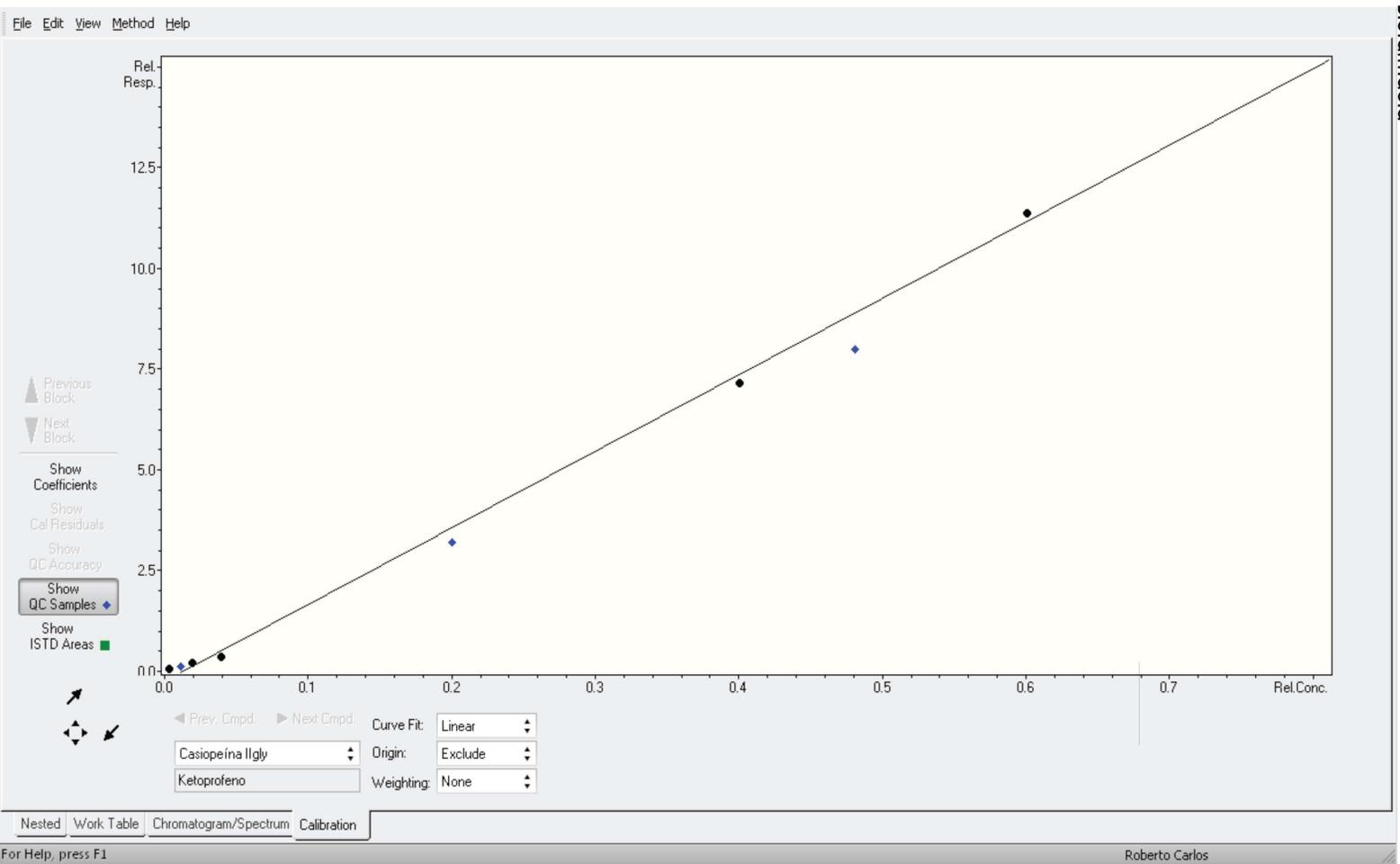


Figura 26. Vista típica de una curva de calibración (●) en sangre con los correspondientes puntos control (◆) en el software LC/MSD Quant Analysis versión 1.6 de Bruker Daltonic GmbH.

6.3.2.2.8 Exactitud

La exactitud del método fue monitoreada a lo largo del tiempo del proceso de validación. Los resultados se muestran en el cuadro 42.

Cuadro 42. Resultados de la prueba de exactitud el método bioanalítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre de perro.

Conc (µg/mL)/Día	Concentración experimental (µg/mL)					X (%recup)	SD	%CV
	(Porcentaje recuperado)							
0.3	0.36	0.30	0.32	0.31	0.34	108.20	8.271	7.64
	(119.49%)	(98.85%)	(106.89%)	(102.55%)	(113.20%)			
5	5.00	4.92	4.98	5.08	4.26	96.96	6.657	6.87
	(99.97%)	(98.38%)	(99.69%)	(101.54%)	(85.22%)			
12	11.42	11.60	11.59	11.70	11.38	96.16	1.124	1.17
	(95.14%)	(96.71%)	(96.62%)	(97.48%)	(94.98%)			

En los 3 niveles de concentración ensayados por quintuplicado se obtuvo un porcentaje de recuperación promedio entre el 96 al 108% , con un coeficiente máximo de variación del 8% aproximadamente. Estos valores demuestran que el método es exacto.

6.3.2.2.9 Estabilidad. Ciclos congelación-descongelación.

En este punto se evaluó la posible degradación del analito en sangre después de descongelar y congelar la muestra en 3 ciclos de 12 horas. Se calcularon las concentraciones experimentales y se determinó el porcentaje recuperado en relación al valor nominal. Los resultados se indican en el cuadro 43.

Cuadro 43. Resultados de la prueba de estabilidad Ciclos congelación/descongelación.

Conc (µg/mL)	R1	R2	R3	X	%CV	%recuperado
0.3	0.30	0.30	0.33	0.31	5.51	104.16
5	4.82	4.98	4.63	4.81	3.58	96.23
12	10.93	12.35	12.08	11.78	6.42	98.21

Como se observa, las concentraciones de casiopeína IIgly, el promedio del porcentaje recuperado es cercano al 100% a cada nivel, esta manera se demuestra que no existe una degradación significativa al someter las muestras a este proceso.

6.3.2.2.10 Estabilidad pospreparativa

La prueba se realizó con la finalidad de investigar si las muestra preparadas y colocadas en el inyector presentaba signos de descomposición. Los datos colectados durante el ensayo se presentan en el cuadro 44.

Cuadro 44. Estabilidad pospreparativa (inyector) en el método de sangre total.

Conc (µg/mL)	Tiempo (h)					%Recuperado
	1	6	12	24	X	
0.3	0.27	0.28	0.29	0.32	0.29	96.80
5	5.06	5.30	4.97	4.60	4.98	99.68
12	12.19	11.78	11.73	12.80	12.13	101.06

Los resultados indican que la muestras procesadas de casiopeína IIgly colocadas en el inyector son estables al menos 24 horas.

6.3.3 Método bioanalítico para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre de perro beagle (método 2).

6.3.3.1 Desarrollo del método bioanalítico.

Debido al bajo recobro obtenido en el método anterior, se desarrollo un método analítico basado en el método anterior en sangre con la finalidad de mejorar el porcentaje de extracción del compuesto de coordinación. En la técnica de extracción se utilizó ciclos congelación descongelación para lisar las células rojas y obtener, en el caso de que la casiopeína IIgly se uniera al paquete sanguíneo de células rojas, una mejor respuesta analítica al realizar el análisis. Como su predecesor, el método fue validado de acuerdo a las recomendaciones de la FDA.

6.3.3.2 Validación del método

6.3.3.2.1 Selectividad

En la figura 27 se muestra un cromatograma de iones totales característico de un blanco de sangre después de los procesos de extracción e inyección, tomando en cuenta un intervalo de 0 a 700 m/z y un tiempo de corrida de 5 minutos. Como se puede observar, no existen interferencias en las regiones correspondientes a 484 m/z y 381 m/z, los iones de cuantificación de la casiopeína IIgly y el estándar interno, respectivamente. Además, no se observó interferencia con la heparina, anticoagulante seleccionado para el estudio farmacocinético.

