



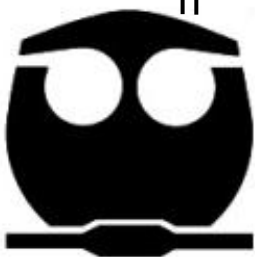
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE BIODISTRIBUCION
SANGRE/PLASMA HUMANA (Kb/p) DE
Casiopeína III-ia: UN NUEVO FARMACO CON
ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
JULIO CESAR VILLANUEVA DÍAZ



México D. F. 2016



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Inés Fuentes Noriega

VOCAL: Ricardo Rodríguez Sáenz

SECRETARIO: María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

1er. Suplente: Blanca Estela Rivero Cruz

2do. Suplente: Kenneth Rubio Carrasco

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorios 112 y 113. Edificio E,
Laboratorio 104.USIP. Edificio F2.
Facultad de Química, UNAM
Ciudad Universitaria

Asesor

Supervisor Técnico

Dra. Inés Fuentes Noriega

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante

Julio Cesar Villanueva Díaz



AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, mi hogar **la Universidad Nacional Autónoma de México** y a la Facultad de Química.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por todo el apoyo, la confianza y la oportunidad de crecimiento académico brindado de la mejor manera.

A la Doctora Lena Ruiz Ramírez por aceptarme en su grupo de investigación, al igual que por facilitar recursos para la realización de este estudio

Al **Dr. José Fernando Barragán Aroche** y a todo el equipo en la USIP en especial al laboratorio 104 de cromatografía por facilitarme el uso de sus instalaciones así como de sus equipos.

Al Dr. Roberto Carlos Cañas Alonso por compartir sus conocimientos en el área de cromatografía y espectrometría de masas y brindarme todo su apoyo en la realización de este proyecto.

A la M. en C. Kenneth Rubio Carrasco por todo el apoyo en la revisión y la realización de esta tesis.

A los proyectos CONACYT (CIENCIAS BÁSICAS): 179119; PAPIIT: IT-201714 ; PAIP: 5000-9134 por el apoyo económico para el desarrollo de este proyecto.

A los maestros **María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz** y **Ricardo Rodríguez Sáenz** por su tiempo y sus valiosas aportaciones en la revisión de esta tesis.

Dedicatorias:

A mis padres, por su apoyo incondicional en las noches de desvelos y trabajos de horas interminables, y por siempre creer en mí dándome la confianza para seguir adelante , levantarme de las caídas durante toda mi vida , gracias mamá por darme mucho más de lo que merezco y siempre estar cuando te necesito y gracias papá por toda tu ayuda.

A mis hermanos los cuales siempre me han dado su apoyo mi hermano siempre dándome ánimo y aportando más de lo que debía para que todo saliera y por otra parte mi hermana presionándome siempre para terminar de la mejor manera.

A la familia Villanueva Ortega, en especial al M.V.Z Manuel Villanueva Ríos ya que sin su apoyo nunca hubiese sido posible la realización de este trabajo, muchas gracias por sus consejos invaluable los cuales conservo y procurare conservar toda la vida hay cosas que jamás podré pagarle pero espero que este trabajo sea la muestra de que todo su apoyo no ha sido en vano, gracias tíos!

A toda la familia Villanueva Ríos gracias por apoyarme cuando más los necesité aunque jamás podré pagarles, este trabajo es una pequeña forma de demostrarles que valió la pena su apoyo les estaré eternamente agradecido.

A la familia López Maya, por su apoyo al brindarme su casa siempre que lo necesité son parte de mi familia y muchas gracias Lydi por ser tan genial en todos los aspectos sin tu hubiera sido imposible este trabajo.

A mis grandes amigos los cuales han estado conmigo en las buenas y sobretodo en las malas me siento muy afortunado de poder contar con personas a las que con toda seguridad puedo llamar amigos.

A mi Magos, gracias por consentirme siempre y ver por mí por en todo momento por quererme tanto como yo la adoro usted es mi favorita.

A mi hermosa tía Rosa donde quiera que se encuentre le agradezco el siempre confiar en mi le prometo siempre llevarla recordarla ya que sé que usted nunca me ha dejado solo.

INDICE

a.	Lista de figuras	8
b.	Lista de cuadros	10
c.	Lista de Abreviaturas	12
1	INTRODUCCION	14
2	ANTECEDENTES	15
2.1	Cáncer	15
2.1.1	Tratamientos contra el cáncer.....	16
2.1.1.1	Cirugía.....	16
2.1.1.2	Terapia Biológica	16
2.1.1.3	Radioterapia	16
2.1.1.4	Quimioterapia	17
2.2	Desarrollo de Fármacos nuevos.	18
2.2.1	Fase pre-clínica.....	19
2.2.2	Fase Clínica.	19
2.2.2.1	Fase I.....	19
2.2.2.2	Fase II.....	20
2.2.2.3	Fase III.....	21
2.2.2.4	Fase IV.	22
2.3	Casiopéínas®	23
2.3.1	Casiopéína III-ia®	25
2.3.1.1	Actividad Biológica de la Casiopéína III-ia® y datos farmacocinéticos	26
2.3.1.2	Métodos de cuantificación de Casiopéína III-ia®	27
2.3.1.3	Farmacocinética y LADME	28
2.3.1.4	Farmacodinamia	29
3	CONSTANTE DE PARTICIÓN SANGRE/PLASMA (Kb/p)	29
3.1	Estudios de biodistribución sangre total / plasma.....	31
3.2	Métodos para el cálculo de kb/p	32
4	OBJETIVOS:.....	40

4.1 Objetivo general	40
4.2 Objetivos particulares	40
5.0 METODOLOGÍA.....	41
5.1 Reactivos	41
5.2 Materiales, Equipos e Instrumentos.....	41
5.3 Preparación de Soluciones	43
5.3.1 Solución de HFBA 40 µM acuoso	43
5.3.2 Solución estándar A de Casiopeína III-ia® en agua, 1000 µg/mL	43
5.3.3 Fase móvil: metanol grado cromatográfico, HFBA 40mM en agua (7:3)	44
5.3.4 Solución HFBA 5% acuoso.....	44
5.3.5 Soluciones de trabajo y muestras en matrices biológicas (sangre y plasma).....	44
5.4 Material Biológico	45
5.5 Software	45
5.6 Desarrollo y optimización de la metodología	46
5.6.1 Condiciones instrumentales	46
5.6.1.1 Condiciones optimizadas	46
5.6.2 Determinación del espectro de masas de la Casiopeína III-ia® utilizando infusión directa.	46
5.6.3 Ion de cuantificación 346.07 m/z	48
5.6.4 Ion de Cuantificación 460.00 m/z	48
5.6.4.1 Infusiones de Casiopeína III-ia® con pares iónicos.....	48
5.6.4.2 Pruebas de retención usando el ión de 460 m/z	48
5.6.5 Extracción de la Cas III-ia en sangre humana.....	50
5.6.5.1 Extracción en fase sólida	50
5.6.5.2 Supresión ionica	53
5.6.5.3 Adecuabilidad del sistema	54
5.6.6 Cuantificación de la Casiopeína III-ia en plasma humano.....	54
5.6.6.1 Curvas de calibración en sistema y en plasma.....	54
5.7 Estudio de biodistribución sangre-plasma (kb/p).....	55
5.7.1 Pruebas de lisis de eritrocitos.....	55
5.7.2 Ciclos de congelación descongelación	55

5.7.3 Recobro de la técnica de lisis.....	59
5.7.4 Lisis de eritrocitos con HFBA.....	60
5.7.5 Estudio del coeficiente de partición sangre/plasma	62
5.7.5.1 A.-Preparación de Casiopeína III-ia en plasma (referencia)	64
5.7.5.2 B.- Preparación de las muestras de sangre con Casiopeína III-ia®	64
5.7.5.3 C. plasma para curva de calibración	65
6 RESULTADOS Y ANALISIS	68
6.1 Desarrollo y optimización de la metodología	68
6.1.1 Ensayos en metanol /agua	68
6.1.2 Estudios en presencia de modificadores de fase	70
6.1.3 Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion de cuantificación 460.01 m/z.72	
6.1.4 Condiciones instrumentales óptimas	73
6.2 Extracción de la Cas III-ia en sangre humana.....	75
6.2.1 Extracción en fase sólida	75
6.2.2 Supresión iónica	76
6.2.3 Adecuabilidad del sistema.....	77
6.3 Cuantificación de la Cas III-ia en sangre humana	78
6.3.1 Metodología optimizada de extracción	78
6.4 Ensayo de biodistribución sangre-plasma (kb/p).....	82
6.4.1 Pruebas de lisis de eritrocitos.....	82
6.4.1.1 Ciclos de congelación- descongelación.....	82
6.4.1.2 Recobro de la metodología de lisis	83
6.4.1.3 Lisis de eritrocitos con HFBA.....	84
6.5 Obtención de la constante de partición sangre/plasma (Kb/p) de la Casiopeina III-ia®	86
6.5.1 Curva de calibración	86
7 CONCLUSIONES	95
8 REFERENCIAS.....	96

a. Lista de figuras

- Figura 1. Etapas del desarrollo de un medicamento
- Figura 2. Estructura de la Casiopeína III-ia®
- Figura 3. Esquema de preparación de muestras *Yu. S*
- Figura 4. Esquema de preparación de soluciones según *Hinderling*
- Figura 5. Procedimiento de tratamiento previo a la extracción por fase sólida
- Figura 6. Metodología en sistema de extracción en fase sólida
- Figura 7. Esquema de prueba de supresión iónica
- Figura 8. Esquema de la metodología para lisis por ciclos de congelación-descongelación
- Figura 9. Ecuación para cálculo de recobro
- Figura 10. Esquema de lisis con ácido
- Figura 11. Esquema de preparación de curva de calibración
- Figura 12. Ecuación para el cálculo de la constante de partición sangre/plasma
- Figura 13. Espectro de Casiopeína III-ia® en metanol
- Figura 14. Espectro de masas de la Casiopeína III-ia®
- Figura 15. Espectro de masas de la reacción entre Cas III-ia® en TFA
- Figura 16. Espectro de la reacción entre Casiopeína III-ia® en HFBA
- Figura 17. Cromatograma de evaluación de supresión iónica
- Figura 18. Metodología optimizada de extracción
- Figura 19. Curva en sistema
- Figura 20. Curva en plasma
- Figura 21. Curva en sangre después de ciclos
- Figura 22. Curva de calibración en sangre para cálculo de Kb/p



Figura 23. cromatogramas de las concentraciones 25 y 100 $\eta\text{g/ml}$ de la curva de calibración

Figura 24. Ejemplo de cálculo de la constante de partición sangre/plasma (K_b/p), tomado del dato del donador 1 en la concentración de 50 $\eta\text{g/ml}$ mostrada en el cuadro 25.

Figura 25. cromatograma de muestra 50 $\eta\text{g/ml}$ a tiempo 1

Figura 26. cromatograma de muestra 350 $\eta\text{g/ml}$ a tiempo 1

Figura 27. cromatograma de muestra 600 $\eta\text{g/ml}$ a tiempo 2

b. Lista de cuadros

- Cuadro 1. Fórmula General de sub Familias de Casiopeínas®
- Cuadro 2. Características fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia®
- Cuadro 3a. Preparación de muestras cargadas con analito
- Cuadro 3b. Preparación de muestras cargadas con analito
- Cuadro 4. Optimización de condiciones iniciales
- Cuadro 5. Prueba de fases móviles
- Cuadro 6. Serie de experimentos para establecer los parámetros espectrométricos óptimos de detección
- Cuadro 7. Metodología y acondicionamiento en fase sólida
- Cuadro 8. Experimentos correspondientes a los ciclos congelación-descongelación
- Cuadro 9. Curva e calibración en sangre
- Cuadro 10. Experimentos realizados para lisis con HFBA
- Cuadro 11. Características de donadores de sangre
- Cuadro 12. División de sangre total. Forma en la que se dividió cada lote de sangre
- Cuadro 13. Trabajo en plasma de referencia
- Cuadro 14. Trabajo en plasma cargado con Cas III-ia®
- Cuadro 15. Resultados de optimización de parámetros espectrométricos.
- Cuadro 16. Condiciones cromatográficas óptimas.
- Cuadro 17. Condiciones espectrométricas óptimas.
- Cuadro 18. Adecuabilidad del sistema
- Cuadro 19a. Resultados de precisión y exactitud en curvas de calibración en plasma

Cuadro 19b. Variación de concentraciones entre curvas en plasma

Cuadro 20. Resultados de pruebas de congelación-descongelación de sangre

Cuadro 21. Recobros con o sin método de congelación-descongelación y en sistema

Cuadro 22. Respuestas de la lisis de células con HFBA

Cuadro 23. Cuadro comparativo de respuestas con y sin métodos de ruptura celular

Cuadro 24. Resultados correspondientes a curva de calibración en sangre donde se observa comportamiento lineal

Cuadro 25. Respuestas obtenidas del ensayo a las concentraciones trabajadas (*50 ng/ml, 350 ng/ml, 600 ng/ml*). "PL" representa el plasma de referencia a cada tiempo.

Cuadro 26a. Promedio de áreas obtenidas después del ensayo

Cuadro 26b. Promedio de concentraciones obtenidas después del ensayo

Cuadro 27. Resultados del coeficiente de partición sangre plasma (kb/p) para Cas III-ia a cuatro tiempos

Cuadro 28. Resultados sintetizados del coeficiente de partición sangre plasma (kb/p) para Cas III-ia a cuatro tiempos

c. Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
CasII-gly	Casiopeína II-gly®
CasIII-ia®	Casiopeína III-ia®
CLL	Carcinoma de pulmón de Lewis
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios
CL	Depuración
EMEA	European Medicinal Association
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
h	Horas
H ₂ O	Agua
HFBA	Ácido Heptafluorobutírico
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry
HPLC-UV	High Performance Liquid Chromatography- Ultraviolet
ICH	International Conference Harmonization
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	International Union of Pure Applied Chemistry
Kb/p	Constante de partición sangre/plasma
L	Litro
mg	Miligramo
min	Minuto
mL/ min	Mililitro por minuto
mL/h	Mililitro por hora
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
MΩ	Mega Ohm
µg	Microgramo
µg/ml	Microgramo por mililitro
ng/mL	Nanogramo por mililitro
NOM	Norma Oficial Mexicana
°C	Grados Celcius
OMS	Organización Mundial de la Salud

R	Coeficiente de correlación
r ²	Coeficiente de correlación al cuadrado
SPE	Solid Phase Extraction
SPPS	Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
SSA	Secretaría de Salud
TFA	Ácido Trifluoroacético
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USIP	Unidad de Servicios a la Industria Petrolera
USP	United States Pharmacopeia
µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrometro

1 **INTRODUCCION**

El cáncer es un conjunto de alrededor de 200 enfermedades diferentes caracterizadas por un crecimiento anormal de las células. En el tratamiento de esta enfermedad se utiliza la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Debido a la resistencia que ha desarrollado el cuerpo y a la alta toxicidad de los compuestos antineoplásicos utilizados tradicionalmente surge la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos. Es por ello que a finales de la década de los 70's, la Dra. Lena Ruiz y su equipo desarrollaron una nueva familia de compuestos antineoplásicos, las Casiopeínas®, las cuales podrían tener una mayor selectividad sobre las células afectadas por el cáncer. Las Casiopeínas®, son un grupo de compuestos de coordinación de cobre (II) con centro metálico que han demostrado actividad antitumoral. Una molécula de esta familia ha pasado el panel de estudios preclínicos (Casiopeína III-ia) y ahora se encuentra en investigación clínica. Uno de los estudios necesarios antes de realizar la farmacocinética, es el estudio kb/p (constante de partición sangre/plasma) que es utilizado para conocer en que fluido, ya sea plasma o sangre, se encuentra mayoritariamente el fármaco en cuestión; de esta forma se evita la obtención de parámetros farmacocinéticos inexactos y que pueden influir en el valor de constantes tan importantes en la clínica como la depuración (Cl) o en la postulación de los regímenes de dosificación. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es el de conocer la constante de biodistribución (Kb/p) de la Casiopeína III-ia, utilizando para ello un sistema de cuantificación altamente sensible como es el UHPLC-MS(QTOF) que permitió la obtención de las concentraciones del complejo de coordinación en los fluidos biológicos mencionados.