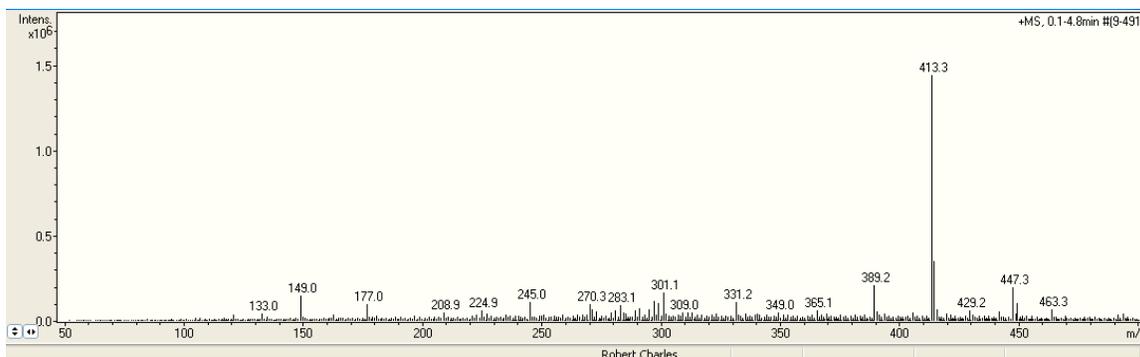


Figura 27. Espectro de masas característico de un blanco de sangre después de los procesos de extracción e inyección al sistema HPLC-MS.

6.3.3.2.2 Efecto de la matriz

Los datos promedio del efecto de la matriz para este método se presentan en el cuadro 45.

Cuadro 45. Resultados del efecto de la matriz en el método analítico para cuantificar casiopeína IIgly en sangre.

Conc (µg/mL)	Sistema	Método	%EM
0.1	0.096	0.086	90.15
3	2.806	2.633	93.83
7	6.992	6.275	89.74
promedio=			91.24

Los resultados encontrados demuestran a las tres concentraciones evaluadas un valor promedio aproximado del %EM del 91%, por lo que se considera que no existen componentes de la sangre total que al tiempo de retención de la casiopeína IIgly co-eluyan y afecten su ionización de manera significativa. Cabe mencionar que la guía de la EMEA indica que es aceptable un valor del efecto de la matriz menor o igual al 15%.

6.3.3.2.3 Linealidad del método

La linealidad del método fue realizada al evaluar 5 curvas de calibración (intervalo de 0.025 a 10 µg/mL) en el mismo día. Los datos de relación de áreas se indican en el cuadro 46.

Cuadro 46. Datos de linealidad del método. Método 2 en sangre.

Conc($\mu\text{g/mL}$)	R1	R2	R3	R4	R5
0.025	0.004	0.005	0.004	0.004	0.005
0.5	0.383	0.386	0.387	0.384	0.386
1	0.774	0.781	0.785	0.786	0.781
5	3.844	3.852	3.846	3.844	3.848
10	7.846	7.85	7.846	7.854	7.852
a=	-0.0214189	-0.017396	-0.0164878	-0.0182844	-0.018101
b=	0.78415094	0.78432558	0.7836877	0.78447334	0.78441785
r=	0.99995407	0.99995867	0.99995182	0.99994478	0.99995263

Se observa que cada curva presenta un coeficiente de correlación mayor al 0.99. Por otra parte, el %CV entre las ordenadas al origen de las curvas se observa del 10%, lo que indica una buena reproducibilidad en torno a dicho parámetro. La regresión utilizando todos los puntos es de 0.999 (figura 28), indicando que existe una relación lineal entre la respuesta analítica y la concentración.

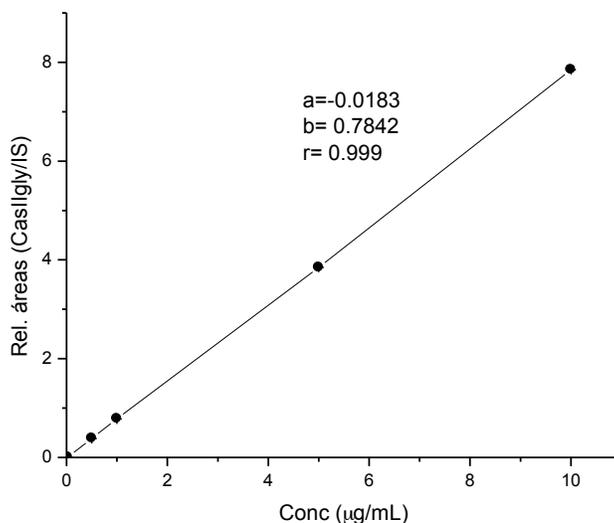


Figura 28. Curva de calibración para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre (método 2).

6.3.3.2.4 Límite de cuantificación (LQ)

El límite de cuantificación se estableció como la menor concentración de la curva de calibración, la cual debía cumplir con una precisión y exactitud aceptable. Los datos del cuadro 47 revelan un % de CV entre los puntos del 12% y un porcentaje de desviación estándar absoluta del 15.9 %. Según la guía internacional de validación publicada por la FDA, el límite de cuantificación no debe exceder más del 20 % en la precisión y exactitud. De acuerdo a los resultados presentados, el LQ es considerado válido.

Cuadro 47. Datos promedio del valor mas bajo de la curva de calibración para la obtención del límite de cuantificación.

	A	B	D	E	F	%CV	%DEA
Rel. de áreas	0.004	0.005	0.004	0.004	0.005	12.45	
Conc. Exp (µg/mL)	0.028	0.030	0.028	0.028	0.030		15.98

6.3.3.2.5 Recobro

El recobro es uno de los parámetros fundamentales en la validación del método y representa la capacidad del dicho procedimiento para poder extraer el analito de interés a partir de la muestra biológica. En el caso de este método, como se puede apreciar en el cuadro 48, a cada nivel de concentración el porcentaje de recobro fue arriba del 80%, con una desviación estándar entre los puntos del 4% y promedio general de 86%. La guía de validación indica que este parámetro no necesariamente tiene que ser del 100%, pero debe ser consistente, preciso y reproducible. Los datos presentados indican este comportamiento, por lo que se considera que el valor aceptado cumple con las especificaciones de la normatividad.

Cuadro 48. Datos del recobro del método analítico (método 2).

Conc (µg/mL)	Sistema	Método	% Recobro
0.1	0.071	0.086	82.35
3	2.340	2.633	88.86
7	5.440	6.275	86.69
Promedio=			85.97
SD=			3.31
%CV=			3.85

6.3.3.2.6 Precisión del método

La precisión fue evaluada en sus dos vertientes; repetibilidad y reproducibilidad (Precisión intermedia). Los datos obtenidos de estos parámetros se muestran en los cuadros 49 y 50 respectivamente.

Cuadro 49. Precisión del método. Reproducibilidad (método 2).

Conc (µg/mL)	1	2	3	4	5	Promedio	Desviacion	%CV
0.1	0.071	0.072	0.072	0.064	0.076	0.071	0.004	6.02
3	2.352	2.252	2.402	2.373	2.319	2.340	0.058	2.47
7	5.452	5.452	5.402	5.473	5.419	5.440	0.028	0.52

Cuadro 50. Precisión del método. Repetibilidad o precisión intermedia (método 2).

Conc (µg/mL)	1	2	3	Promedio	Desviacion	%CV
0.1	0.071	0.067	0.070	0.069	0.002	3.48
3	2.340	2.455	2.373	2.389	0.059	2.49
7	5.440	5.412	5.533	5.462	0.063	1.16

Según los resultados del ensayo intra-día, el valor máximo de coeficiente de variación encontrado fue el de la concentración de 0.1 µg/mL, con un valor del 6%. Por otra parte, el mayor porcentaje de %CV encontrado en el ensayo de reproducibilidad es del 4%. Los datos confirman una buena precisión del método.

6.3.3.2.7 Exactitud

La exactitud del método fue determinada utilizando como parámetro discriminante el porcentaje de desviación estándar absoluta. Los resultados, mostrados en el cuadro 51, indican que el método analítico posee un máximo valor de 13.9% para la concentración más baja de los puntos control. Los datos demuestran una aceptable precisión, de acuerdo al criterio establecido por la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA.

Cuadro 51. Resultados de la exactitud (método 2).

Conc (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)					Promedio	%DEA
	1	2	3	4	5		
0.1	0.114	0.116	0.115	0.105	0.120	0.114	13.95
3	3.023	2.895	3.087	3.049	2.980	3.007	0.23
7	6.976	6.975	6.912	7.002	6.934	6.960	0.57

6.3.3.2.8. Estabilidad. Ciclos congelación/descongelación

La estabilidad fue obtenida después de analizar la muestras resultado de tres ciclos de congelación (-20 °C)/descongelación (temperatura ambiente). Este tipo de estabilidad se realizó debido al posible reprocesamiento de la muestra, después de estar en el congelador. Los resultados de los puntos control analizados se muestran en el cuadro 52.

Cuadro 52. Datos de estabilidad. Ciclos congelación/descongelación (método 2).

Con (µg/mL)	R1	R2	R3	%Recuperado
0.1	104.48	88.50	101.92	98.30
3	99.18	104.25	90.28	97.90
7	94.81	95.49	100.50	96.93

Los valores de porciento recuperado indican que a los tres niveles de concentraciones seleccionados, la casiopeína IIgly es estable después del proceso de congelación y descongelación, debido a que los porcentajes observados se encuentran en el intervalo de $\pm 15\%$ en comparación con las concentraciones obtenidas de los puntos controles preparados y analizados el día del análisis (100%)

6.3.3.2.9 Estabilidad a corto plazo

La estabilidad a corto plazo se realizó durante 6 horas, tiempo estimado para realizar el procesamiento e inyección de la muestra.

Cuadro 53. Resultados de la estabilidad a corto plazo (método 2).

Con (µg/mL)	R1	R2	R3	%Recuperado
0.1	98.11	98.16	101.58	99.28
3	94.08	95.86	94.23	94.72
7	100.45	94.30	96.10	96.95

Como se observa, el mínimo valor para el porcentaje recuperado es de 94.7%, por lo tanto se puede establecer que la estabildades ensayadas cumplen con los requerimientos indicados por la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA.

Los resultados anteriores indican que el método es válido para la cuantificación de casiopeína IIgly en sangre.

6.3.4 Farmacocinética de la casiopeína IIgly en plasma de perro beagle por HPLC-MS.

Con la finalidad de caracterizar la evolución temporal de las concentraciones de casiopeína IIgly en el organismo, se administró vía femoral una dosis de 0.9 mg/Kg a 2 perros de la raza beagle, siguiendo el procedimiento descrito. Los resultados de esta determinación y el perfil farmacocinético se muestran en el cuadro 54 y figura 23 respectivamente.

Cuadro 54. Concentraciones de casiopeína IIgly obtenidas después de la administración IV de 0.9 mg/Kg de casiopeína IIgly a perros beagle.

Tiempo (min)	Perro		X	DE
	1	2		
15	3.21	2.40	2.81	0.576
30	0.50	0.32	0.41	0.125
45	0.18	0.25	0.21	0.050
60	0.16	-	0.16	-
120	0.13	0.17	0.15	0.028
180	NC	NC	-	-
360	NC	NC	-	-

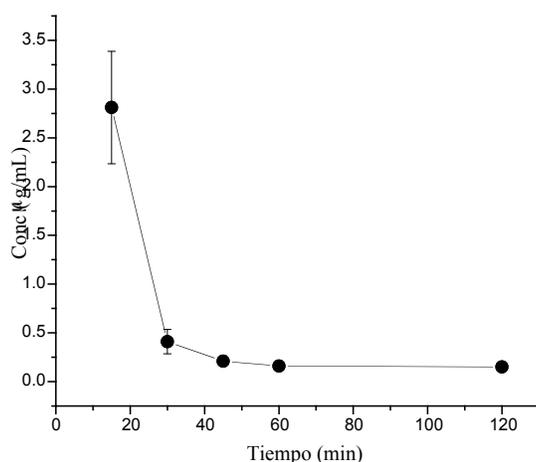


Figura 29. Perfil farmacocinético después de la administración de una dosis de 0.9 mg/kg de casiopeína IIgly a 2 perros de la raza beagle.

La cinética del experimento se monitoreó hasta las 48 horas, sin embargo se obtuvieron valores de concentración plasmática extremadamente bajas, por lo que sólo se pudo cuantificar el analito hasta las 120 minutos. Con los datos obtenidos se realizó de manera individual (para cada perro) el modelado matemático con el objetivo de determinar los parámetros farmacocinéticos, utilizando los algoritmos del modelo abierto de un compartimiento (MAUC) y el modelo abierto de dos compartimientos (MADC). Para ello, se utilizó el cuadro de diagnóstico que el programa arroja después de computar los datos. En el cuadro 55 se resume dichos valores.

Cuadro 55. Datos de diagnóstico de los modelos probados para la farmacocinética en plasma.

Parámetro	MAUC		MADC
	Perro 1	Perro 2	Perro 1
	Valor		Valor
CSS	7.13452	3.4889	7.13452
WCSS	7.13452	3.4889	7.13452
SSR	4.74E-02	6.85E-02	1.74E-04
WSSR	4.74E-02	6.85E-02	1.74E-04
CORR_(OBS,PRED)	0.9987	0.9952	1
WT_CORR_(OBS,PRED)	0.9987	0.9952	1
AIC	-11.24894	-6.72299	-35.29284
SBC	-12.03007	-7.9504	-36.85509

Debido a la alta tasa de eliminación del fármaco y por ende los pocos valores de concentración plasmática en función del tiempo en el caso del perro 2, el modelaje bicompartimental no se pudo llevar a cabo.

Para decidir el tipo de modelo, se comparó los valores de la suma de cuadrados residuales (SSR), la suma de cuadrados ponderado (WSSR), el criterio de Akaike (AIC) y el perteneciente al criterio de los bayesianos de Schwartz. La regla de decisión, de manera general, indica que el modelo al cual mejor se ajustan los datos será aquel que demuestre menores valores en los parámetros de diagnóstico antes mencionados. Al comparar los resultados de diagnóstico estadístico obtenidos para MAUC y el de MADC, se observa que dichos valores son menores para el modelo abierto de dos compartimientos, por lo tanto, este sería el mejor modelo. Es importante aclarar que no se tomó en cuenta el valor predicho-observado (CORR_OBS, PRED) para hacer el contraste entre los modelos compartimentales, ya que no es un buen predictor de la bondad de ajuste entre este tipo de algoritmos. Como se mencionó anteriormente, el programa WinNonLin 5.2 no permitió realizar el ensayo del modelado de los datos farmacocinéticos del perro 2 debido a que eran limitados. Esto llevó a considerar el uso del modelaje no compartimental para determinar valores de depuración y tiempo de vida media que permitiera incluir los datos de los dos perros. Este algoritmo usa criterios estadísticos para obtener los resultados farmacocinéticos y está basado en gran medida en la determinación del área bajo la curva al tiempo infinito (ABC) y λ_z , un estimador que depende de la porción final de



eliminación. Cabe mencionar que el modelado compartimental proporciona gran cantidad de información, es por ello que cuando se caracteriza una molécula, se prefiere este sistema. En contraste, el modelaje no compartimental tiene la habilidad de poder calcular los parámetros fundamentales (e.g. depuración, tiempo de vida media) sin recurrir a un modelo restrictivo, por lo que se utiliza en gran medida en los casos en donde dada la administración de un mismo fármaco, los datos farmacocinéticos provenientes de los sujetos a estudio indican ajustes compartimentales diferentes. Los parámetros farmacocinéticos relevantes en la clínica obtenidos a partir del modelado no compartimental para la casiopeína IIgly se muestran en el cuadro 56.

Cuadro 56. Parámetros Farmacocinéticos de la casiopeína IIgly en perros beagle obtenidos después de la administración de 0.9 mg/kg vía bolus intravenoso.