2 **ANTECEDENTES**

2.1 **Cáncer**

Se le denomina cáncer a un conjunto de padecimientos que comprenden una alteración en el crecimiento normal de las células de cualquier tejido del organismo, produciendo un aumento de volumen, este crecimiento se conoce como Neoplasia. [*National Institute Cancer (NCI), 2014*]

Las neoplasias se dividen en dos grupos: neoplasias benignas y neoplasias malignas. Las neoplasias malignas son sinónimas de cáncer ya que además del crecimiento descontrolado pueden invadir tejidos cercanos a través del torrente sanguíneo o el sistema linfático [SSA, 2013]. Los diversos tipos de cáncer se clasifican según el lugar de aparición.

El cáncer, es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial, en 2012 se reportaron 8.2 millones de defunciones, equivalente al 13% de las defunciones mundiales. Siendo los de mayor incidencia el cáncer de pulmón seguido por el de estómago, hígado, colón y mama [OMS, 2015].

En México respecto a morbilidad en el año 2011 se reportó que del total de egresos hospitalarios por tumores el 55.6% se deben a tumores malignos, en la población joven (menores de 20 años) del total de egresos el 70.6% se debe a un tumor maligno siendo esta cifra mayor a la presentada en la población adulta (53.2%) [Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), 2014].

2.1.1 **Tratamientos contra el cáncer.**

En la actualidad recibir un diagnóstico de cáncer no significa sinónimo de muerte ya que las probabilidades de supervivencia son altas con un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado [SSA, 2014]. Debido a la diversidad de padecimientos que comprenden el cáncer, existen un sin número de tratamientos, estos pueden dividirse en cuatro tipos:

2.1.1.1 **Cirugía**

Consiste en extirpar el tejido maligno (tumor) con la finalidad de curar la enfermedad. Este tipo de tratamiento resulta efectivo para tipos de cáncer que son localizados es decir que no se han [NCI, 2014].

2.1.1.2 **Terapia Biológica**

Estos tratamientos utilizan sustancias que son de origen biológico, que inhiben o estimulan al sistema inmunológico con la finalidad de que este ayude a combatir las células dañadas [NCI, 2014].

2.1.1.3 **Radioterapia**

Uso de radiación de alta energía proveniente de rayos X, rayos gamma, neutrones y protones para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. [NCI, 2014].

2.1.1.4 **Quimioterapia**

Es la administración sistémica de un fármaco o la combinación de ellos, con la finalidad de frenar, disminuir y/o destruir las células cancerígenas [NCI, 2014].

2.2 **Desarrollo de Fármacos nuevos.**

En el siglo XIX los fármacos y medicamentos disponibles tenían como origen preparaciones crudas de plantas, animales o minerales, debido a la experimentación fisiológica y al desarrollo de la química medicinal el aislamiento, purificación e identificación de principios activos hizo posible la síntesis de nuevos fármacos y con ello el crecimiento, durante el siglo XX, de la industria farmacéutica y la venta de nuevos productos que prometían el mejoramiento de la salud, sin embargo el desastre de la talidomida en 1962 obligó a las autoridades sanitarias a emitir normatividades para la protección del paciente dando como resultado la creación de Comités de Ética y de investigación en seres humanos [Magos-Guerrero y Lorenzana-Jiménez, 2009].

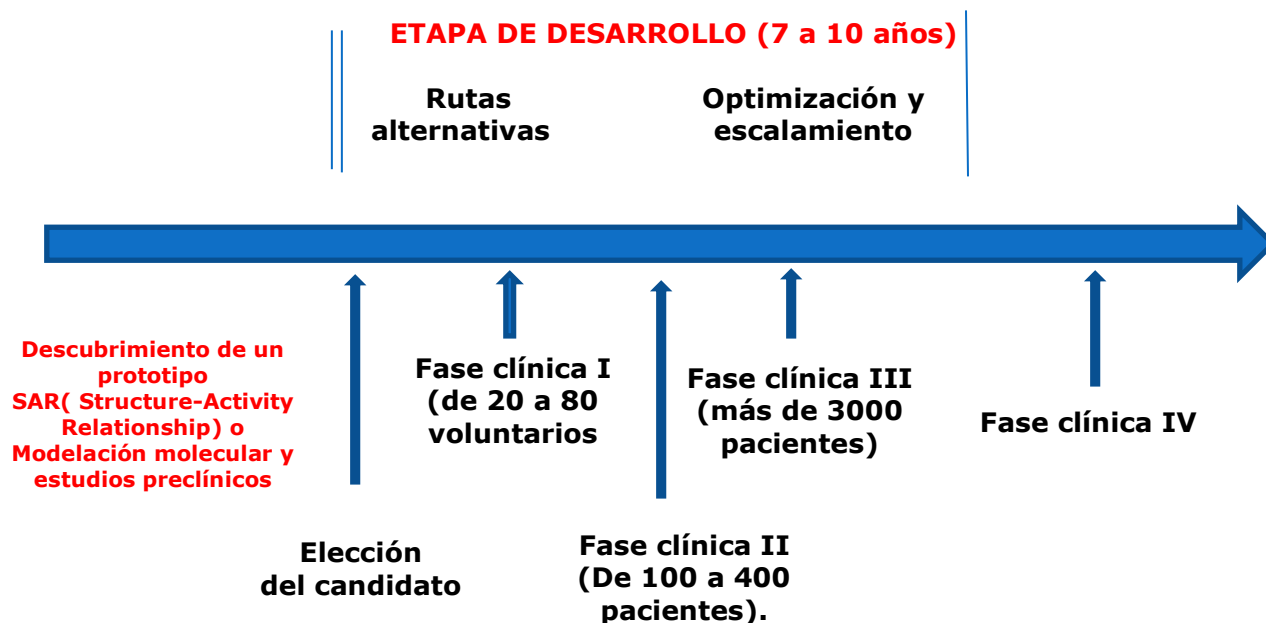


Figura 1. Etapas del desarrollo de un medicamento. King F.D. (2002). Medicinal Chemistry. RSC. Great Britain. pp. 182.

2.2.1 **Fase pre-clínica.**

Esta etapa puede sub-dividirse en tres fases:

Evaluación general del potencial farmacológico de las moléculas, en el caso de no conocer su efecto o de ser diseñado para una acción en específico. Estas evaluaciones pueden realizarse *in vitro*: en tejidos, órganos aislados o líneas celulares e *in vivo* en diversas especies animales con dosis estándar estableciendo además posibles efectos secundarios [Pérez-Sánchez, P. y Sobredo-Galanes A., 2010].

- a) Estudios de toxicidad aguda y crónica, afectación en fertilidad, mutagenicidad, teratogenicidad [Pérez, 2010].
- b) Estudios farmacocinéticos y estudios farmacodinámicos en diversas especies animales [Magos, 2009].

2.2.2 **Fase Clínica.**

Para que un nuevo fármaco sea probado en humanos primeramente debe de contar con autorización gubernamental y registro del fármaco, en nuestro país es otorgada por la Secretaría de Salud por medio de la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

La fase clínica se divide en cuatro fases:

2.2.2.1 Fase I.

Los estudios son realizados principalmente en un pequeño grupo de voluntarios sanos (20-80), por investigadores capaces de evaluar datos farmacológicos y toxicológicos. Los objetivos principales de esta fase son: a) revisar la seguridad al valorar la presencia de efectos dañinos,

b) la tolerabilidad al establecer los límites probables de valores de dosis clínicas seguras y c) la farmacocinética al valorar la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco en estudio. En ocasiones en esta fase, las pruebas son realizadas en voluntarios enfermos, sobre todo cuando se espera toxicidad del fármaco, como ocurre con los agentes antineoplásicos, y no es ético exponer a voluntarios sanos a efectos tóxicos predecibles. En la fase I las pruebas no son ciegas, es decir tanto los sujetos en estudio como los investigadores conocen el medicamento que se está administrando. [Magos, 2009]. Sin embargo, en ocasiones, en un ensayo clínico en fase I se acepta la intervención de pacientes voluntarios, especialmente al analizar tratamientos oncológicos. Lo habitual es que en estos pacientes hayan fracasado los tratamientos disponibles o que cuenten con pocas opciones terapéuticas o bien que los posibles efectos secundarios del medicamento sean demasiado arriesgados para que participen personas sanas (como al utilizar algunos quimioterápicos).

2.2.2.2 Fase II.

Cuando en la fase I son obtenidos resultados confiables, por primera vez el fármaco es estudiado en pacientes con una enfermedad determinada a tratar. Los estudios de fase II en su mayoría, tienen como propósito valorar la eficacia del fármaco nuevo en la enfermedad para la cual es diseñado. En esta fase, el fármaco es administrado a un número relativamente reducido de pacientes con la enfermedad (20-80), revisión cuidadosa de personal calificado para determinar la eficacia y seguridad del fármaco. En esta fase, el clínico necesita estar familiarizado con la patología que se está tratando, y diseña con frecuencia un estudio ciego en donde los pacientes desconocen el

tratamiento. Además del grupo que recibe el fármaco nuevo, se incluye otro grupo que recibe el fármaco de referencia (control positivo). La decisión para proceder con ensayos clínicos en grandes poblaciones, se toma en esta fase que emplea un número limitado de pacientes. La carencia de eficacia clínica es una razón común para continuar el estudio. [Magos, 2009].

2.2.2.3 Fase III.

Después de los datos arrojados por la fase I y II es posible decidir si el desarrollo del fármaco puede seguir adelante o no. En el caso que se siga con el desarrollo, se procede a organizar un ensayo clínico con un mayor número de pacientes, es decir pasar de 80 pacientes hasta 3,000 esperando disminuir los errores ocasionados por el sesgo de las etapas anteriores y así comprobar con datos confiables que el fármaco es seguro y eficaz [Magos, 2009].

Una vez que finaliza con éxito la fase III, la empresa promotora presenta una solicitud de fármaco o producto biológico nuevo a las autoridades sanitarias. En Europa, la empresa presentaría una solicitud de fármaco nuevo (NDA) para un medicamento de molécula pequeña o una solicitud de autorización de producto biológico (BLA) para un fármaco de molécula más grande a la EMEA. Si el organismo regulador (la EMEA en Europa o la FDA en los Estados Unidos) aprueba el uso del medicamento, se permite que la empresa promotora comercialice y venda el producto en el país o los países regulados por dicha autoridad. La fabricación final del fármaco, o producción a gran escala, debe tener lugar en una instalación que cumpla las normas estrictas del país, como las Normas para la Correcta Fabricación (NCF) de la EMEA o las Buenas

Prácticas de Fabricación (cGMP) de la FDA, a fin de garantizar la seguridad y la pureza del producto.

2.2.2.4 Fase IV.

Una vez que las solicitudes de las entidades regulatorias están cubiertas, el medicamento es puesto a la venta, sin embargo al ser la primera vez que el medicamento se expondrá a una gran cantidad de pacientes, es necesario llevar un control sobre los efectos secundarios o tóxicos, es decir llevar una vigilancia sobre el fármaco este proceso es conocido como Farmacovigilancia.

Los ensayos en fase IV se llevan a cabo una vez que se comercializa un fármaco aprobado. Un objetivo es vigilar la seguridad y la eficacia del fármaco cuando se utiliza en un contexto médico normal en una población de pacientes que podría ascender a varios millones. En ocasiones se descubren reacciones adversas, que no se observaron en una cohorte de pacientes comparativamente pequeña (3.000 pacientes voluntarios en comparación con millones), en poblaciones más amplias y diversas. Si se descubre una reacción adversa, es posible que se retire el fármaco del mercado. La empresa promotora puede retirar voluntariamente el medicamento o un organismo regulador puede retirarlo del mercado. Tras efectuar nuevos estudios, cabe la posibilidad de volver a incorporar el fármaco. En promedio, se tarda entre 10 y 15 años en completar las distintas etapas de la fase de desarrollo de un producto. La mayoría de los medicamentos en investigación no lo consiguen. De cada 1.000 posibles medicamentos nuevos en descubrimiento, tan sólo uno alcanzará la autorización.

2.3 **Casiopeínas®**

Para el caso de antineoplásicos existen más de 50 compuestos aprobados a nivel mundial para su uso, de ellos solo el cisplatino, el carboplatino y el oxaliplatino son inorgánicos a base de platino [NCI ,2015]. En la actualidad se sabe que el cisplatino, es uno de los más potentes fármacos antitumorales con efecto en la síntesis del ADN, lo que le confiere actividad frente a distinto tipos de cáncer como sarcomas, carcinomas, leucemias y linfomas, cuando se administra solo o en combinación con otros fármacos, o bien con otros tratamientos como radioterapia o cirugía.

Sin embargo, su uso es restringido porque es tóxico en tejidos normales y es altamente mutagénico, causando intercambios de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas en cultivos celulares de mamíferos. [Tucker y Preston, 1996;Truter, et al. 2002; khyram y prasad 2003], medula ósea de rata [de Oliveira, et al., 2002]. Otro inconveniente que presenta el uso cisplatino es su eficacia terapéutica limitada, dado que se ha observado en distintos tipos de cáncer como ovario, próstata , carcinoma escamoso en humanos y en leucemia L1210, P388 de ratón, resistencia ante la acción química del cisplatino [Chabner y Collins 1990 ; Kartalou y Essigmann, 2001].

Ante tales desventajas de los medicamentos que hasta ahora se encuentran disponibles en el mercado, surgió la necesidad de obtener nuevas moléculas que pudieran eliminar los inconvenientes que implica la utilización de estos fármacos y es así como la Dra. Lena Ruiz y su equipo de trabajo, lograron sintetizar una serie de compuestos de coordinación que han demostrado tener actividad antineoplásica y

presentar notables ventajas sobre los fármacos comúnmente utilizados, dichos compuestos llevan el nombre de Casiopeínas®.

Las Casiopeínas® son una familia de más de 100 compuestos de coordinación de Cobre (II), de fórmula general: $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$ o $[Cu(N-N)(O-N)]NO_3$ los cuales han sido caracterizadas y reorganizadas en subfamilias de acuerdo a las variaciones en la fórmula general tal como se muestra en el cuadro 1 que fueron creados como análogos del Cis-platino, fármaco utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer [I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez. C., Gómez-Ruiz, M. et al., 2001].

Durante el diseño y desarrollo de estas moléculas se establecieron tres aspectos fundamentales: 1) la inclusión de un metal esencial en vez del platino, lo que disminuye su toxicidad, su estado de oxidación y su número de coordinación; 2) la formación de quelatos que favorecen la orientación *cis* alrededor del ión metálico preservando la capacidad de intercalamiento en la cadena de ADN y 3) la asociación de moléculas con capacidad quelante que confiere diversos niveles de hidrofobicidad, con sustituyentes periféricos que pueden modificar las propiedades de los compuestos. [Fuentes, 2005].

Cuadro 1. Fórmula General de sub Familias de Casiopeínas®

Sub Familia	Formula General
Casiopeína® I	$[Cu(4,7\text{-difenil-fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® II	$[Cu(4,7\text{-dimetil-fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® III	$[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$
Casiopeína® IV	$[Cu(4,4'\text{-dimetil-bipiridina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® V	$[Cu(5R\text{-fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® VI	$[Cu(5,6\text{-dimetil-fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® VII	$[Cu(\text{fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® VIII	$[Cu(3,4,7,8\text{-tetrametil-fenantrolina})(O-N)]NO_3$
Casiopeína® IX	$[Cu(\text{bipiridina})(O-N)]NO_3$

2.3.1 *Casiopeína III-ia*®

La Casiopeína III-ia® (CasIII-ia®) (Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina) (acetilacetonato)] NO₃·2H₂O, mostrada en la figura 2, es un compuesto de coordinación constituido por dos ligantes bidentados, uno de ellos donador de oxígenos con un centro metálico de cobre II y una geometría cuadrada plano [Tovar-Tovar A. Ruiz-Ramírez, L. Campero, A. Romerosa A. Moreno-Esparza R. Rosales-Hoz M., 2004]. Esta molécula se ha sometido a estudios químicos en los que son definidos características y propiedades estructurales de la molécula [Martínez, 2008].

En el cuadro 2 se muestran algunos datos de la caracterización fisicoquímica obtenidos por medio de diversos métodos espectroscópicos: ultravioleta-visible, infrarrojo, resonancia paramagnética electrónica, análisis térmico diferencial [Tovar, et al., 2004] y cromatografía líquida de alta resolución [Fuentes, 2002].