Parámetro	Perro 1	Perro 2	Unidades
Lambda_z	0.0064	0.0041	1/min
HL_Lambda_z	107.97	169.56	min
AUCall	193.425	222.8115	min* μ g/mL
Vz_obs	637.52	864.67	mL/kg
Cl_obs	4.09	3.53	mL/min/kg
AUCINF_D_pred	243.940	282.681	min*kg* μ g/mL/mg
MRTINF_obs	42.10	52.99	min
Vss_obs	172.30	187.31	mL/kg

Los resultados en su conjunto indican una alta tasa de eliminación del analito a partir del tejido muestreado, dando como resultado un tiempo de vida media corta, con un valor aproximado de 2.3 horas. Este fenómeno se ha observado también en el trabajo farmacocinético publicado en ratas [85]. Los resultados también indican una distribución del compuesto relativamente alta, ya que el volumen de distribución observado es aproximadamente de 9.6 L tomando en consideración 15 Kg de peso del perro y el volumen teórico de agua corporal canino. Por otra parte, el comportamiento cinético de la eliminación de la casiopeína IIgly puede tener varias vertientes, como un alta tasa de metabolismo o una importante adhesión a tejidos, los cuales deberán ser investigados.

6.3.5 Estudio farmacocinético por infusión constante de la casiopeína IIgly en sangre de perro.

Teniendo en cuenta la rápida eliminación de la casiopeína IIgly en plasma, se planeó el estudio farmacocinético en sangre con el objetivo de obtener, bajo un régimen de infusión constante, el valor de concentración plasmática al estado estacionario. Este valor, junto con la velocidad de infusión, permiten obtener de manera directa el valor de la depuración (Cl) y por ende, la constante de eliminación y el volumen de distribución, sin depender del área bajo la curva para determinar estos importantes parámetros. En el estudio se administró 3 y 1.5 mg/kg de casiopeína IIgly a perros beagle (2 perros por dosis), tomando muestras de sangre total a los tiempos 0.33, 0.66, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. El cuadro 57 muestra las concentraciones plasmáticas obtenidas y la figura el perfil farmacocinético del compuesto de coordinación a las dosis ensayadas.

Cuadro 57. Concentraciones (\pm desviación estándar) obtenidas en la farmacocinética de casiopeína IIgly en sangre a dos diferentes dosis.

Tiempo (min)	Dosis (mg/Kg)	
	1.5 (n=2)	3 (n=2)
20	0.224 \pm 0.021	0.343 \pm 0.047
40	0.203 \pm 0.035	0.330 \pm 0.029
60	0.244 \pm 0.004	0.344 \pm 0.073
80	0.190 \pm 0.022	0.240 \pm 0.032
100	0.155 \pm 0.020	0.192 \pm 0.010
120	0.126 \pm -	0.175 \pm 0.026
160	-	0.110 \pm 0.004

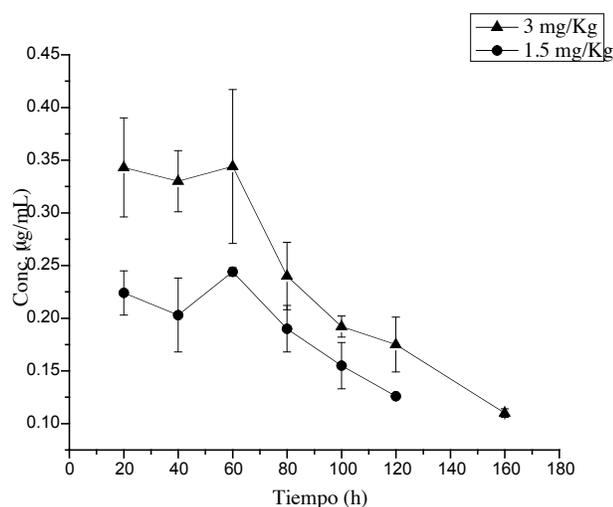


Figura 30. Gráfica de concentración de casiopeína IIgly vs tiempo durante y después de la administración iv por infusión. Se ensayaron 2 dosis: 1.5 y 3 mg/kg.

Con los datos experimentales se realizó el modelado farmacocinético utilizando el modelo abierto de un compartimiento y el modelo no compartimental, ambos por infusión constante, modelo 2 y 202 del programa computacional WinNonlin 5.2, respectivamente. En el modelado compartimental, al realizar el ajuste, se observó que en el periodo de infusión el programa establece un aumento gradual de las concentraciones plasmáticas (figura 31), sin embargo en el proceso experimental, la concentración plasmática al estado estacionario ($C_{p_{ee}}$) se alcanza casi inmediatamente. Este hecho se ve reflejado en la baja correlación observada-predicha del mismo modelo. Estas razones hicieron que se postulara que, para estos datos, el modelado compartimental no era la mejor opción. En contraste, el



modelado no compartimental depende principalmente del área bajo la curva de cero a infinito y el valor de λ_z , que depende sólo de la fase de eliminación, por lo tanto se escogió como el mejor modelo.

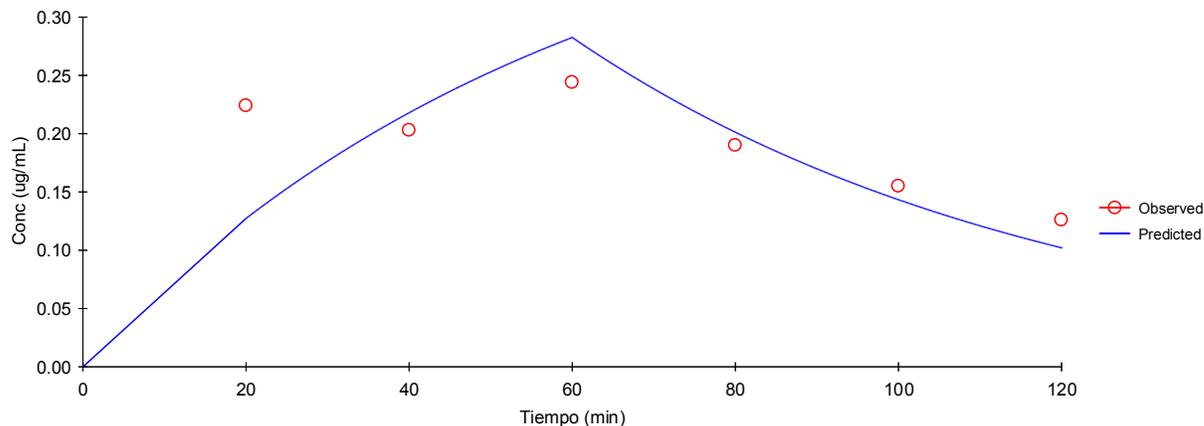


Figura 31. Gráfica de tiempo contra concentración plasmática obtenida después de realizar el modelado computacional compartimental. Note que el programa establece un aumento gradual de las concentraciones plasmáticas y en los datos experimentales muestran un estado estacionario al inicio de la infusión.

Cuadro 58. Parámetros farmacocinéticos obtenidos en el modelado no compartimental.

Parámetro	Dosis	
	1.5 mg/Kg	3 mg/kg
	X ± S.D.	X ± S.D.
Cl (mL/hKg)	1460.25 ± 1.709	3090.545 ± 669.665
z (h-1)	0.283 ± 0.050	0.375 ± 0.093
t1/2 (h)	2.446 ± 0.040	1.905 ± 0.474
V (ml/Kg)	5153.250 ± 89.329	8267.17 ± 268.614
AUC(µg h/mL)	0.345 ± 0.04	0.512 ± 0.09

Como se puede apreciar en el cuadro 58, el valor del tiempo de vida media a ambas dosis es pequeño, con un valor promedio de 2.15 horas, lo que indica una alta tasa de desaparición del compuesto de coordinación a partir del tejido muestreado. Esta última aseveración se confirma por los valores relativamente altos de depuración. El volumen de distribución, el cual en el cuadro se encuentra normalizado para efectos del modelado no compartimental, indica un valor mayor en comparación al volumen corporal total canino (60 por ciento del peso del perro) en ambas dosis, lo que significa una relevante distribución de la casiopeína IIgly en el organismo.

Con la finalidad de encontrar posibles metabolitos de la casiopeína IIgly in vivo, se aplicó la metodología cualitativa desarrollada para este fin. En todas las muestras tomadas, se buscaron, a través de los 3 diferentes gradientes de elución cromatográfica y rampas de



carga/masa, picos que no correspondieran a las señales del blanco sanguíneo. Los cromatogramas no mostraron la presencia de compuestos resultado del metabolismo, por lo que existe la probabilidad de que el complejo de cobre bajo estudio deje el compartimiento vascular y se adhiera a algún tejido. Esta inferencia concuerda con los encontrados por Rendón *et al.*, en donde a través de la cuantificación de cobre se pudo observar altas concentraciones en diversos tejidos del modelo animal, bajo el paradigma que la cantidad de cobre, después del ajuste por el blanco, era proporcional a la cantidad del compuesto de coordinación en el organismo [90].

6.3.6. Biodistribución (relación sangre total/plasma) de la casiopeína IIgly

Los resultados farmacocinéticos anteriores muestran una concentración plasmática baja al administrar la casiopeína IIgly en dosis relativamente altas. Este fenómeno puede ser producido por varios factores como los son una alta depuración, extenso metabolismo o una biodistribución del fármaco en tejidos diferentes al plasmático. Con la finalidad de verificar esta última posibilidad y así conocer la cantidad del analito contenida en la sangre total y el plasma, se realizó un estudio de biodistribución.

La relación sangre total /plasma (kb/p) es un estudio que consiste, de manera general, en determinar la cantidad de analito presente en la sangre total y el plasma a uno o varios tiempos determinados. Dependiendo de los fenómenos de convección y difusión, algunos fármacos tiene mayor afinidad por la sangre total en comparación al plasma, el cual es el fluido biológico de primera elección de muestreo debido a su menor complejidad para el análisis. Este coeficiente la relación sangre total/plasma ayuda a determinar diferentes aspectos relevantes del fármaco como son la elección racional del fluido biológico para el muestreo, la predicción *in vitro* de la distribución *in vivo*, conocimiento fisiológico del analito correlacionándolo con los parámetros farmacocinéticos y el conocimiento de la posibilidad de interacción del fármaco con el paquete globular eritrocitario [91]. Por otra parte, a través del valor del hematocrito, se puede conocer el coeficiente de partición células rojas y plasma, dando indicio de la interacción del analito con las células sanguíneas antes mencionadas. Los resultados del estudio de relación sangre total/plasma de la casiopeína IIgly a dos niveles de concentración se muestran la cuadro 59.

Cuadro 59. Resultados del estudio de biodistribución sangre total/plasma de la casiopeína IIgly en 3 sistemas biológicos.

	0.3 µg/mL			1 µg/mL	
	Hc (%)	Kb/p	Ke/p	Kb/p	Ke/p
media (intervalo)					
Rata	37	0.98 (0.93-1.01)	0.95 (0.82-1.03)	1.23 (1.17-1.28)	1.61 (1.46-1.77)
Perro	42	1.29 (1.10-1.49)	1.93 (1.35-2.57)	1.57 (1.32-2.00)	2.85 (2.02-4.23)
Humano	47	2.15 (1.84-2.27)	3.54 (2.79-4.08)	2.47 (2.14-2.75)	4.14 (3.43-4.74)

Los resultados indican, con base en el promedio y el intervalo reportado, que la casiopeína IIgly se encuentra en una proporción importante en sangre total que en plasma ($Kb/p > 2$) para las especies de perro y humana. Se puede observar que el caso de la rata, los valores de Kb/p son cercanos a un valor de 1, por lo que también existe unión, aunque en menor medida que en las otras especies, de la casiopeína IIgly a los componentes de la sangre. Este hallazgo permite establecer que el mejor fluido para realizar el análisis de la casiopeína IIgly es la sangre total, debido a que el analito de interés permanece con relativa mayor afinidad en este tejido que en plasma. Por otra parte, los valores de Ke/p indican que la casiopeína IIgly tiene una gran interacción con el paquete globular eritrocitario principalmente en la especie de perro y en la sangre del ser humano. Esta importante interacción coadyuvan a entender el mecanismo de hematoxicidad reportada por De Vizcaya Ruiz *et al.*, en donde se observó la aparición de leucocitosis neutrofílica y anemia hemolítica [84].

6.3.7. Farmacocinética de la casiopeína IIgly en sangre de perro beagle después de una administración intravenosa

El perfil farmacocinético de la casiopeína IIgly se muestra en la figura 32.

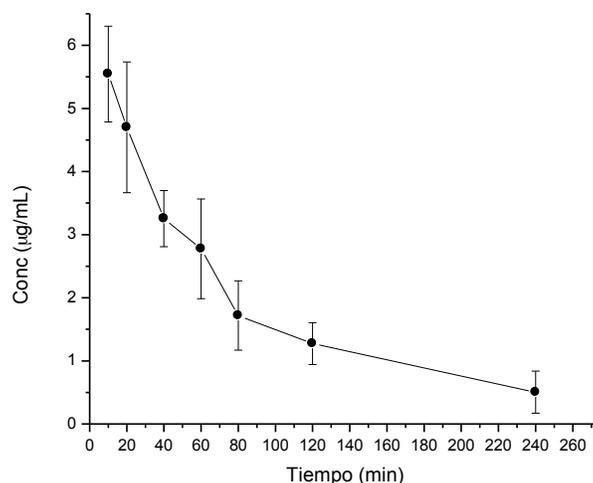


Figura 32. Perfil Farmacocinético de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa simple de casiopeína IIgly.

Los datos farmacocinéticos fueron ingresados al programa computacional WinNonlin versión 5.2 para encontrar el mejor modelo matemático que describiera el decaimiento de las concentraciones plasmáticas con respecto al tiempo. Los resultados fueron modelados con los algoritmos compartimentales y no compartimentales, tomando en cuenta la administración intravenosa simple.

Generalmente, en el sistema no compartimental se toman los últimos tres puntos para el cálculo de lambda zeta (λ_z), uno de los valores principales del cual depende el cálculo de las demás variables farmacocinéticas. Con base en el tipo de administración y los resultados experimentales, se postuló obtener el valor de λ_z a partir de todos los puntos observados, debido a que el decaimiento de las concentración plasmáticas se ajustaban a un modelo exponencial (e^{-x}). De esta forma la variación inherente entre los datos experimentales de la fase de eliminación se tomó en cuenta y permitió obtener valores de predicción más próximos al comportamiento experimental. Por otra parte, se llevo a cabo el modelado compartimental. Los resultados se muestran en los cuadros 60 y 61.

Cuadro 60. Datos farmacocinéticos de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa de 2 mg/kg utilizando el modelado compartimental.

Parámetro	Unidades	Valor
K10_HL	min	47.13
CL	mL/min/kg	3.73
AUC	min* μ g/mL	535.95
AUMC	min*min* μ g/mL	36438.13
MRT	min	67.99
Vss	mL/Kg	253.7

Cuadro 61. Datos farmacocinéticos de la casiopeína IIgly después de la administración intravenosa de 2 mg/kg utilizando el modelado no compartimental.

Parámetro	Unidades	Valor
No_points_lambda_z		7
Lambda_z	1/min	0.01
HL_Lambda_z	min	67.31
C0	ug/mL	6.54
AUCall	min*ug/mL	462.61
AUCINF_obs	min*ug/mL	511.57
Vz_obs	mL/kg	379.62
Cl_obs	mL/min/kg	3.91
Vz_pred	mL/kg	384.91
Cl_pred	mL/min/kg	3.96
AUMCINF_obs	min*min*ug/mL	47994.64
AUMCINF_pred	min*min*ug/mL	45622.10
MRTINF_obs	min	93.82
MRTINF_pred	min	90.42
Vss_obs	mL/kg	366.78
Vss_pred	mL/kg	358.44

Como se puede apreciar, en ambos modelos los valores farmacocinéticos son muy semejantes, en concreto el tiempo de vida media y la depuración, valores fundamentales que ayudarán a proponer un régimen inicial de dosificación en la etapa clínica, en el caso de que este complejo de coordinación complete los estudios requeridos. Aunque los dos modelos demuestran resultados aproximados entre ellos, se escogió como mejor modelo el compartimental, debido a que este último es menos dependiente del valor del área bajo la curva para obtener las variables farmacocinéticas; como se ha observado, la casiopeína IIgly presenta una alta tasa de eliminación de tal forma que es difícil caracterizar con los puntos experimentales un alto porcentaje del área bajo la curva con respecto a la dosis administrada.