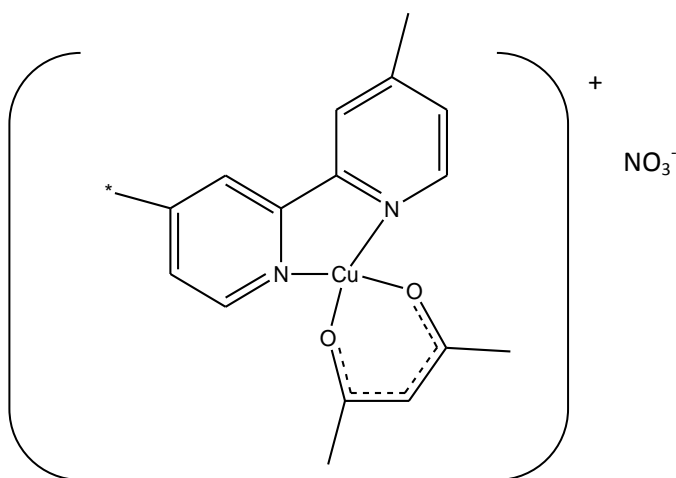


Figura 2 Estructura de la Casiopeína III-ia®.

También se han realizado estudios de estabilidad en condiciones de almacenamiento a 40°C y 75% de humedad relativa, según establece la norma mexicana NOM-073-SSA1-1993. Los resultados de estos arrojaron que la pureza del compuesto disminuye 30 días después de iniciado el análisis. [Estudios no publicados realizados en la Facultad de Química UNAM, 2008].

Cuadro 2. Características fisicoquímicas de la Casiopeína III-ia®

Característica	Descripción
Peso Molecular	426.92 g/mol
No. CAS	223930-33-4
Análisis Elemental	H 4.96, C 47.83, N 9.84, O 22.49, Cu 14.88
Descripción del compuesto	Polvo fino, libre de partículas extrañas, homogéneo, color azul claro.
* Solubilidad	A temperatura ambiente es soluble en agua, metanol, etanol y solución glucosada al 5% a pH 7.4
Coefficiente de partición	-0.95
Solubilidad*	Soluble en agua y Metanol Ligeramente soluble en solución salina y solución glucosada
Estabilidad en pH	3-8
Recomendaciones	Las soluciones de este compuesto deberán protegerse de la luz.

* **Según la clasificación de la FEUM**

2.3.1.1 **Actividad Biológica de la Casiopeína III-ia® y datos farmacocinéticos**

Para la CasIII-ia® diseñada para ejercer actividad anticancerígena, los experimentos fueron guiados a la comprobación de dicho efecto terapéutico. Para demostrar la actividad biológica en modelos *in vitro* se evaluó la inhibición del crecimiento de células humanas y murinas. Los resultados arrojaron que las concentraciones a utilizar de CasIII-ia® para inhibir el 50% del crecimiento de líneas humanas de carcinoma

cérvico-uterino son de 10 a 100 veces menores a las utilizadas para el cisplatino. En cambio para líneas murinas de carcinoma de pulmón de Lewis, línea celular altamente metastásica, no se encontró ninguna actividad, ni del cisplatino. [Gracia, et al., 2001].

Los estudios *in vivo* se han realizado con líneas celulares murinas isotransplantadas mostró una actividad antiancerígena sobre melanoma B16, leucemia linfoide L1210, sarcoma S180 y carcinoma de pulmón de Lewis LLC, los resultados han mostrados que la remisión del tumor y el aumento de sobre vida hasta en un 98% es dependiente de la vía de administración esquema de tratamiento [Gracia, et al 2004]. Por otro lado en líneas celulares humanas que fueron xenotrasplantadas los ensayos arrojaron que en ratas tratadas con CasIII-ia® en dosis de 6 mg/Kg por vía intravenosa presentaron una remisión total del tumor en el transcurso de un mes. [Carvallo-Cheigneau, et al., 2008].

Los estudios también han vislumbrado el posible mecanismo de acción de la CasIII-ia® que consiste en inhibir la proliferación celular produciendo la muerte por apoptosis o actividad autofágica, de forma independiente de la dosis. [Carvallo, et al 2008].

2.3.1.2 **Métodos de cuantificación de Casiopeína III-ia®**

Existen métodos desarrollados utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV, por su siglas en inglés) para la cuantificación de este compuesto en plasma de rata en un intervalo de concentraciones de 2.5-50 µg/mL, sin embargo los

nuevos datos sugieren que la sensibilidad de los métodos debería de ser mayor, en el orden de los nanogramos (ng); en pruebas realizadas a concentraciones de CasIII-ia® entre 20 y 50 µg/mL el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es menor al 90%, sin embargo el porcentaje aumenta en concentraciones menores a 12 µg/mL [Fuentes, 2005].

Por otro lado también existe una metodología por HPLC-MS desarrollada y validada para cuantificar la Casiopeína III-ia en el intervalo de 25 a 1000 ng/mL, utilizando un volumen de muestra de 1 mL. Este método permitió establecer los parámetros del comportamiento cromatográfico y espectrométrico de este fármaco. [Osnaya 2015].

2.3.1.3 **Farmacocinética y LADME**

Pocos estudios farmacocinéticos se han realizado a la Casiopeína III-ia. Se reporta en la literatura científica el estudio farmacocinético preclínico en ratas y perros, y en otro trabajo en conejos [García, I Bravo 2004] obteniéndose valores farmacocinéticos para el tiempo de vida media, volumen de distribución y depuración de 12 h, 0.18 L y 0.115 ml/ min; 1.91 L y 0.09 ml/min y 53.9 min, 0.203 L y 2.09 ml/min, respectivamente. El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas a aproximadamente el 80% (concentraciones trabajadas 12,25 y 50 µg/ml) y el coeficiente de biodistribución sangre/plasma es mayor a 2 por lo que se infiere que la Casiopeína III-ia se encuentra en mayor proporción en la sangre total que en el plasma a las concentraciones ensayadas [Fuentes 2005]. Por otra parte, estudios de excreción en orina demuestran que este complejo de coordinación se excreta de manera inalterada en un porcentaje del 35% [Romero 2007].

2.3.1.4 **Farmacodinamia**

El mecanismo de acción aún no se ha elucidado satisfactoriamente; sin embargo existe evidencia que apoya la capacidad de estos compuestos para inhibir la proliferación celular y producir muerte por apoptosis de forma independiente de la dosis mediante mecanismos que pueden o no involucrar la activación de caspasas [Carvallo 2008]. La Cas III-ia inhibe la proliferación celular y produce cambios celulares morfológicos sugestivos de apoptosis, generando fragmentación del ADN [Rivero-Muller 2007]. La apoptosis puede ser el resultado de una o varias señales que conducen a este efecto final; estas señales involucradas podrían estar mediadas por varios mecanismos, siendo tres los principales: la interacción directa con el ADN [Rivero Muller 2007-Becco 2012], la toxicidad mitocondrial [Kachadourian 2009, Marin-hernandez 2003] y la generación de radicales libres [Alemon-Medina 2008] que provocan la oxidación de las bases púricas y pirimídicas, y en consecuencia, la fragmentación del ADN y disminución de la concentración de glutatión intracelular. La fragmentación en el ADN se presenta de forma dosis dependiente [Alemon-medina 2011].

3 **CONSTANTE DE PARTICIÓN SANGRE/PLASMA**

(K_{b/p})

Es recomendable, antes de iniciar el proceso de extracción del fármaco de la matriz biológica, eliminar la mayor parte del componente de esta que pudieran interferir en el proceso de cuantificación. Los fluidos que son utilizados para determinar un analito en el ámbito farmacocinético son la sangre, el plasma, el suero, la orina, el fluido cerebroespinal, la

heces y, en menor medida, la bilis, la saliva y otros tejidos como el muscular [Cañas 2013], dependiendo de la complejidad deberá ser más o menos rigurosa. La sangre es el compuesto más complejo de los 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 eritrocitos, entre otros componentes. La separación debe realizarse con cuidado especial, 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 como la liberación de iones de hierro, los cuales pueden quelar ciertos compuesto estudiado provocando una extracción pobre.

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 y agregando un anticoagulante como la heparina. Sin embargo algunos fármacos presentan tendencia a unirse firmemente a algunas proteínas plasmáticas como los son la albúmina y alfa glicoproteína. Si la metodología propuesta indica que se centrifugue la muestra antes de liberar el principio activo, en el sobrenadante se encontraran cantidades ínfimas del compuesto de interés, por lo cual se puede tener una baja sensibilidad al realizar el análisis. Es necesario en estas situaciones adicionar una sustancia o sustancias que permitan la ruptura de la unión fármaco-proteína antes de realizar la centrifugación. Sin embargo para la elección consiente de la sustancia utilizada para la ruptura, es necesario conocer la estabilidad del analito ya que algunos reactivos pueden reducir drásticamente el pH del plasma al adicionarlos para su extracción lo que puede degradar el fármaco.

3.1 ***Estudios de biodistribución sangre total / plasma***

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 tienen 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 análisis en comparación con la sangre total [Cañas, 2013]. Dicho coeficiente ayuda a determinar diferentes aspectos relevantes del fármaco, como la elección racional del fluido biológico más conveniente para el muestreo, así como la predicción in vitro de la distribución in vivo, conocimiento fisiológico del analito relacionándolo con los parámetros farmacocinéticos y el conocimiento de la posibilidad de interacción del fármaco con el paquete globular eritrocitario [Hinderling 1997]. De esta forma, teniendo en consideración el hematocrito, se puede conocer el coeficiente de partición entre células rojas y plasma dando indicio a la interacción del analito con las células sanguíneas. El valor de kb/p nos indica cual es el fluido de mayor preferencia del fármaco en cuestión. Para los fármacos en los que $kb/p > 2$ se obtiene una mayor sensibilidad trabajando en sangre total mientras que en el caso contrario cuando $kb/p < 2$ se tiene una mayor sensibilidad cuando se trabaja en plasma [Hinderling 1997]. En estudios realizados de la Casiopeína II gly, otro miembro de la familia de Casiopeínas, se demostró un valor de la $Kb/p > 2$ lo cual indica una proporción más importante en sangre total que en plasma humano dicho estudio se realizó en diferentes especies (humano, rata, perro). [Cañas 2013].

El significado del estudio de la constante de partición sangre/plasma en animales y humanos no se aprecia plenamente, a pesar de que se ha demostrado su importancia en determinaciones rutinarias de velocidad y grado de compartimentación de los medicamentos en investigación [Lee et al., 1981b; Hinderling 1984]. El conocimiento de la K_b/p permite: A) una elección razonable del fluido biológico apropiado ya sea sangre total, plasma, o suero para el ensayo en cuestión; B) una referencia fisiológicamente significativa de los parámetros farmacocinéticos de fármacos a concentraciones en entera , plasma, o suero; C) la predicción in vitro de la distribución del fármaco in vivo; D) la determinación de la unión a proteínas plasmáticas de los medicamentos ;y e) de detección eficaz de fármacos cuya biofase reside dentro de los glóbulos rojos , lo que permite el estudio de la efectos de las fármacos en los glóbulos rojos . [Hinderling 1997]

3.2 **Métodos para el cálculo de k_b/p**

El método propuesto por **Yu, S, et al., 2005**, sugiere la utilización de plasma durante todo el ensayo con la metodología siguiente:

A una alícuota de sangre humana heparinizada recién extraída agregar un apropiado volumen de solución cargada con analito para que las concentraciones finales sean de 500 η M en ensayos regulares y 100, 500 y 1000 η M para ensayos dependientes de la concentración. De manera simultánea extraer del mismo lote de sangre completa una cantidad de plasma igual que el volumen de sangre utilizado en el experimento anterior (Fig. 3) y agregar el volumen de solución con analito necesario para tener soluciones a las mismas concentraciones

que en el experimento anterior pero en plasma humano, mezclar y posteriormente incubar durante un tiempo a 37 grados centígrados. Incubar a distintos tiempos (intervalos de una hora durante 4 horas), tomar una alícuota de cada lote y centrifugar, del plasma obtenido, cierta cantidad se somete al procedimiento de extracción y posterior infusión a LC/MS/MS. El autor propone el cálculo de la constante de partición sangre/ plasma de la siguiente manera:

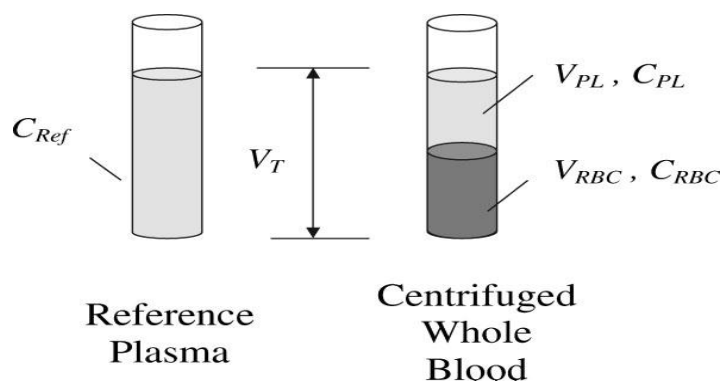


Figura 3. Esquema de preparación de muestras Yu S, et al, 2005

Ecuación para cálculo de $K_{b/p}$:

$$K_{RBC} = \frac{1}{H} \times \left(\frac{I_{PL}^{REF}}{I_{PL}} - 1 \right) + 1$$

Uchimura T 2010, propone una metodología para el cálculo de K_b (concentración de fármaco libre en plasma) y R_b (coeficiente de partición sangre plasma) usando directamente sangre completa como matriz biológica en su estudio y de este fluido se cuantifica la cantidad

de fármaco que se une a eritrocitos y la cantidad que se queda libre en plasma.

La concentración total de fármaco en sangre (C_b) puede expresarse de la siguiente manera:

$$C_b = C_{rbc} * H_t + C_p * (1 - H_t) \quad (1)$$

$$C_b = C_{rbc} * H_t + C_{pb} * (1 - H_t) + C_{p,u} * (1 - H_t) \dots \dots (2)$$

Donde C_p es la concentración del plasma, C_{pb} es la concentración de proteína unida a fármaco, C_{rbc} es la concentración de eritrocitos y $C_{p,u}$ es la concentración en plasma libre H_t es hematocrito.

$$C_{rbc} = K_b * C_{pu} \dots \dots (3)$$

$$C_{p;b} = \frac{1 - f_p}{f_p} * C_{pu} \dots \dots (4)$$

Se sustituye de la ecuación 3 y 4 en ecuación 2 , C_{rbc} y C_{pb} pueden ser expresados usando la ecuación :

$$C_b = K_b * C_{pu} * H_t + \frac{1}{f_p} * C_{pu} * (1 - H_t) \dots \dots (5)$$

Donde f_p es la fracción de plasma libre.

De la ecuación (4), $C_p = C_{pb} + C_{pu}$ puede ser expresada como se sigue

$C_b = \frac{1}{f_p} * C_{pu} \dots \dots (6)$ De las ecuaciones (5) y (6) , R_b puede ser expresada:

$R_b = \frac{C_b}{C_p} = (K_b * f_p - 1) * H_t + 1 \dots \dots (7)$, K_b puede ser calculada de f_p , R_b y H_t usando (8)

$$K_b = R_b + H_t - \frac{1}{H_t} * f_p$$

Otra metodología para el cálculo de la constante de partición sangre /plasma es el propuesto por **Hinderling 1997** (Fig. 4) propone el siguiente método para el cálculo de k_b/p :

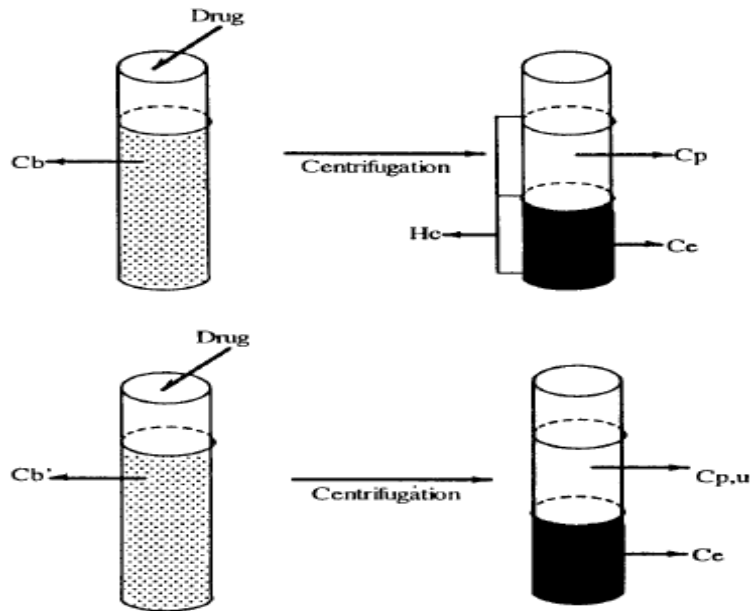


Figura 4. Esquema de preparación de soluciones según Hinderling 1997

Propone que la K se obtiene a partir de las siguientes ecuaciones

$$K_{e/p} = \frac{C_e}{C_p} \dots \dots (1)$$

$$K_{e/p,u} = \frac{C_e}{C_{p,u}} \dots \dots (2)$$

La relación entre $K_{e/p}$ and $K_{e/p,u}$ está dada por:

$$\frac{K_e}{p} = \frac{K_e}{p,u} * f_u \dots \dots (3)$$

Donde f_u representa la fracción no unida a plasma. La ecuación 3 indica que $K_{e/p}$ depende de f_u . Esto es porque solo las moléculas de fármaco no pegadas en plasma estarán en glóbulos rojos.