El experimento revela un tiempo de vida media corta y un valor de aclaramiento que sugiere una lenta remoción por vía hepática, debido a que el valor es alrededor del 10% del flujo hepático reportado en perros (30 mL/min/kg) [92]. Los valores encontrados son semejantes a los de la farmacocinética realizada a través de un proceso de infusión (apartado 6.3.5) y a los publicados por Velasco *et al.* [85] en donde el modelo animal utilizado fue la rata. Cabe mencionar que las muestras en este caso fueron procesadas por el método 2 para el análisis de casiopeína IIgly en sangre y como se observar en la figura 32, este permitió caracterizar de mejor manera la fase de eliminación del fármaco, debido a un menor límite de cuantificación y un mayor recobro del método analítico.

Por otra parte, durante la experimentación, se reporta que se observaron diversas manifestaciones clínicas después de la administración de casiopeína IIgly a los perros. En el cuadro 62 se indican algunas de dichos signos en la dosis trabajada.

Cuadro 62. Manifestaciones clínicas de la casiopeína IIgly luego de la administración.

Manifestaciones clínicas
Mucosa oral pálida
Problemas respiratorios
Taquicardia
Hipersecreción salival
Émesis (vómito)
Letargia

6.3.8. Estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre de 3 especies diferentes.

Los perfiles farmacocinéticas de la casiopeína IIgly demuestran una rápida disminución de la concentración plasmática a través de un corto tiempo. Con la finalidad de determinar si este comportamiento es debido al metabolismo sanguíneo, se determinó la estabilidad de este compuesto de coordinación por un espacio de 6 horas. El tiempo fue seleccionado con base en la eliminación observada del analito *in vivo*.

En las figuras 33a y 33b se muestran los resultados del experimento, reportando la estabilidad como el % recuperado.

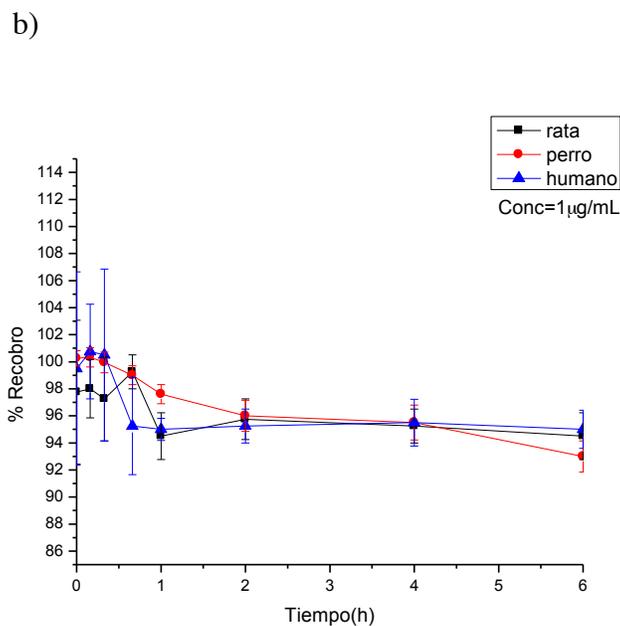
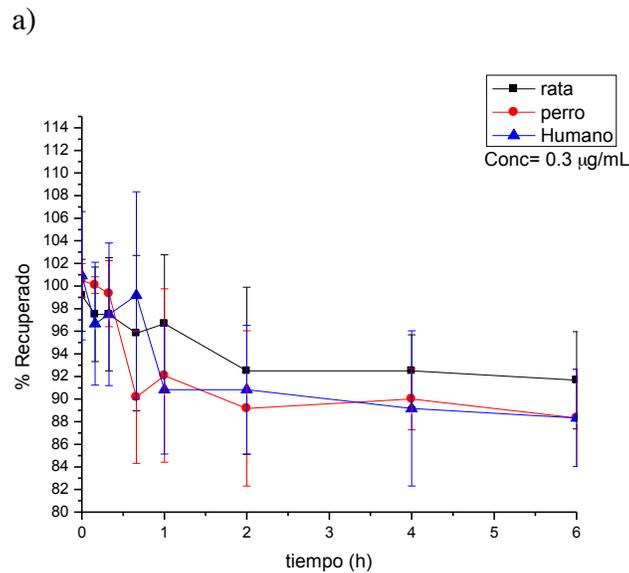


Figura 33. Gráficas de estabilidad de la casiopeína IIgly en sangre de tres especies diferentes (rata, perro y humano) a las concentraciones de a) 0.3 µg/mL y b) 1 µg/mL.

Los valores de la estabilidad para la sangre de las tres especies estudiadas a la concentración de 0.3 µg/mL se encuentran en el intervalo de 88.33-100.9 % y para la concentración de 1 µg/mL de 93-100.33%. Los resultados indican que la casiopeína IIgly es



estable en sangre humana, perro y rata por lo menos 6 horas a 37 °C , de acuerdo al criterio de aceptación analítico indicada en la guía de la FDA. Por otra parte, los resultados denotan que la estabilidad en sangre de la casiopeína IIgly no es un factor que pueda explicar la alta tasa de eliminación observada en los estudios farmacocinéticos.

6.3.9 Unión a proteínas plasmáticas de la casiopeína IIgly.

La unión a proteínas es uno de los estudios fundamentales que se deben realizar en el ámbito preclínico. El conocimiento de este parámetro es decisivo para determinar en etapas posteriores del desarrollo del candidato a fármaco la dosificación del compuesto, las posibles interacciones medicamentosas y posee un efecto importante sobre las variables farmacocinéticas y farmacodinamias. El estudio realizado en el presente trabajo de investigación se realizó en plasma de rata, perro y humano, a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados se muestran en el cuadro 63.

Cuadro 63. Valores de porcentaje de unión a proteínas plasmáticas en tres especies diferentes.

		Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	
		1	5
Rata	Intervalo	89-94	91-97
	Promedio \pm DE	92 \pm 1.9	93 \pm 2.3
Perro	Range	89-97	93-97
	Promedio \pm DE	92 \pm 3.5	95 \pm 1.7
Humano	Range	93-99	97-100
	Promedio \pm DE	96 \pm 2.8	98 \pm 1.2
Retención del Filtro			
	Range	3-11	
	Promedio \pm DE	6.4 \pm 3.5	

El resultado de la retención del complejo de coordinación en la membrana del tubo Amicon es aproximadamente 6%, lo que indica un bajo grado de unión, validando el uso del tubo en cuestión para este ensayo. Como se puede observar en el cuadro 63, los valores de unión a proteínas plasmáticas de las especies estudiadas en las dos concentraciones ensayadas son mayores al 90%, lo que indica un alto grado de unión a proteínas plasmáticas. Este valor deberá ser tomado en cuenta para evitar problemas asociados a la toxicidad por interacción medicamentosa al administrar en conjunto fármacos o compuesto que posean también un alto grado de unión con la finalidad de evitar emergencias por toxicidad.

7. CONCLUSIONES

Se desarrollaron y validaron tres métodos bioanalíticos basados en la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas para la cuantificación de casiopeína IIgly en plasma y sangre de perro beagle. Los parámetros de validación como linealidad, exactitud, precisión, recobro y estabilidad se encuentran dentro de los estándares recomendados por la guía de validación de la FDA. Estos dos métodos fueron utilizados en estudios biofarmacéuticos preclínicos.