La K_b/p representa un parámetro de biodistribución adicional muy importante.

$$\frac{K_b}{p} = \frac{K_e}{p} * Hc + (1 - Hc) \dots \dots (4)$$

la ecuación 4 demuestra que k_b/p depende del hematocrito de la sangre utilizada.

$$C_e = C_{p,u} \left(I + \frac{nEt}{K_{d,e}} + \frac{C_{p,u}}{K_d} \right) \dots \dots (5)$$

Donde nEt corresponde a la concentración total del sitio de unión n en glóbulos rojos K_d es la constante de asociación y I es una constante de fármaco no unido en la fase acuosa de los glóbulos rojos y $C_{p,u}$. Para fármacos hidrófilos que se unen a la parte externa de la membrana sin llegar a pasarla C_e se define como:

$$C_e = C_{p,u} \left(\frac{nEt}{K_{d,e}} + \frac{C_{p,u}}{K_{D,e}} \right) \dots \dots (6)$$

La concentración total en plasma se define como:

$$C_p = C_{p,u} \left(1 + \frac{nPt}{K_{D,p}} + \frac{C_{p,u}}{K_{D,p}} \right) \dots \dots (7)$$

Llegando a la ecuación:

$$\frac{K_e}{p} = I + \frac{nEt}{K_{D,e}} + \frac{nPt}{C_{p,u}}$$

La empresa Cyprotex especializada en productos para la industria química y farmacéutica hace una adaptación al método de Yu *et al.*, 2005, en el cual el compuesto problema se carga en sangre entera

heparinizada fresca, se hace una referencia de glóbulos rojos y el plasma de referencia. Tras el período de incubación, la sangre total se centrifuga. Ambas fracciones de la sangre entera (plasma y células rojas de la sangre) son analizados por LC -MS / MS junto con las muestras de referencia.

El cálculo se hace como se sigue:

$$\text{Constante de particion sangre/plasma } \left(\frac{Kb}{p} \right) = \left(\frac{Ke}{p} * H \right) + (1 - H)$$

Dónde:

Kb/p es el coeficiente de partición de sangre total en plasma
 H = hematocrito

$$Ke/p = \frac{I_{RBC}}{I_{RBC}^{REF}} / \frac{I_{PL}}{I_{PL}^{REF}}$$

Dónde:

Ke/p , es el coeficiente de partición de RBC / plasma

I_{PL} , es la respuesta del LC-MS/MS (área de pico del estándar) para la fracción de plasma

I_{PL}^{REF} , es la respuesta del LC-MS/MS (área de pico del estándar) para la fracción de plasma de referencia.

I_{RBC} , es la respuesta del LC-MS/MS (área de pico del estándar) para las RBC

I_{RBC}^{REF} , es la respuesta del LC-MS/MS (área de pico del estándar) para las RBC de referencia.

En este trabajo de tesis se toma como referencia el trabajo realizado por Yu *et al.*, 2005 es decir el ensayo se realiza en plasma humano fresco.

4 **OBJETIVOS:**

4.1 **Objetivo general**

Obtener la constante de partición sangre/plasma humana de la Casiopeína III-ia.

4.2 **Objetivos particulares**

- Optimizar las condiciones para la cuantificación de Casiopeína III-ia ®
- Determinar el tiempo en el que la Casiopeína III-ia® llega al equilibrio en la sangre humana
- Determinar el fluido más apropiado (sangre o plasma) para la realización de estudios biofarmaceuticos en fase clínica de la Casiopeína III-ia®.

5.0 METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

- Estándar de Casiopeína III-ia® MEB199, sintetizada por el Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la UNAM según la patente correspondiente.
- Metanol grado cromatográfico, JT Baker.
- Ácido Heptafluorobutírico (HFBA) Fluka-Sigma Aldrich 99%
- Agua desionizada, procesada en el laboratorio de trabajo con el sistema Millipore con resistencia de 18 mΩ

5.2 Materiales, Equipos e Instrumentos

- Cromatógrafo de líquidos modelo 1290 infinity marca Agilent Technologies compuesto de un desgasificador y bomba binaria (G4220B); Termostato (G1330B); inyector (G4226A); y detector UV (G1314E).
- Detector espectrómetro de masas del tipo tiempo de vuelo (Q-TOF) equipado con un sistema de ionización tipo electrospray Dual AJS ESI, Agilent Technologies 6530.
- Tubos Vacutainer c/heparina
- Agujas para vacutainer
- Jeringas estériles de 20 ml

- Jeringas estériles de 10 ml
- Balanza analítica BEL Engineering, MARK205A
- Centrífuga Micromas Rf
- Desionizador de Agua Milli-Q, Millipore, Integral 5
- Filtrador de disolventes Millipore
- Infusionador Cole Parmer, 60061
- Manifold Thermo Scientific, 16 port, 60104-232
- Vortex3, IKA, V35001
- Sonicador Auto science, AS3120B
- Concentrador Vaccfuge plus, Eppendorf
- Cartuchos SPE Strata-X, Phenomenex, 33 μm , 60 mg, 1cc.
- Viales ámbar, 1.5 mL
- Insertos de plástico, 200 μL
- Columna Cromatográfica Eclipse Plus C8; 4.6x150 mm; 3.5 μm , Agilent Technologies.
- Pre-column Eclipse Plus C8 4.6 x 12.5 mm; 5 μm ; Agilent Technologies.
- *Save-guard*, Agilent Technologies
- Micropipeta BRAND 100-1000 μL , Transferpette
- Micropipeta Rainin 20-200 μL XLS

- Micropipeta Ranin 2- 20 μL XLS
- Micropipeta Science MED 1000- 5000 μL

5.3 ***Preparación de Soluciones***

5.3.1 ***Solución de HFBA 40 μM acuoso***

En un matraz aforado de un 1.0 L, agregar aproximadamente 200 mL de agua desionizada, posteriormente medir de manera exacta 5.1 mL de HFBA concentrado y traspasar al matraz aforado, una vez disuelto llevar al aforo con agua desionizada. La solución se almacena en un frasco reservorio ámbar.

5.3.2 ***Solución estándar A de Casiopeína III-ia® en agua, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$***

Pesar 10.0 mg de CasIII-ia® y trasvasar a un matraz aforado de 10.0 mL, disolver el polvo en aproximadamente en 5 mL de agua desionizada y posteriormente se llevar al aforo. La solución se trasvasa a un frasco ámbar y se almacena en refrigeración protegido de la luz.

5.3.3 ***Fase móvil: metanol grado cromatográfico, HFBA 40mM en agua (7:3)***

Para preparar 1 L , medir 700 mL de metanol grado cromatográfico y trasvasar a un frasco reservorio ámbar de capacidad adecuada, posteriormente se medir 300 mL de la solución de HFBA 40mM en agua y agregar al frasco reservorio, mezclar adecuadamente y almacenar en refrigeración y protegido de la luz.

5.3.4 ***Solución HFBA 5% acuoso***

Agregar a un matraz aforado de 100 mL aproximadamente 25 mL de agua desionizada, posteriormente medir 5,0 mL de HFBA concentrado y agregar al matraz aforado. Llevar al aforo con agua desionizada.

5.3.5 ***Soluciones de trabajo y muestras en matrices biológicas (sangre y plasma).***

Para la preparación de las muestras biológicas (sangre y plasma) preparar soluciones de CasIII-ia® en agua a partir de la solución estándar según muestra el cuadro 3a, posteriormente para preparar las muestras cargadas con el analito agregar los μL necesarios de cada solución de acuerdo a la concentración correspondiente como se muestra el cuadro 3b.

5.4 **Material Biológico**

- Sangre humana fresca
- Plasma humano

5.5 **Software**

- Mass Hunter Work Station Software. Agilent Technologies. Service Pack, conformado por: LC/MS Data Acquisition Versión B.05.01, 2012; Quantitative analysis Versión B.05.02, 2012 y Qualitative Analysis Versión B.06.00, 2008.

Cuadro 3a. Preparación de muestras cargadas con el analito en agua.

Estándar A (µg/mL)	Alícuota(µL)de Estándar A	Alícuota de agua (mL)	Conc. final(sol. de trabajo) (µg/mL)
1000	30	9.97	3
1000	200	9.80	20

Cuadro 3b. Preparación de muestras cargadas con el analito en plasma y sangre.

	Solución de trabajo (µg/mL)	Alícuota de sol. De trabajo (µL)	µL de plasma fresco	µL de muestra cargada con analito	Concentración final (ng/mL)
1	3	4.16	495.8	500	25
2	3	16.6	483.4	500	100
3	3	25	475.0	500	150
4	20	8.75	491.25	500	350
5	20	12.50	487.5	500	500
6	20	20.0	480.0	500	800
7	20	25.0	475.0	500	1000

5.6 **Desarrollo y optimización de la metodología**

5.6.1 **Condiciones instrumentales**

5.6.1.1 **Condiciones optimizadas**

Se determinaron las condiciones adecuadas para poder darle el debido seguimiento al ion de cuantificación modificando los parámetros del equipo como se muestra en el cuadro 4:

Cuadro 4. Optimización de condiciones iniciales

Condiciones iniciales	Condiciones optimizadas
Polaridad: positiva	Polaridad: positiva
Energía de colisión: 0 v	Energía de colisión: 0 v
Temperatura de gas: 300 ^o C	Temperatura de gas: 350 ^o C
Flujo de gas de lavado: 11 L/min	Flujo de gas de lavado: 12 L/min
Temp. Gas de asiento: 250 ^o C	Temp. Gas de asiento: 350 ^o C
Flujo gas de asiento: 15 L/min	Flujo gas de asiento: 11 L/min
Fragmentor: 100	Fragmentor: 175
Nebulizador: 35	Nebulizador: 40
Voltaje de Capilar: 2500 v	Voltaje de Capilar: 2500 v

5.6.2 **Determinación del espectro de masas de la**

Casiopeína III-ia® utilizando infusión directa.

Dado el peso molecular esperado de la Casiopeína III-ia®, se trabajó en un rango de masas de 50 a 700 m/z.

Se prepararon soluciones de Casiopeína III-ia® a una concentración relativamente alta (10 µg/ml) utilizando en primera instancia solo

metanol como disolvente con el objetivo de ver con claridad el ion correspondiente a la Casiopeína, posteriormente se procedió a la infusión directa a la misma concentración de Casiopeína III-ia® pero con las probables fases móviles a utilizar en distintas proporciones (Cuadro 5) y obtener así el espectro de masas correspondiente. Todo el procedimiento antes mencionado se realizó a una velocidad de infusión de 5µl/h. Con el espectro de masas, se seleccionó el posible ion de cuantificación basados en el peso y la intensidad de la señal que se obtuvo.

CUADRO 5 condiciones de fase móvil

Solución	FASE MÓVIL	PROPORCIÓN (%)
1	HFBA 20Mm / Metanol	70 / 30
2	HFBA 20Mm / Metanol	50 / 50
3	HFBA 20Mm / Metanol	30 / 70
4	HFBA 40Mm / Metanol	70 / 30
5	HFBA 40Mm / Metanol	50 / 50
6	HFBA 40Mm / Metanol	70 / 30
7	TFA 20Mm/ Metanol	70 / 30
8	TFA 20Mm/ Metanol	50 / 50
9	TFA 20Mm/ Metanol	30 / 70
10	THF 20Mm / Metanol	70 / 30
11	THF 20Mm / Metanol	50 / 50
12	THF 20Mm / Metanol	30 / 70
13	Acetonitrilo / Metanol	70 / 30
14	Acetonitrilo/ Metanol	50 / 50
14	Acetonitrilo/ Metanol	30 / 70

5.6.3 ***Ion de cuantificación 346.07 m/z***

Se utilizó una solución de CasIII-ia® en metanol a una concentración de 10 µg/mL, esta solución fue preparada a partir de la solución estándar de 1000 µg/ml, posteriormente con ayuda del infusor se inyectó directamente a la interfase (ESI) del detector de masas a una velocidad de 5 mL/h en condiciones *default* del sistema espectrométrico. Se inyectó una muestra de Casiopeína III-ia® en agua a una concentración de 5 µg/mL, variando el volumen, flujo y proporciones de las diversas fases móviles.

5.6.4 ***Ion de Cuantificación 460.00 m/z***

5.6.4.1 ***Infusiones de Casiopeína III-ia® con pares iónicos***

Se realizaron infusiones de CasIII-ia®, a una velocidad de 2 mL/h, con soluciones a concentración de 10 µg/mL, preparadas en HFBA 40mM /Metanol (3:7).

Adicionalmente se prepararon soluciones de CasIII-ia® a 10 µg/mL, preparadas en HFBA/Metanol a las proporciones:(2:8) , (3:7) ,(8:2).

5.6.4.2 ***Pruebas de retención usando el ión de 460 m/z***

Se probaron como fases estacionarias: Eclipse Plus C8 y Eclipse Phenyl-Hexyl, para cada una de ellas se inyectó el compuesto a una

concentración de 1000 ng/mL en metanol, modificando la proporción y flujo de fase móvil. Para establecer el volumen de inyección se inyectó el compuesto a una concentración de 1000 ng/mL en las condiciones de fase móvil y columnas establecidas, a los siguientes volúmenes: 5, 10, 15 y 20 μ L.

Una vez establecidos los parámetros cromatográficos y la señal producida mostró ser repetible y reproducible se realizaron modificaciones a los parámetros de inter-fase: nebulizador, voltaje de capilar, temperatura del gas de asiento, temperatura de gas de lavado y presión de fragmentor, como se muestra en el cuadro 6. Se evaluó el área obtenida al variar cada parámetro especificado.

Cuadro 6. Serie de experimentos para establecer los parámetros espectrométricos óptimos de detección.

Experimento	Fragmentor (V)	Temperatura de gas secado ($^{\circ}$ C)	Voltaje de Capilar (V)	Temperatura de gas de lavado ($^{\circ}$ C)	Nebulizador (psi)
1	175	350	2500	350	40
2	100	350	2500	350	40
3	300	350	2500	350	40
4	175	350	3500	350	40
5	175	200	3500	350	40
6	175	100	3500	350	40
7	175	350	2500	200	40
8	175	350	2500	100	40
9	175	350	2500	350	50

5.6.5 **Extracción de la Cas III-ia en sangre humana**

5.6.5.1 **Extracción en fase sólida**

Se probó el sistema de extracción en fase sólida: Strata-X (phenomenex) utilizado por Osnaya 2015 modificando parámetros como el volumen de muestra así como, el volumen de HFBA de lavado de 500 a 1000 μ l.

Se prepararon muestras de 1000 ng/ml en agua y fueron agregadas al cartucho seleccionado, obteniéndose el cromatograma correspondiente. Con el resultado obtenido, se procedió a optimizar la metodología de extracción para mejorar el resultado, con base en el área. La metodología reportada en la literatura trabajaba con la cantidad de 1000 μ l de muestra (plasma + Cas III-ia) por lo tanto se optimizó el método llevándolo a 500 μ l a la cual se le agregaron 500 μ L de HFBA acuoso al 5%, posteriormente se agitó en el vortex durante 10 s y se procedió a tratarla por medio del cartucho de extracción strata-X, modificando las condiciones de lavado y elución como se muestra en el cuadro 7:

	Método preestablecido	Acondicionamiento
Acondicionamiento	2mL Metanol 2mL HFBA 5%	2ml Agua 1ml de Metanol
Muestra	1mL	500 μ l
Lavado	2mL Metanol al 5% acuoso	1 ml de HFBA 5%
Elución	1 mL Metanol	1ml de Metanol

Cuadro 7. Metodología y acondicionamiento de extracción fase sólida

Con los resultados obtenidos, se valoró la capacidad de la extracción utilizando como parámetro discriminante el área. Posteriormente, se seleccionó las mejores condiciones el sistema, para ser probadas en método (Casiopéina III-ia en sangre). En este caso se realizó una prueba en 2 matrices biológicas, en plasma y en sangre humanos.