Los resultados farmacocinéticos indicaron una rápida tasa de eliminación del complejo de coordinación a partir de los fluidos muestreados. Por otra parte, los estudios de biodistribución demostraron que existe una mayor acumulación de la casiopeína IIgly en sangre total que en plasma. El analito bajo investigación posee una alta unión a proteína plasmáticas (UP>90%) y es estable en sangre a 37 °C por lo menos 6 horas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Grunberg, E., Schnitzer, R. J. (1952). The Effect of Hydrazine Derivates of Isonicotinic Acid on the Infection of Mice with *M. Tuberculosis* Va. Bovis. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 24(5), 359-365.
2. Rolinson, G. N., Geedes, A. M. (2007). 50th Anniversary of the discovery of 6-aminopenicillinic acid. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, 3-8.
3. Rosenberg, B., Van Camp, L., Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205, 698-699.
4. Matthews, J. S., McCoy, C. (2003). Thalidomide: A Review of Approved and Investigational Uses. *Clinical Therapeutics*, 25, 342-395.
5. Shargel, L., Wy-Pong, S., Yu, A. B. C. (2005). *Applied Biopharmaceutic & Pharmacokinetics*, fifth (pp. 1-3).
6. Csajka C., Verotta D. (2006). Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling: history and perspectives. *Journal of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic*, 33 (3), 227-279.
7. Estes, K. S., Derendorf, H. (2010). Comparison of the Pharmacokinetic Properties of Vancomycin, Linezolid, Tigecyclin and Daptomycin. *European Journal of Medical Research*, 15, 533-543.
8. Sharma, v., McNeill J. H. (2009). To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British Journal of Pharmacology*, 157, 97-921.
9. Edershaw, P. J., Beresford, A. P., Bayliss, M. K. (2000). ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug discovery & Therapeutics*, 5(9), 409-414.
10. Panchagnula, R., Thomas, N. S. (2000). Biopharmaceutics and Pharmacokinetics in drug research. *International Journal of Pharmaceutics*, 201, 131-150.
11. Bugrim, A., Nikolskaya, T., Nokolsky, Y. (2004). Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling. *Drug Discovery and Therapeutics*, 3, 127-135.
12. Lin, J. H., Lu, A. Y. H. (1997). Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharmacological Reviews*, 49, 403-449.
13. Van de Waterbeemd, H.(2003). ADMET in silico modeling: Towards Prediction Paradise?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 192-204
14. Harvey, A. L (1998). *Sense, Nonsense and Antisense: Different Approaches to drug Discovery*. En A. Harvey (ed.) *Advances in Drug Discovery Techniques* (pp.1-12). New York: John Wiley & Sons.

15. M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals. Guidance for Industry (1997). *U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.*
16. Pharmacokinetics and metabolic studies in safety evaluation of new medical products in animals. Guideline (1994). *The European Medicines Agency (EMA).*
17. About Drug discovery and Development. Pharmaceutical Products Development Inc. web page. Consultada el 1 de julio de 2013 <http://http://www.ppd.com/About/About-Drug-Discovery-and-Development.aspx#cat0>
18. Bogaards, J. J. P., Bertand, M., Jackson, P., Oudshoorn, M. J., Weaver, R. J., van Blanderen, P. J., Walther, B. (2000). Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica*, 30 (12), 1131-1152.
19. Lin, J. H. (1995). Species Similarities and Differences in Pharmacokinetics. *Drug Metabolism and Disposition*, 23(10), 1008-1021.
20. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for industry (2005). *U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research.*
21. Garattini, S. (2007). Pharmacokinetics in cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 43, 271-282.
22. Gersell, L. J., Atkins, J. H. (2003). A brief history of novel drug discovery technologies. *Nature Review*, 2, 321-327.
23. Acevedo, A. V., Toppmeyer, D. L., Rubin, E. H. (2004). *Phase I. Trial Design and Methodology for Anticancer Drugs*. En B. A. Teicher y P. A. Andrews (Eds.), *Anticancer Drug Development Guide* (pp. 351-361). New Jersey: Humana Press.
24. Flaherty, K. T., O'Dwyer, P. J. (2004). *Phase II*. En B. A. Teicher y P. A. Andrews (Eds.), *Anticancer Drug Development Guide* (pp. 363-379). New Jersey: Humana Press.
25. Idoate, A., Idoipe, A. (2002). Investigación y ensayos clínicos. En *Farmacia Hospitalaria*, 3ra ed., 325-367. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
26. Twelves, C., Bibby, M., Lacombe, D., Burtless, S. (2004). *Drug Development in Europe: The Academic Perspective*. En B. A. Teicher y P. A. Andrews (Eds.), *Anticancer Drug Development Guide* (pp. 381-400). New Jersey: Humana Press.
27. Parada, J. (2003). Informe General de la Ciencia y la Tecnología". Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), pp. 90. México: CONACyT.
28. Hacia una política farmacéutica para México. Comisión Federal para riesgo Sanitario, Secretaría de Salud (pp 127- 137). México: Secretaría de Salud.
29. Shah, P. V., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, J I., Skelly, P. J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, E. C., Mcdowall, R. D., Pitmann, A. K., Spector, S. (1992). Analytical Method Validation: Bioavailability, Bioequivalence a Pharmacokinetics Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 309-312.
30. Chamberlain, J. (1995). *Drugs in Biological Fluids*, 2da ed., 35-43. New York: CRC Press.
31. Papadoyannis, I., Samanidou, V. F. (2004). *Sample Preparation Prior to HPLC*. En *Encyclopedia of Chromatography* (pp. 250-266). New York: Marcel Dekker.

32. Korfmacher, W. A. (2005). Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discovery and Therapeutics*, 20, 1357-1367.
33. Deng, G., Sanyal, G. (2006). Applications of mass spectrometry in early stages of target based drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 528-538.
34. Hughes, N. C., Wong, E. Y. K., Fan, J., Bajaj, N. (2007). Determination of Carryover and Contamination for Mass Spectrometry-Based Chromatographic Assay. *The American Association of Pharmaceutical Scientist Journal*, 9(3), E353-E360.
35. Hartmann, C., Sweyers-Verbeke, J., Massart, D. L., McDowall, R. D. (1998). Validation of Bioanalytical Chromatographic Methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 193-218.
36. Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J. J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C.E., McDowall, R.C., Pitmann, K. E., Spector, S. Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies (1992). *Journal of Pharmaceutical Scientist*, 81 (3), 309-312.
37. Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J. J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C.E., McDowall, R.C., Pitmann, K. E., Spector, S. Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies (1992). *International Journal of Pharmaceutics*, 82 (1-2), 1-7.
38. Shah, V. P., Midha, K. K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, J. J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C.E., McDowall, R.C., Pitmann, K. E., Spector, S. Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report (1991). *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetic*, 16(4), 249-255.
39. Text on Validation Of Analytical Procedures Q2A. International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH) (1994).
40. Text on Validation Of Analytical Procedures Q2B. International Conference on Harmonisation of Technical requirements for registration of Pharmaceuticals For Human Use (ICH) (1996).
41. Shah, V. P. (2007). The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Method Validation. *The American Association of Pharmaceutical Scientist Journal*, 9(1), E43-E47.
42. Thompson, M., Ellison, S. L. R., Wood, R (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
43. Validation of compendial Methods. Chapter 1225 (2007). United States Pharmacopoeia 30, National Formulary 25. *The United States Pharmacopoeial Convention*.
44. Single Laboratory Validation Guidelines (Dietary Supplements) (2002). *Association of Official Analytical Chemist*.
45. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998). *Eurachem*.

46. Guideline on Validation of Bioanalytical Methods (2010). *European Medicines Agency (EMA)*.
47. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry (2001) *Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research*.
48. Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38, 328-334.
49. Antignac, J., Wasch, K., Monteau, F., Brabander, H., Andre, F., Bizec, B. (2005). The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytical Chimica Acta*, 529, 129-136.
50. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., Chavez-Eng, M. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019-3030.
51. Sonnergaard, J. M. (2006). On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *International journal of Pharmaceutics*, 321, 12-17.
52. Causon, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis Viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B*, 689, 175-180.
53. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (8), 535-552.
54. Cancer: Key facts (2009). World Health Organization web page. 1 de julio de 2013, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
55. Estadísticas con respecto al día mundial del Cáncer. Reporte del 4 de febrero de 2013. INEGI. Consultada el primero de julio de 2013 en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/aPropositom.asp?s=inegi&c=2859&ep=113>
56. Cancer Treatments. Cancer Research UK web page. Consultada el día 1 de julio de 2103 en: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/>
57. Lainé A.L., Passirani. C. (2012). Novel metal-based anticancer drugs: a new challenge in drug delivery. *Current Opinion in Pharmacology*, 12, 1-7.
58. Clarke, M. J., Zhu, F., Frasca, D. R. (1999). Non-Platinum Chemotherapeutics Metallopharmaceuticals. *Chemical Reviews*, 99, 2511-2533.
59. Zhao, G., Lin, H. (2005). Metal Complexes with Aromatic N-Containing Ligands as Potential Agents in Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 5, 137-147.
60. Narla, R. K., Chen, C., Dong, Y., Uckun, F. M. (2001). *In Vivo* Antitumor Activity of Bis (4, 7dimethyl-1, 10-phenanthroline) Sulfatooxovanadium {METVAN [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂]}. *Clinical Cancer Research*, 7, 2124-2133.
61. Ruiz, L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylalephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. U. S. Patenent application serial No. 07/628,843, Ap 21 (1992) Number 5, 107,005. U. S. Patent Re35, 458, Feb. 18 (1997).
62. Ruiz, L. Process to obtain new mixed copper aminoacidate from methylete phenanthrolune complexes to be used as anticancerigenic agents. U. S. Patent application serial No. 07/628,628, (1992), Pat no. 5,576,326. Nov 19 (1996).

63. Ruiz, A. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo I. Patente de invención en trámite, SECOFI 18801. P. I. (1990). Patente, Enero 26, (1994) no. 172967.
64. Ruiz, Azuara. Procedimiento para la obtención de complejos metálicos como agentes anticancerígenos. Tipo II. Patente de invención en trámite SECOFI 18802. P. I. (1990). Patente, Diciembre 9, (1993) n. 172248.
65. Título de Marca: **Casiopeína**. Reg 407543 SECOFI (1992).
66. Bravo, M. E., Tovar, A., Ruiz, M., Ruiz, L., Moreno, R. (2002). *Diseño, Síntesis y Caracterización de Compuestos de Coordinación de Cobre CASIOPEÍNAS®*. En Primer Congreso de Casiopeínas, 5ta Jornada de Trabajos en Casiopeínas, pp. 1-9. México.
67. Gasque, L., Moreno-esparza, R., Ruíz-Ramírez, L. (1992). Stability of ternary Copper and Nickel Complexes With 1,10-Phenanthroline. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 48, 121-127.
68. Gasque, L., Medina, G., Ruiz-Ramírez, L., Moreno-Esparza, R. (1999). Cu-O stretching frequency correlation with phenanthroline pKa values in mixed copper complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 288, 106-111.
69. Bravo-Gómez, M. E., García-Ramos, J. C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L. (2009). Antiproliferative activity and QSAR study of copper (II) mixed chelate [Cu(N-N)(Acetylacetonato)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinato)]NO₃ complexes, (Casiopeínas®). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 299-309.
70. Romero, L.C., Márquez, A., Gracia, I., Müller, G., Ruiz, L. (1998). *Estabilidad de las Casiopeínas II y III en Soluciones Fisiológicamente Compatibles*. En tercera Jornada de trabajo en Casiopeínas (pp 4-7). México.
71. Vizcaya, A., Rivero-Muller, A., Ruiz-Ramírez, L., Kass, G. E. N., Kelland, L. R., Orr, R.M., Dobrota, M. (2000). Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeina II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells. *Toxicology in Vitro*, 14, 1-5.
72. Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L., Gómez-Ruiz, C., Tinoco-Méndez, M., Márquez, A., Romero-De Lira, L., Martínez-Hernández, I., Macías-Rosales, L., Bravo-Gómez, M. E. (2001). Knight's Move in the Periodic Table, From Copper to Platinum, Novel Antitumor Mixed Chelate Copper Compounds, Casiopeínas, Evaluated by *in vitro* Human and Murine Cancer Cell Line Panel *Metal Based Drugs*, 8(1), 19-21.
73. Mejía, M. C., Ruiz, L. (2004). *Efecto in vitro de las Casiopeínas IIgly y IIIia en el Meduloblastoma Humano*. En Primer Congreso de Casiopeínas, 5ta Jornada de Trabajos en Casiopeínas, pp. 122-125. México.
74. Chiapa, Z. (2007). *Evaluación in Vitro de la Sinergia de 2 Casiopeínas (IIIia y IIgly) y otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas*. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México: UNAM.
75. Carvallo, F. R. (2007). *Efectos Antiproliferativos y Apoptóticos de las Casiopeínas® IIgly y IIIia en Líneas Tumorales Humanas*. Tesis Doctoral. Programa de Doctorado en Ciencia de la Producción y Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. México.

76. Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Sánchez, L., Gracia-Mora, I., Marquez-Rosado, L., Sánchez, A., Moreno-García, M. E., Cruz, A., Bravo-Gómez, M. E., Ruiz-Ramírez, L., Rodríguez-Enriquez, S., Sotelo, J. (2005). Cas Igly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells *In Vitro* and *In Vivo* Through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanism. *Neoplasia*, 7(6), 563-574.
77. Rodríguez-Enriquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Marín-Hernández, A., Ruiz-Azuara, L., Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 215, 208-217.
78. Rivero-Müller, A., De Vizcaya, A., Plant, N., Ruiz, L., Dobrota, M. (2007). Mixed chelate copper complex, Casiopeina Igly®, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 165, 189-199.
79. Alemón-Medina, R., Muñoz-Sánchez, J. L., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I. (2008). Casiopeína Igly induced cytotoxicity to HeLa Cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology in Vitro*, 22, 710-715.
80. Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., Day, B. J. (2010). Casiopeína Igly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268, 176-183.
81. Macía, R., Rivera, M. (2007). *Toxicidad Aguda en rata y ratón de las Casiopeínas® Iiia y Igly*. VI Congreso Nacional AMCAL, Colima, México.
82. Leal, M. (2006). *Caracterización y tratamiento de los efectos tóxicos pulmonares de las Casiopeínas III-ia y Igly*. Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. México.
83. Hernández-Esquivel, L., Marín-Hernández, A., Pavón, N., Carvajal, K., Moreno-Sánchez, R. (2006). Cardiotoxicity of copper-based antineoplastic drugs casiopeinas is related to inhibition of energy metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 212, 79-88.
84. De Vizcaya-ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramírez, L., Howarth, J. A., Dobrota, M. (2003). Hematotoxicity response in rats by the novel copper based anticancer agent: Casiopeína II. *Toxicology*, 194, 103-113.
85. Reyes, L., Fuentes-Noriega, I., Ruiz-Ramírez, L., Macía, L. (2003). Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeina Igly® in rat plasma. *Journal of Chromatography B*, 791, 111-116.
86. García, M. O. (2008). *Desarrollo y Validación del Método Analítico por CLAR para la Cuantificación del Grado de Unión a Proteínas Plasmáticas de la Casiopeína Igly, un Nuevo Anticancerígeno*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM. México.
87. Rendón, E. E., Tenorio, E. (1998). *Estudio de la Distribución de Casiopeínas II y III en Órganos de Ratón (NIH) por la Determinación de Cobre*. Tesis de Licenciatura Mancomunada, Facultad de Química, UNAM. México.
88. Cancer Drug Information Summaries. National Cancer Institute (U.S. National Institute of Health). Obtenida el 1 de julio de 2013 en <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/alphalist>



89. Gatlin, L. C., Turecek, F. *Electrospray Ionization of Inorganic and Organometallic Complexes* (1997) en R. Cole (editor), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Fundamentals, Instrumentation & Applications* (527-570). New York: Jhon Wiley & Sons, Inc.
90. Rendón, E. E., Tenorio, E. (1998). *Estudio de la Distribución de Casiopeínas II y III en Órganos de Ratón (NIH) por la Determinación de Cobre*. Tesis de Licenciatura Mancomunada, Facultad de Química, UNAM. México.
91. Hinderling, P. H. (1997). Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Pharmacological Reviews*, 49, 279-295.
92. Davies, B., Morris, T. (1993). Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans. *Pharmaceutical Research*, 10 (7), 1093-1095.

9. APÉNDICE

Artículos de divulgación científica derivados de esta investigación