En cada una de las muestras realizadas se siguió el procedimiento previo a la extracción que a continuación se muestra en la figura 5 utilizando como agente precipitante HFBA 5% (Osnaya 2015):

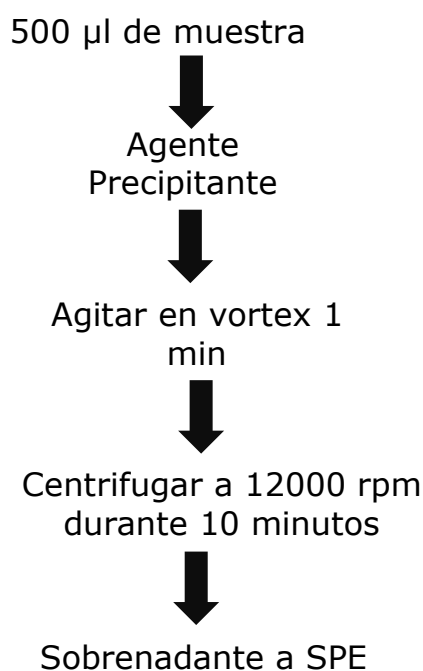


Figura 5. Procedimiento de tratamiento previo a la extracción por fase sólida. Precipitación de proteínas.

El producto de la elusión fue evaporado hasta sequedad en sistema de concentración Vacufuge (Eppendorf), el botón resultante se reconstituyó

en 100 μ L de fase móvil la cual fue posteriormente inyectada al sistema cromatográfico.

La prueba se repitió por triplicado y el resultado fue analizado para corroborar la efectividad del procedimiento de extracción en la matriz y con las nuevas condiciones dadas.

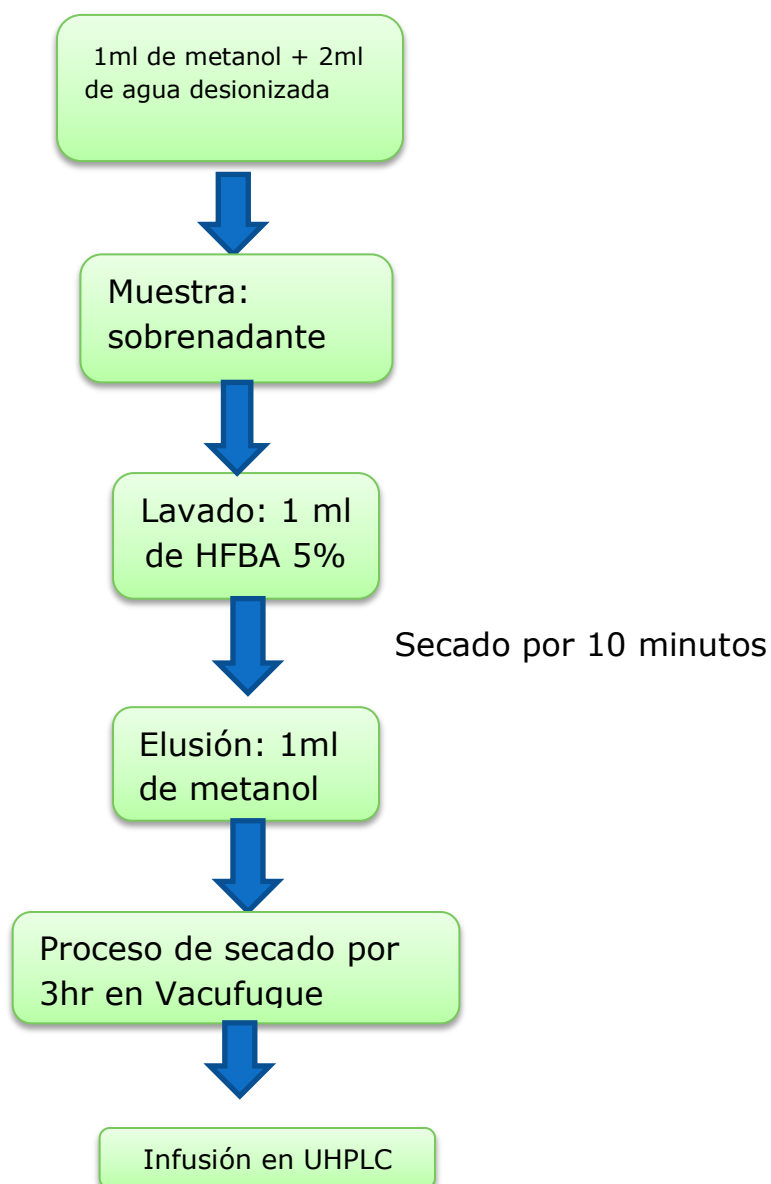


Figura 6. Metodología en sistema de extracción en fase solida

5.6.5.2 **Supresión iónica**

Con la intención de conocer de efecto que la matriz biológica pudiera tener en la respuesta de la CasIII-ia®, se extrajo un lote de sangre de un donador sano y con los criterios de aceptación requeridos (donadores masculinos bajo ningún tratamiento medico ni bajo influencia de alcohol ni drogas durante varios días y que tuvieran edades alrededor de los 20-30 años). La sangre se agregó a tubos con anticoagulante (heparina) , se centrifugó durante 10 minutos a la velocidad de 10 rpm y se tomó el sobrenadante.

Se preparó una solución de 10 µg/mL de CasIII-ia® en fase móvil, conjuntamente un blanco de plasma procesado según la metodología de extracción optimizada. La solución del analito fue infundida directamente por medio de infusor al espectro y el blanco de plasma fue inyectado simultáneamente por medio del sistema cromatográfico, tal como se muestra en la figura 7. Se obtuvo el espectro correspondiente.

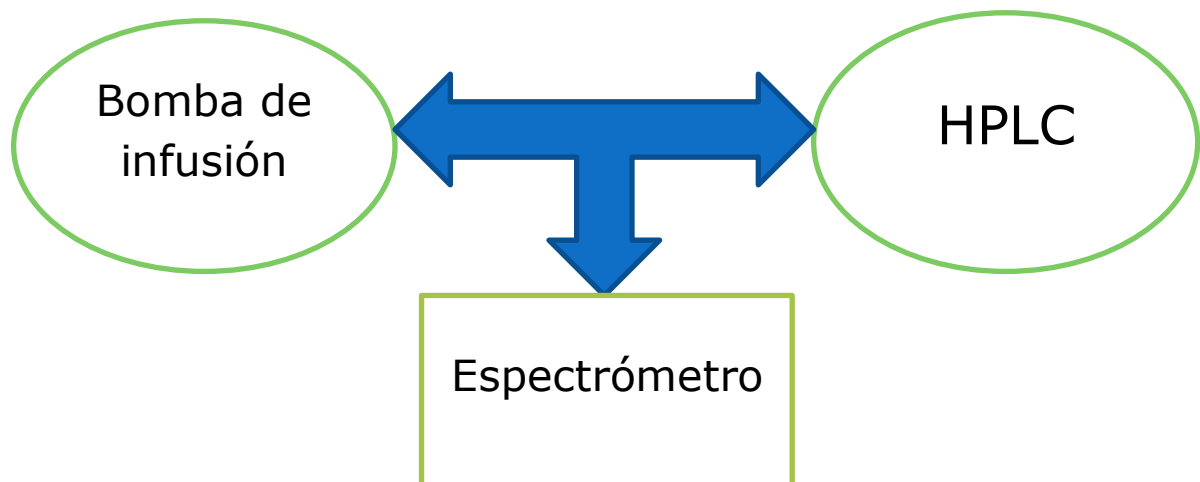


Figura 7. Esquema de prueba de supresión iónica para evaluar el efecto matriz

5.6.5.3 ***Adecuabilidad del sistema***

Para evaluar la calidad de la respuesta analítica, se inyectó por sextuplicado una muestra de CasIII-ia® a una concentración de 10 µg/mL preparada en fase móvil, se evaluó el %C.V. de las respuestas obtenidas.

5.6.6 ***Cuantificación de la Casiopeína III-ia en plasma humano.***

5.6.6.1 ***Curvas de calibración en sistema y en plasma***

Debido a que se realizó una optimización en el volumen de muestra utilizado con respecto al reportado por Osnaya [Osnaya, 2015], fue necesario realizar una serie de curvas de calibración tanto en sistema (agua) como en la matriz biológica (plasma) para demostrar que con la modificación no se afecta el funcionamiento del método. Se elaboraron tres curvas de calibración tanto en agua como en plasma a las concentraciones de 25,100, 150, 500, 800,1000 ng/ml.

5.7 **Estudio de biodistribución sangre-plasma (kb/p)**

5.7.1 **Pruebas de lisis de eritrocitos**

Con el objetivo de extraer el compuesto de los eritrocitos en la sangre y con ello calcular la cantidad de Casiopeína III-ia® que se retiene y la que no adheridas a estas células, se probaron distintos métodos de lisis celular para eritrocitos. Se extrajeron 50 ml de 3 lotes diferentes sangre humana de donadores que cumplieran con los criterios de inclusión para el proyecto mencionados en el cuadro 10. Se preparó una solución de CasIII-ia® 1000 µg/ml (solución stock 1) de esta se tomó la cantidad necesaria (300 µl) y se agregó a un matraz de 10 ml para después llevarse al aforo y así tener una solución de 30 µg/ml en agua (stock 2).

5.7.2 **Ciclos de congelación descongelación**

Del stock 2 se agregaron 50 µl a un tubo eppendorf de 2 ml y posteriormente se añadieron 1450 µl de sangre total, se le dio una agitación suave durante 20 segundos para obtener una solución final con un volumen de 1.5 ml a la concentración de 1000 ng/ml. Las muestras preparadas se sometieron a un baño de hielo al cual se le adicionaron 50 ml de acetona con la intención de tener una menor temperatura y se fueron modificando las condiciones de los ciclos como se observa en el cuadro 8, para saber con cuales se podía tener una mejor respuesta en la señal de Casiopeína III-ia.

Cuadro 8. Experimentos correspondientes a los ciclos congelación-descongelación

Condiciones	Tiempo de ciclo	No. de ciclos
1	15 min	3
2	5 min	3
3	20 min	3
4	15 min	2
5	20 min	2

Después de cada ciclo cada una de las muestras se introdujo a un baño de agua a 60 grados Celsius durante 3 minutos hasta llegar a temperatura ambiente para luego regresar al baño de hielo en las condiciones correspondientes de cada experimento. Al finalizar el proceso de congelación – descongelación las muestras se centrifugaron durante 10 min a la velocidad de 10000 rpm y del sobrenadante obtenido se tomaron 500 µl de cada uno, a los cuales se les agregó la cantidad de 500 µl de agente precipitante de proteínas (HFBA 5%). Cada uno de los eppendorf con plasma y HFBA 5% se agitó durante 10 s en vórtex y se centrifugaron a la misma velocidad y tiempo que anteriormente. Al sobrenadante se le realizó el procedimiento de extracción en fase solida (SPE) completo y se inyectó después de ser secado y posteriormente reconstituido en 100 µl de fase móvil.

Se realizó simultáneamente y con el mismo objetivo que las pruebas mencionadas anteriormente, una serie de muestras con el mismo procedimiento de preparación (Figura 8) con la diferencia de que el HFBA 5% agregado después de los ciclos en las pruebas anteriores, en esta serie la solución mencionada se agregó antes de iniciar los

procesos de congelación-descongelación. Los resultados se observaron y de acuerdo a los cromatogramas se escogió el método más adecuado.

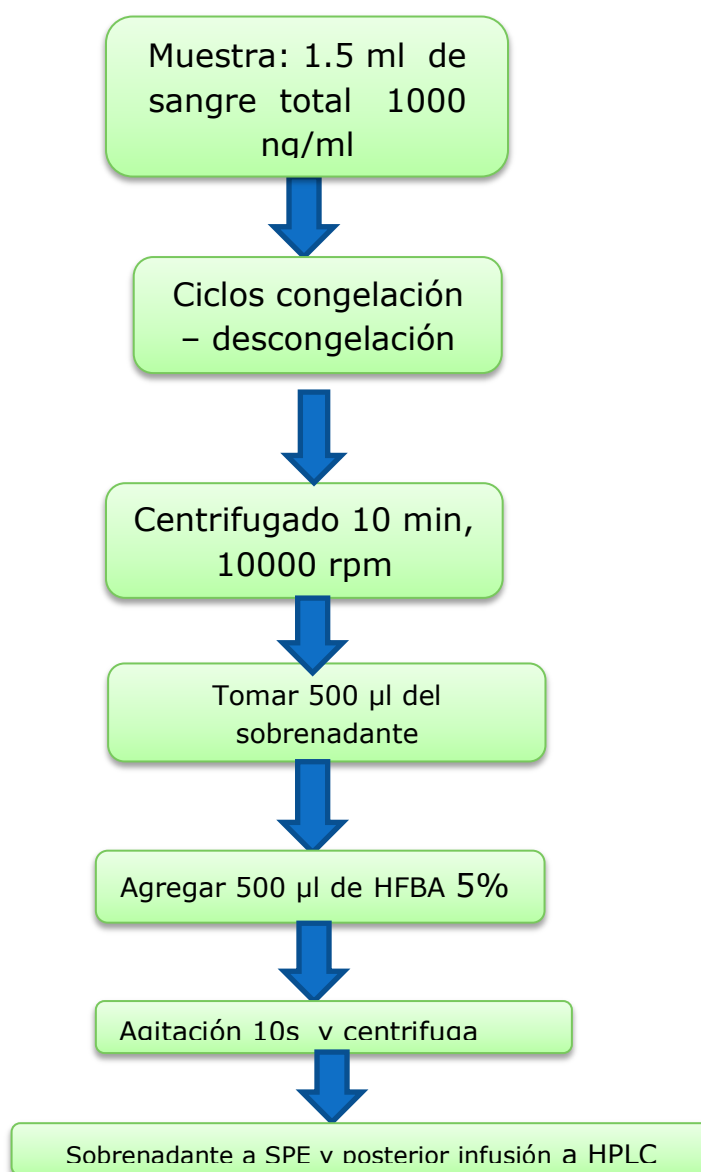


Figura 8. Esquema de metodología para lisis por ciclos de congelación- descongelación

Después de ser analizados los resultados y comprobado que el procedimiento 1 de lisis celular es en el que se obtienen los mejores resultados ya que hay mayor respuesta después de todo el proceso y que es reproducible, se procedió a la realización de pruebas para asegurar que la metodología de extracción realizada anteriormente era igualmente funcional en sangre, para esto se elaboraron 3 muestras a la concentración de 1000 ng/ml de Cas III-ia® en sangre total a las cuales se les dio el tratamiento descrito en el procedimiento 1 y posteriormente se sometieron al proceso de extracción en fase sólida para después ser inficionadas al HPLC-MS.

Una vez que se confirmó el resultado de SPE para esta técnica se procedió a la realización de una curva de calibración utilizando el procedimiento 1 de lisis celular por el método de congelación-descongelación. La curva de calibración se realizó de la manera que se muestra en el cuadro 9;

Cuadro 9. Curva e calibración en sangre

	Solución de trabajo (µg/mL)	Alícuota estándar (µL)	µL de muestra	µL de sangre fresca	Concentración final (ng/mL)
1	10	15.0	1500	1485	25
2	30	5.0	1500	1495	100
3	30	7.5	1500	1492.5	150
4	30	17.5	1500	1482.5	350
5	30	25.0	1500	1475	500
6	30	40.0	1500	1460	800
7	30	50.0	1500	1450	1000

5.7.3 **Recobro de la técnica de lisis**

Para poder saber la efectividad del procedimiento de lisis es decir el porcentaje de Cas III-ia® que se libera de las células con el proceso de rompimiento celular, se realizaron 6 muestras agregando 15 µl de una solución stock de 1000 µg/ml y llevándose a 1500 µl con sangre total para tener a cada una de ellas a una concentración de 10 µg/ml. Simultáneamente se prepararon 3 soluciones con la misma concentración pero en sistema (en fase móvil). De estas preparaciones, 3 de las que fueron elaboradas en sangre, se sometieron al procedimiento de congelación-descongelación mientras que a las restantes no se les aplicó. Cuando las tres primeras muestras terminaron los ciclos, las 9 preparadas se centrifugaron durante 10 min a la velocidad de 10000 rpm y se tomaron 500 µl del sobrenadante para la extracción en fase sólida y su posterior infusión a sistema cromatográfico. El recobro fue calculado con la ecuación mostrada en la figura 9:

$$\text{Recobro del metodo analitico} = \frac{\text{Respuesta en matriz biologica} \times 100}{\text{Respuesta en sistema}}$$

Figura 9. Ecuación para cálculo de recobro

5.7.4 ***Lisis de eritrocitos con HFBA***

Se agregaron 966.6 μl de sangre total y se pusieron en tubo eppendorf de 2 ml después se tomaron 33.3 μl del stock 2 y se pusieron en el mismo tubo eppendorf de 2 ml para tener una solución final con un volumen de 1000 μl a la concentración de 1000 ng/ml , con el mismo procedimiento se realizaron ocho muestras.

Para observar la influencia del medio ácido del HFBA en la ruptura de los eritrocitos en la sangre para la liberación de Casiopeína III-ia se agregó a cada una de las muestras preparadas anteriormente la cantidad y concentración de HFBA mostradas en el cuadro 10 y se agitó suavemente durante 20 s, las muestras se dejaron reposar durante 10 minutos. Pasado el tiempo de reposo se procedió a centrifugar cada uno de los tubos eppendorf trabajados a la velocidad de 10000 rpm durante 10 minutos y del sobrenadante resultante se tomaron 500 μl los cuales se llevaron al proceso de extracción (SPE).

Cada una de las muestras que fueron eluidas después de la extracción en fase sólida, se introdujeron en concentrador a la temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 horas para lograr su completa sequedad. A cada muestra seca se le reconstituyó en 100 μl de fase móvil y se inyectó a en sistema cromatográfico.

Cuadro 10. Experimentos realizados para lisis con HFBA

Experimento	Volumen HFBA(μ l)	Concentración (%)
1	500	5
2	500	8
3	1000	5
4	1000	8
5	1000	10
6	500	10
7	750	10

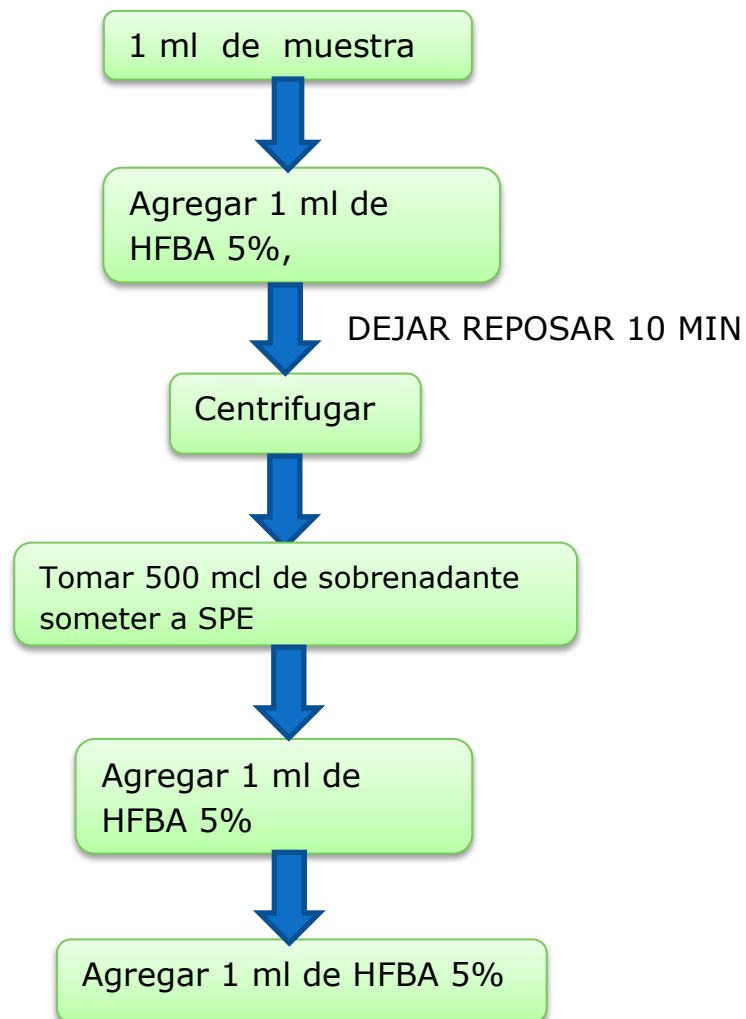


Figura 10. Esquema de lisis con ácido

Posteriormente de comprobado el funcionamiento de la metodología de extracción en esta técnica, con el objetivo de observar si con este procedimiento se respetaba el mismo comportamiento que hasta ahora se había observado en la Cas III-ia (picos cromatográficos con forma gaussiana y tendencia lineal) se procedió a realizar una curva de calibración con las mismas concentraciones mostradas en la tabla anterior.

5.7.5 *Estudio del coeficiente de partición sangre/plasma*

Se seleccionaron 3 donadores de sangre sanos. Los datos demográficos de los voluntarios se muestran a continuación en el cuadro 11:

Cuadro 11. Características de donadores de sangre

Sexo	Edad	Peso (Kg)	Medida (m)
Masculino	21	63	1.68
Masculino	23	80	1.69
Masculino	26	81	1.70

Se seleccionaron donadores que no se encontraban bajo ningún tratamiento médico ni consumieron bebidas alcohólicas durante varios días anteriores al estudio.

El procedimiento consistió en extraer de cada individuo la cantidad de 150 ml de sangre en tubos vacutainer que contenían como anticoagulante heparina. Cada lote se dividió en 3 partes en frascos estériles y destinados a distintas partes del experimento como se muestra en el cuadro numero 12:

Cuadro 12. División de sangre total. Forma en la que se dividió cada lote de sangre

Sangre	Volumen	Destino
A)	68 ml	Plasma de referencia
B)	23 ml	Plasma con Casiopeína
C)	20 ml	Plasma de Curva de calibración

La sangre de cada individuo fue extraída en ayuno y se le dio el mismo tratamiento de manera simultánea que a continuación se explica cuidando las condiciones de higiene y tratamiento adecuado en cada lote.

Se preparó una solución Casiopeína III-ia® a la concentración de 1000 µg/ml (stock 1) en agua desionizada de la cual se tomó la cantidad necesaria (30 µl) para tener una solución de 10 ml a la concentración de 3 µg/ml (stock 2) y del stock 1 se tomaron 200 µl los cuales se llevaron a 10 ml para una solución la concentración de 20 µg/ml (stock 3)

5.7.5.1 **A.-Preparación de Casiopeína III-ia en plasma (referencia)**

La sangre se centrifugó a 12000 rpm a la temperatura de 37 °C durante 12 min y se obtuvo el plasma en tubo eppendorf de 2 ml. El plasma obtenido se dividió en 3 partes iguales de 22.6 ml cada una y se cargó cada parte con Casiopeína III-ia® a las concentraciones de 50, 350, 600 ng/ml respectivamente de los stocks preparados inicialmente como se muestra en la tabla 13. Se incubaron en un baño con agua a 37°C. Cuando se llegó a la temperatura esperada se tomó la primera muestra de 1.5 ml de sangre de cada una de las partes y se sometieron al proceso completo de extracción en fase sólida mencionado anteriormente. El procedimiento desde la toma de 1.5 ml de plasma de cada parte se repitió cada hora durante 4 horas.

Tabla 13. Trabajo en plasma de referencia

Sol. Stock utilizada	Alícuota (µl)	Volumen final(ml)	Concentración(ng/ml)
Stock 2	376.6 µl	22.6 ml	50
Stock 3	395.5 µl	22.6 ml	350
Stock 3	678.0 µl	22.6 ml	600

5.7.5.2 **B.- Preparación de las muestras de sangre con Casiopeína III-ia®**

La sangre completa se dividió en 3 partes iguales (7.6 ml c/u) y se cargó con Casiopeína III-ia® necesaria como se muestra en el cuadro

14 para tener 3 soluciones de sangre total a las concentraciones de 50, 350, y 600 ng/ml cada una. Cada parte se llevó a 37 °C en baño de agua después se tomó la cantidad de 1.5 ml de sangre de los frascos, se centrifugo a 12000 rpm por 12 min y se tomaron 500 µl de plasma obtenido, el cual fue sometido al procedimiento completo de extracción en cartucho. El procedimiento desde la toma de 1.5 ml de sangre completa de cada parte de sangre se repitió cada hora durante 4 horas.

Cuadro 14. Trabajo en plasma cargado con Cas III-ia®

Sol. Stock utilizada	Alícuota(µl)	Volumen final(ml)	Concentración(ng/ml)
Stock 2	116.6 µl	7.6 ml	50
Stock 3	133.0 µl	7.6 ml	350
Stock 3	228.0 µl	7.6 ml	600

5.7.5.3 C. plasma para curva de calibración

Se optimizó la metodología utilizada para la cuantificación de Casiopeína III-ia® reportada en la literatura que describe una técnica que utiliza 1 ml de plasma y se mejoró utilizando 500 µl de este fluido.

La sangre de cada uno de los individuos se centrifugo a 12000 rpm durante 12 min y se obtuvo el plasma correspondiente con el cual se hizo una mezcla. Dentro de 9 tubos eppendorf de 2 ml se agregaron las cantidades de plasma y Casiopeína III- ia® necesarias para tener 6 puntos de una curva de calibración a las concentraciones de: 25, 100, 150, 500, 800,1000 ng/ml (Figura 11) más 3 blancos (solo plasma) cada uno con 500 µl de volumen final. Cada punto se sometió al procedimiento de extracción en cartucho.

Cuando se tuvieron todas las muestras después de su extracción en fase sólida se llevaron a sequedad en Concentrador (Vacufuge plus, Eppendorf) durante 3 horas a la temperatura de 30 grados centígrados y fueron reconstituidas en 100 µl de fase móvil (70% de HFBA 40 mM / 30% Metanol HPLC). Cuando todas las muestras fueron reconstituidas luego de previos 10s de agitación vigorosa en vortex, se agregaron a insertos de 200 µl contenidos en viales de 2 ml con tapa para ponerlos en Cromatógrafo de líquidos modelo 1290 infinity marca Agilent Technologies, para su infusión en las condiciones encontradas.

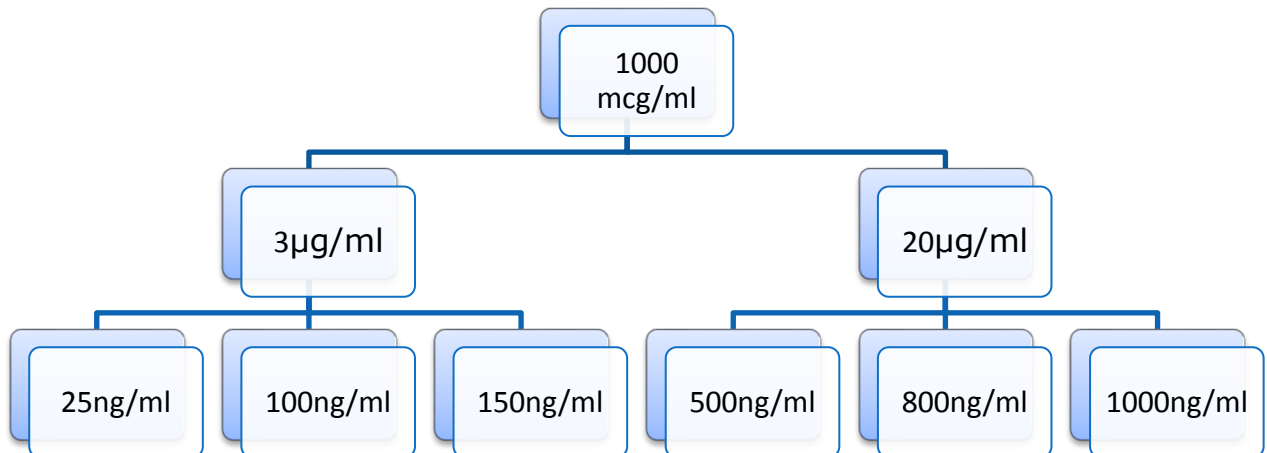


Figura 11. Esquema de preparación de curva de calibración

La constante de partición sangre plasma se calculó con la siguiente ecuación:

$$K_{RBC/PL} = \frac{1}{H} \times \left(\frac{I_{PL}^{REF}}{I_{PL}} - 1 \right) + 1$$

Figura 12. Ecuación para el cálculo de la constante de partición sangre/plasma

Dónde:

I_{PL} = Respuesta (Area del pico) para fraccion de plasma problema

H = Hematocrito (0.47)

I_{PL}^{REF} = Respuesta (Area del pico) para fraccion de plasma de referencia

- * Se le denomina plasma de referencia a la cantidad de plasma que se carga con Casiopeína III-ia a las concentraciones requeridas después de ser extraída de la sangre total.
- * Se le denomina plasma problema al plasma que se extrae de la sangre total previamente cargada con Casiopeína III-ia a las concentraciones requeridas.

6 RESULTADOS Y ANALISIS

6.1 Desarrollo y optimización de la metodología

6.1.1 Ensayos en metanol /agua

Los iones formados por la CasIII-ia® en metanol se muestran en la Figura 13. Se puede observar que la señal del ion 346.07 m/z es correspondiente al peso de la estructura completa del analito. Por otro lado también es posible apreciar una señal 247.02 m/z que corresponde a bupiridina unida al cobre, fragmento del analito.

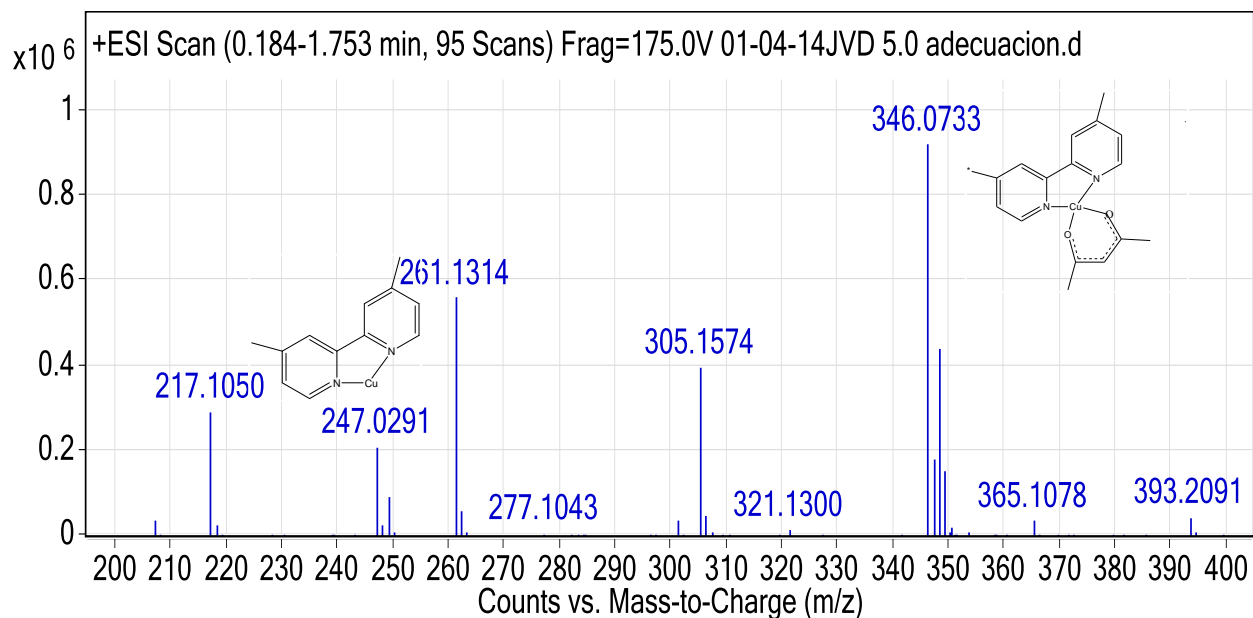


Figura 13. Espectro de Casiopeína III-ia® en metanol. B Espectro de fragmentación del ion 346.07 m/z.

Los resultados obtenidos permitieron la elección del ion de cuantificación, el fármaco deberá ser cuantificado de forma inalterada en

la matriz biológica, por ello se eligió realizar pruebas de retención con el ion 346.07 m/z.

Para las pruebas de retención se establecieron las condiciones a partir de los datos reportados por Fuentes 2005; Columna C18, fase móvil metanol/fosfatos pH 6.1, 0.01M (4:6) para cuantificación en plasma, En el caso de los fosfatos tuvieron que ser sustituidos ya que no son compatibles con el sistema de detección por acoplamiento de masas, por lo tanto para llegar la condición necesaria de pH, se utilizó una solución amortiguadora de acetatos (ácido acético/acetato de sodio).

En el caso del espectro de masas la proporción (4:6) metanol/buffer fue la que mostró un espectro más adecuado ya que lograron observarse tanto el ion correspondiente a la biperidina como el de la estructura completa del compuesto.

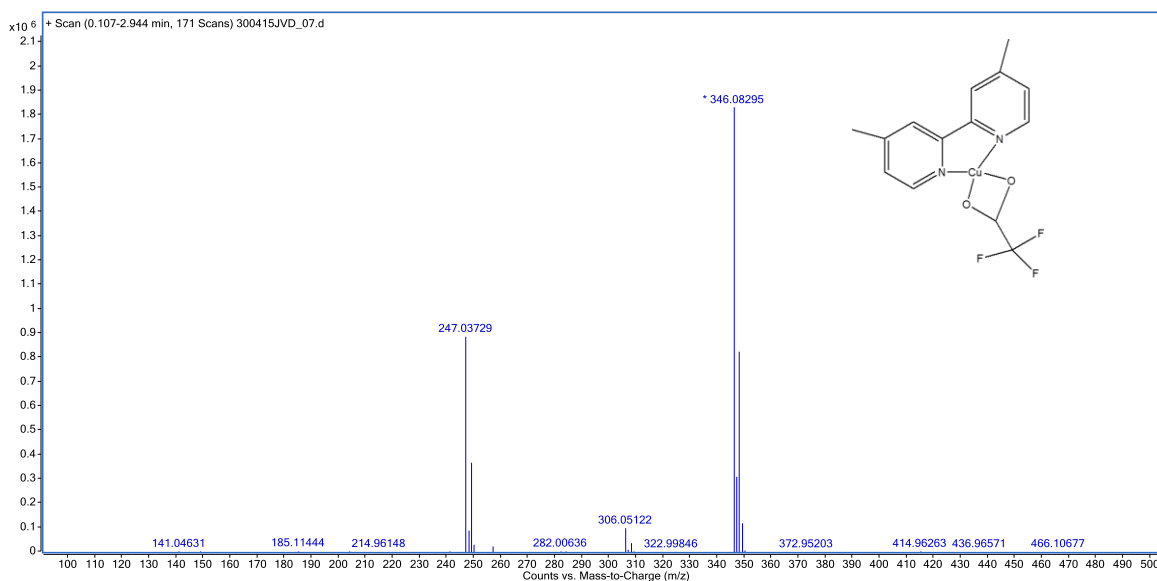


Figura 14. Espectro de masas de la muestra inyectada en columna Eclipse C8, metanol/buffer (4:6) y flujo de 0.8 mL/min.

Después de haberse realizado la inyección en la columna C8 fase móvil metanol/buffer acetatos (4:6) a un flujo de 0.8 mL/min, se obtuvo una

señal la cual tuvo un tiempo de retención de 2.7 min pero mostró un deterioro en la simetría y área después de alrededor de 15 inyecciones por lo que fue imposible iniciar la optimización del ión por no tener reproducibilidad. Debido a que las condiciones adaptadas por Fuentes [Fuentes 2005] no fueron viables a pesar de los ajustes aplicados en este proyecto, se recurrió a tomar como base inicial las condiciones reportadas en el trabajo realizado por Osnaya 2015.

Ya que la Casiopeína III-ia muestra un efecto desordinante en la fase móvil metanol/agua [Osnaya 2015] fue necesaria la modificación de la molécula para mejorar tanto su retención como su estabilidad.

6.1.2 **Estudios en presencia de modificadores de fase**

Con el objetivo de mejorar la retención en fase reversa de la Cas III-ia® se probaron dos pares iónicos: HFBA y TFA. Como puede observarse en la figura 15, la reacción interfase efectuada con TFA da como resultado un ion de peso molecular 360.01 m/z correspondiente a la interacción entre una molécula de CasIII-ia® y una molécula de TFA.

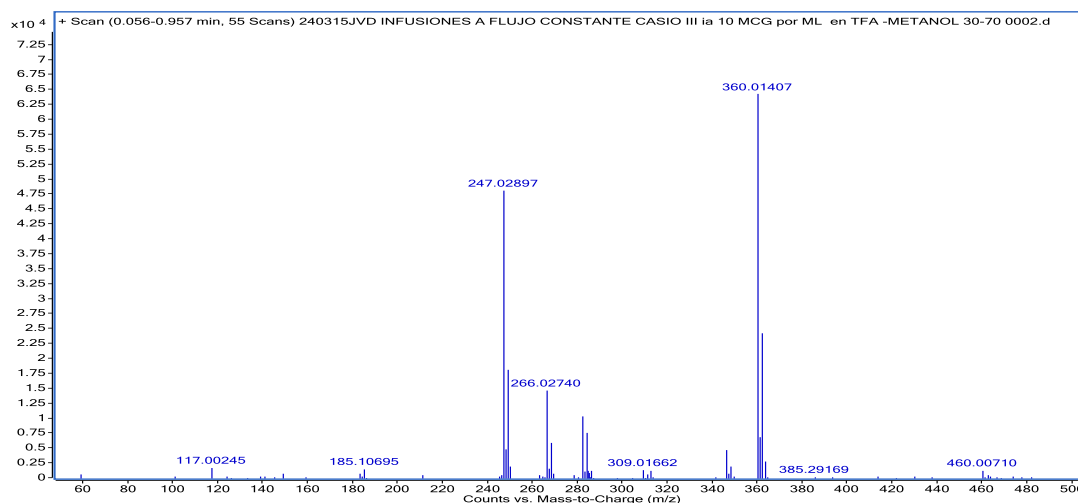


Figura 15. Espectro de la reacción entre Casiopeína III-ia® en TFA

En la figura 16 se observa el espectro de la reacción interfase efectuada entre el analito y HFBA, el ion formado tiene un peso molecular de 460.00689 m/z y corresponde a la estructura mostrada.

Aun cuando en ambos espectros se observa la presencia del ion 346.07 m/z correspondiente al analito inalterado esto puede deberse a la reacción incompleta consecuencia de la inyección directa.

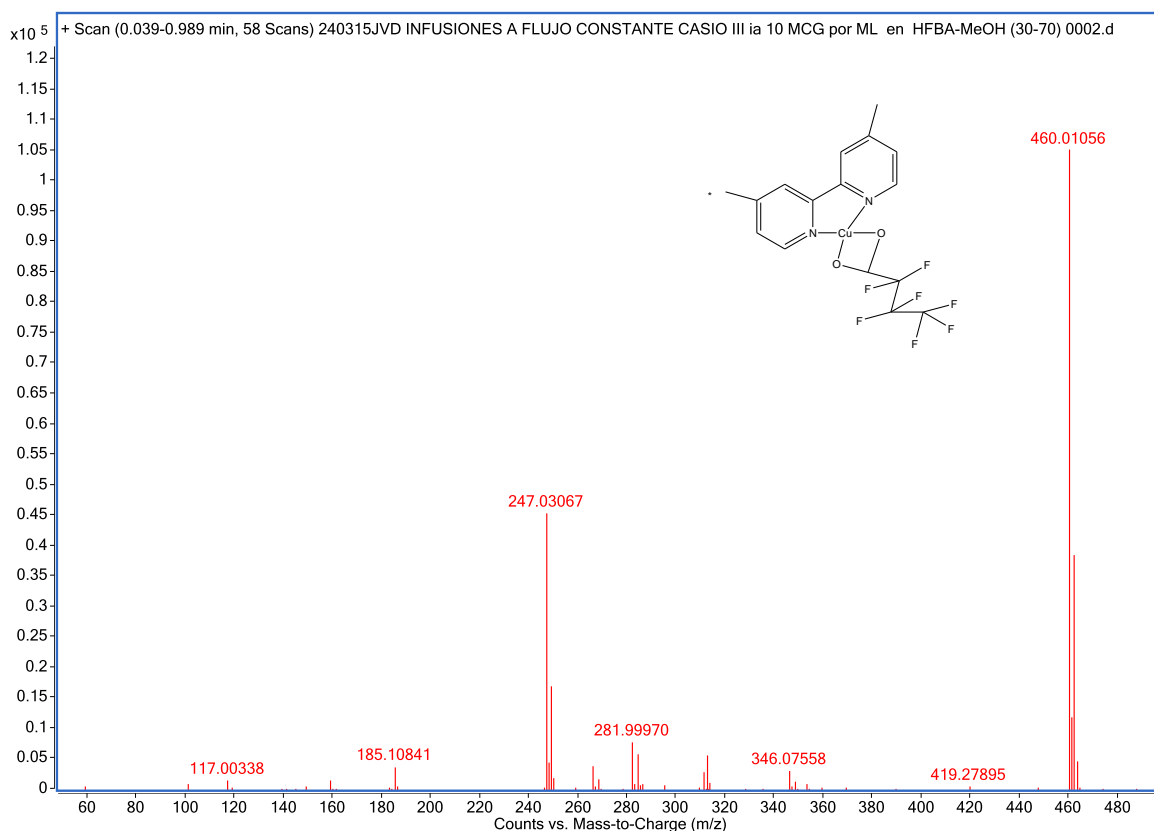


Figura 16. Espectro de la reacción entre Casiopeína III-ia en HFBA

Por otro lado existe evidencia con la presencia del ión 247.02 m/z (masa correspondiente a la fracción de bipyridina unida al cobre) de la ruptura del compuesto al estar en contacto con este tipo de moléculas y que es favorecida según la concentración del par iónico y tiempo de reacción.

El ion obtenido de la reacción efectuada con TFA mostró una abundancia menor al obtenido por la reacción con HFBA a la misma concentración del par iónico esto debido a una mayor afinidad de la CasIII-ia® por el HFBA.

En métodos de cuantificación previos desarrollados para una molécula de la misma familia, la Casiopeína II-gly®, reportado por Cañas en 2013, se utilizó como par iónico el HFBA para su cuantificación en plasma, arrojando buenos resultados en cuanto a retención y reproducibilidad, por lo que se procedió a realizar las pruebas de retención correspondientes.

6.1.3 *Parámetros cromatográficos y espectrométricos del ion de cuantificación 460.01 m/z*

Los mejores resultados se obtuvieron de la combinación de metanol con HFBA 40 mM. Se utilizó una columna Eclipse Plus C8 según lo reportado en la literatura. Por medio de la modificación en la proporción de fase móvil se determinó que la mejor es la que está compuesta de la siguiente manera; 7:3 metanol/HFBA 40 mM ya que al aumentar la cantidad acuosa de fase móvil (HFBA) la señal disminuye y cuando se aumenta la cantidad de metanol el compuesto se retiene por demasiado tiempo provocando que la señal se divida. Por los datos reportados se escogió el volumen de inyección de 20 µl ya que se obtuvieron señales satisfactorias. El flujo elegido fue de 0.8 ml/min partiendo de la presión de trabajo adecuada de la columna y que al disminuir el flujo la señal resultante se deteriora. Como se muestra en el cuadro las mejores

condiciones en el detector fueron las obtenidas el experimento 1. Por otro, lado valores mayores en el voltaje del fragmentor, capilar y presión de nebulizador disminuye el área de la señal producida. En cambio si las temperaturas de gas de lavado o secado son disminuidas el área de la señal también es modificada drásticamente.

Cuadro 15. Resultados de optimización de parámetros espectrométricos.

Experimento	Fragmentor (V)	Temperatura de gas secado (°C)	Voltaje de Capilar (V)	Temperatura de gas de lavado (°C)	Nebulizador (psi)	área
1	175	350	2500	350	40	16643700.7
2	100	350	2500	350	40	198706.4
3	300	350	2500	350	40	386241.4
4	175	350	3500	350	40	352530.4
5	175	200	3500	350	40	232116.35
6	175	100	3500	350	40	154333.4
7	175	350	2500	200	40	201524.52
8	175	350	2500	100	40	175647.5
9	175	350	2500	350	50	361193.7

6.1.4 *Condiciones instrumentales óptimas*

Las condiciones cromatográficas y espectrométricas óptimas para la cuantificación de la Casiopeína III-ia® se muestran en los cuadros 16 y 17.

Cuadro 16 . Condiciones cromatográficas óptimas.

Parámetro	Condición
Fase móvil	Metanol/ HFBA 40mM (7:3)
Columna cromatográfica	Eclipse Plus C8
	4.6x150mm 3.5µm
	PN 959963-906
Pre-columna	Eclipse Plus C8
Temperatura de columna	25 °C

Velocidad de flujo	0.8 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de retención	CasIII-ia 2.7 min
Tiempo de corrida	4 min
Detector	Q-TOF
Temperatura de inyector	15°C

Cuadro 17. Condiciones espectrométricas óptimas. Detector Q-TOF.

Parámetro	Condición
Modo de ionización	Dual AJS ESI
Polaridad	Positiva
Energía de Colisión	0V
Temperatura de gas	350°C
Flujo de gas de lavado	10 L/min
Temperatura de asiento	350°C
Flujo de gas de asiento	10 L/min
Fragmentor	175V
Nebulizador	30psi
Voltaje capilar	2500 V
Nozzle	1000 V
Skimmer	65 V
Rango de masa	100 -500 m/z
Ion de cuantificación	460.01 m/z

Debido a la presencia de un efecto de acarreamiento reportado en trabajos realizados (carryover) la cual incrementa la señal generada en

cada inyección, fue necesaria la utilización de lavados entre cada corrida.

Es importante resaltar que los lavados inter-corrida se realizaron en las mismas condiciones de análisis, inyectando el volumen programado de fase móvil entre cada muestra.

6.2 Extracción de la Cas III-ia en sangre humana

6.2.1 Extracción en fase sólida

El sistema strata-X posee una resina del tipo polimérica ideal para la extracción de una gran variedad de compuestos, existiendo interacciones del tipo hidrofílico y dipolo-dipolo, esto aumenta la probabilidad de retención así como una elusión sencilla. En métodos anteriores, desarrollados para la CasIII-ia® se observó que estos sistemas tienen un mayor recobro, [Osnaya 2015] en condiciones similares de análisis lo cual sumado a los resultados experimentales reportados, permitió elegir el sistema Strata-X para su optimización.

En el proceso de optimizar la metodología para la extracción en el sistema Strata-X se observó que el mejor método es el descrito en la figura número 18, que al ser valorada su repetibilidad mostró un %C.V. de 1.6. Aun cuando en solución el mejor recobro fue obtenido con el analito en agua sin adición de HFBA previo, fue necesario contemplar el tratamiento de la muestra combinando dos técnicas de extracción a fin de garantizar la limpieza de la muestra y con ello la disminución del efecto de matriz. Además para mejorar la calidad de la señal y disminuir el límite de cuantificación se concentró la muestra.

El mejor recobro fue el obtenido con la precipitación de proteínas realizada con HFBA al 5%. Dando como resultado una señal tipo gaussiana, repetible y reproducible.

6.2.2 **Supresión iónica**

De forma cualitativa se puede observar en la figura 17 que durante la corrida cromatográfica (4 min) del blanco la señal del ion de cuantificación disminuye considerablemente a los 2.3 min iniciando su recuperación alrededor de los 2.7 min, justo antes del tiempo de retención del analito. Sin duda componentes del plasma afectan la ionización del compuesto, sin embargo estos poseen un tiempo de retención diferentes a la CasIII-ia® lo cual propicia la recuperación de la señal. Aun cuando esta prueba es un procedimiento rápido para constatar el efecto de matriz, es necesario efectuar las pruebas cuantitativas según marca la normatividad.



Figura 17. Cromatograma de evaluación de supresión iónica. A Señal de iones totales. B Señal de infusión de CasIII-ia®. C Señal de CasIII-ia en plasma.

En el diagrama B de la fig. 17, correspondiente a la señal de la Casiopeína se observa que existe una pérdida de señal del compuesto

de interés (Casiopeína III-ia®) alrededor de los 2.4 minutos, sin embargo al llegar los 2.8 min, cuando se mira a la Cas III-ia® se puede ver un aumento de nueva cuenta en la señal del fármaco lo cual indica que en ese tiempo la supresión se ve disminuida.

6.2.3 *Adecuabilidad del sistema*

Para cada corrida analítica se evaluó la calidad de la respuesta analítica por medio de la inyección repetida de una muestra de CasIII-ia® en sistema, como se puede observar en el siguiente cuadro el tiempo de retención tiene una variación de 0.1% y la respuesta varia 0.8% por lo que se encuentra dentro del rango de aceptación (no mayor al 2%).

Cuadro 18. Adecuabilidad del sistema

Inyección	tiempo de retención	Respuesta
1	2.715	521203.97
2	2.713	522433.02
3	2.712	523153.55
4	2.715	511052.12
5	2.714	516034.41
6	2.71	519463.11
promedio	2.71	518890.03
sd	0.0019	4604.3570
%CV	0.1	0.9

6.3 **Cuantificación de la Cas III-ia en sangre humana**

La selección del método adecuado para el cálculo de constante de partición sangre/plasma estuvo sujeta a los resultados de la optimización del proceso en plasma y el desarrollo en sangre, fue necesario ajustar las condiciones de la técnica de tal modo que se pudieran obtener resultados confiables con los dos fluidos.

6.3.1 **Metodología optimizada de extracción**

El procedimiento optimizado de extracción de la matriz consta de dos partes, la primera: precipitación de proteínas, a 500 μ L de muestra se agregó 500 μ L de HFBA al 5%, se agitó en vórtex por diez segundos y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se introdujo en el sistema de extracción por fase sólida (la segunda parte del procedimiento), según indica la figura 18.

Finalmente posterior a la elusión de la muestra en el sistema de extracción por fase sólida se concentra al vacío a 30 °C durante tres horas, para ser re-constituida en 100 μ L de fase móvil e inyectado en el sistema cromatográfico en las condiciones establecidas anteriormente.

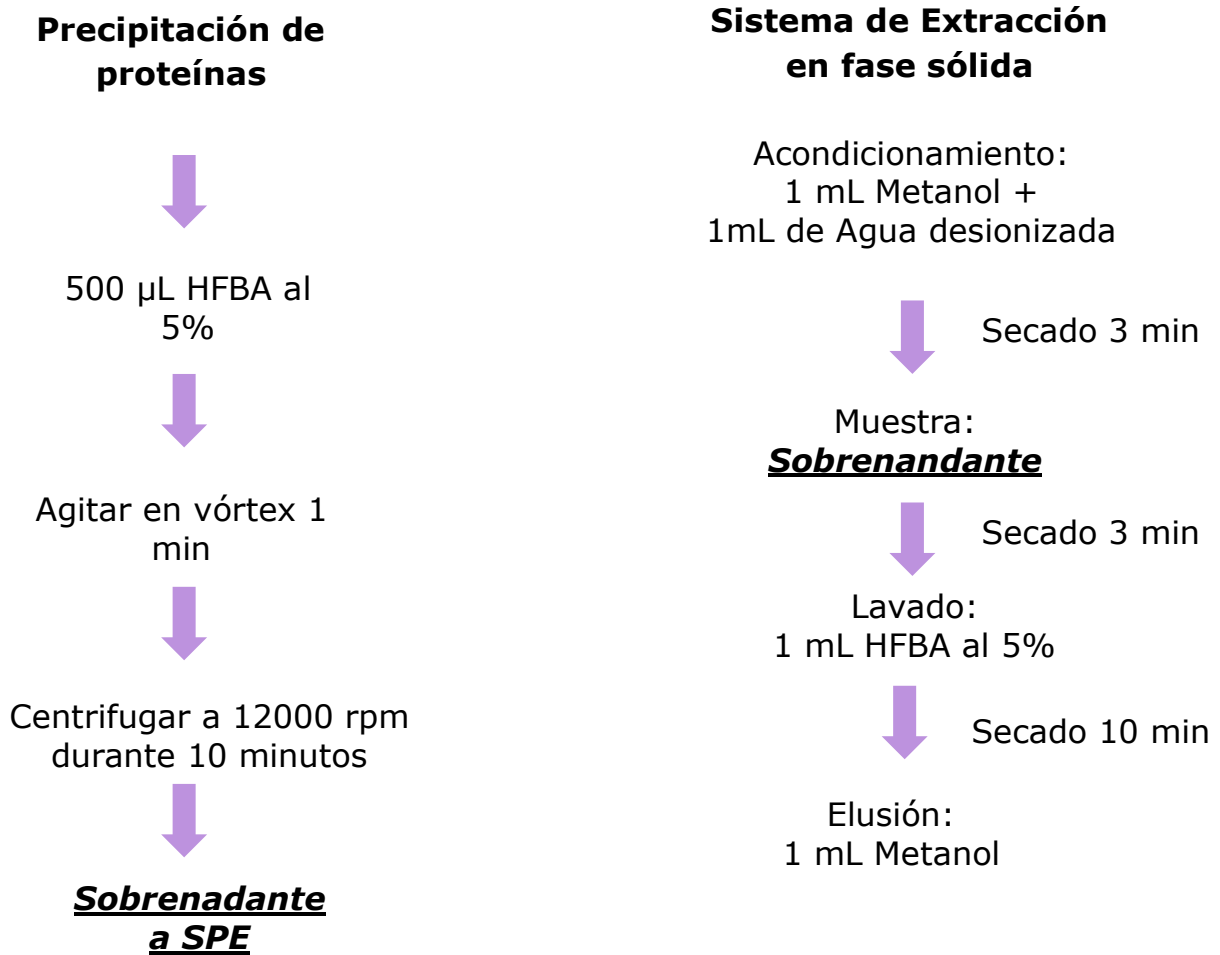


Figura 18. Metodología optimizada de extracción.

Como parte de la evaluación de la metodología de extracción y del manejo correcto de la técnica se realizaron curvas de calibración del analito en agua y en plasma, como se muestra en las figuras 19 y 20, el comportamiento tiene tendencia lineal, en los dos sistemas mencionados lo cual es una muestra clara de que no hay una influencia significativa en la matriz biológica (plasma) que pudiera afectar el comportamiento de la Casiopeína III-ia® dentro de la curva de calibración a los valores de concentración utilizados. A pesar de esto cabe mencionar que las

señales en la curva realizada en agua con respecto a las señales resultantes de la curva en plasma son mayores ya que aunque no se afecta la tendencia lineal, la matriz biológica afecta un poco la respuesta del fármaco. Con el objetivo de utilizar el modelo matemático más adecuado para las curvas, se utilizó una ponderación $1/X^2$.

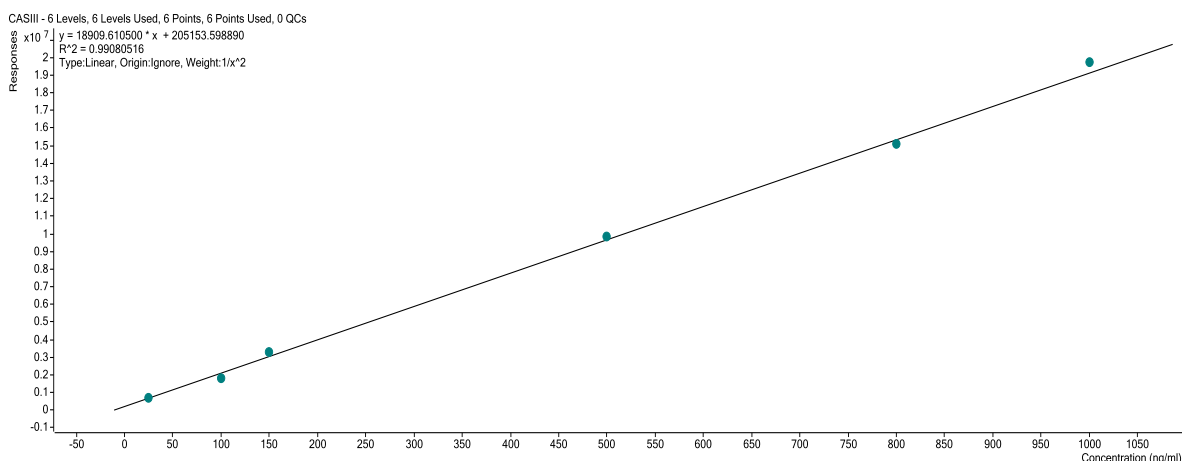


Figura 19. Curva en sistema

Conc. Teorica(ng/ml)	Curva 1			Curva 2			Curva 3		
	T.retención (min.)	Conc. experimental(ng/ml)	Respuesta	T. retencion (min.)	Conc. experimental (ng/ml)	Respuesta	T. Retención (min.)	Conc. experimental(ng/ml)	Respuesta
25	2.74	26.1259366	9014.05	2.72	25.8739244	8927.1	2.72	25.5462651	8814.05
100	2.7	93.0718045	33231.32	2.71	95.6511886	34152.29	2.72	93.0718045	33231.32
150	2.72	138.961278	49803.22	2.7	141.77682	50812.3	2.71	147.415632	52833.23
500	2.71	575.403824	207510.49	2.72	489.435823	176507.46	2.73	471.353584	169986.38
800	2.71	827.975392	298889.29	2.73	783.874274	282969.31	2.71	827.947995	298879.4
1000	2.72	1126.94053	406957.33	2.71	1072.13308	387165.43	2.72	1099.8302	397167.33
PENDIENTE	361.495863			361.524563			361.507137		

Cuadro 19a. Resultados de precisión y exactitud en curvas de calibración en plasma

Cuadro 19b. Variación de concentraciones entre curvas en plasma

Concentración(ng/ml)	Promedio	Desv. Str	CV%
25	25.85	0.30	1.12
100	93.93	1.49	1.59
150	142.72	4.31	3.02
500	512.06	55.59	10.86
800	813.27	25.45	3.13
1000	1099.64	27.40	2.49
PENDIENTE	361.52	0.0089511	0.002465

Es importante mencionar que la curva en sistema (agua) se pudo haber preparado utilizando concentraciones más altas (alrededor de 5 veces más con el objetivo de conocer el comportamiento del fármaco a concentraciones más elevadas pero debido a las cuestiones de tiempo y a que en las concentraciones utilizadas la Cas III-ia demostró no tener problemas de linealidad no se realizó dicha prueba.

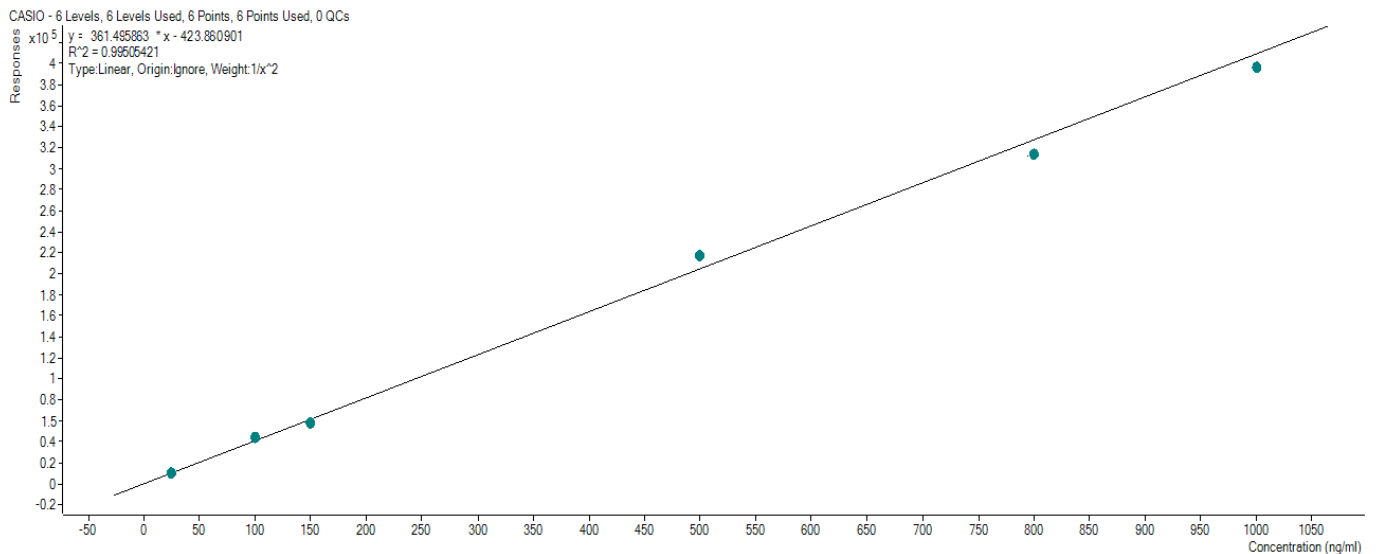


Figura 20. Curva en plasma

6.4 **Ensayo de biodistribución sangre-plasma (kb/p)**

6.4.1 **Pruebas de lisis de eritrocitos**

6.4.1.1 **Ciclos de congelación- descongelación**

Los resultados obtenidos de cada prueba (Cuadro 19) realizada para la lisis de eritrocitos en ciclos congelación-descongelación demostró una mayor eficacia en el experimento de 1, ciclos de 15 minutos donde las respuestas (áreas de pico) se observan más grandes lo cual demuestra una mayor liberación de Casiopeína III-ia® de los glóbulos rojos.

Cuadro 20. Resultados de pruebas de congelación-descongelación de sangre

Experimento	Método	Área
1	3 ciclos , 15min c/u	827798.5958
2	3 ciclos , 5 min c/u	673526.9873
3	3 ciclos , 20 min c/u	812694.5958
4	2 ciclos , 15 min c/u	534217.9326
5	2 ciclos , 20 min c/u	543723.0843

Las muestras sometidas al proceso de extracción en fase sólida tuvieron un CV% de 1.5%, por lo tanto son reproducibles y comprueban que la metodología de SPE es válida para esta técnica de lisis. La curva de calibración que se obtuvo con la mejor metodología escogida, demostró tener un comportamiento al igual que en plasma, lineal por lo tanto viable como muestra la figura 21.

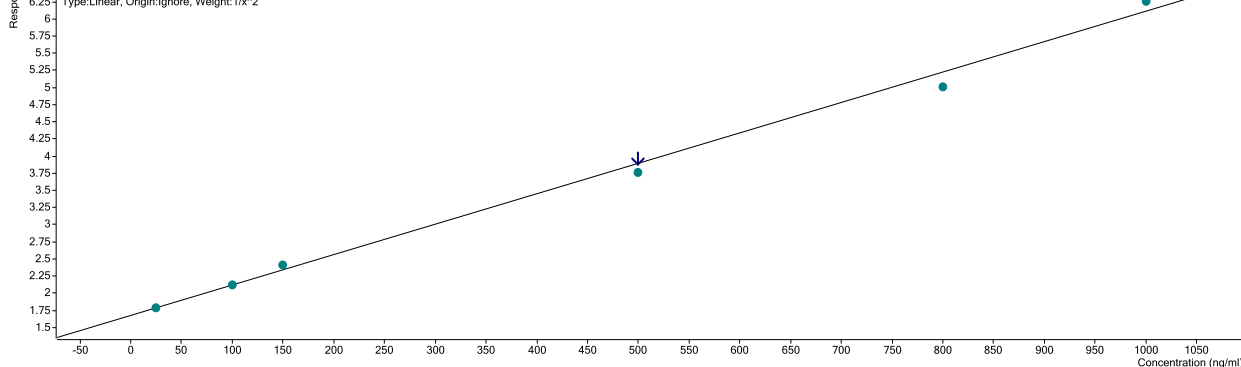


Figura 21. curva de calibración obtenida después de técnica de congelación-descongelación en sangre

6.4.1.2 Recobro de la metodología de lisis

Se puede observar que existe un recobro considerablemente mayor en el caso de la metodología sin ruptura celular.

Tabla 21. Recobros con o sin método de congelación-descongelación y en sistema

	Respuesta con métodos C-D	Respuesta sin método C-D	Respuesta Sistema
	6234811.67	11234811.7	12708642.2
	6515423.34	11315423.3	12447632.9
	6532143.76	11032143.8	12610214.3
promedio	6427459.59	11194126.3	12588829.8
Desv	167047.322	145956.526	131812.124
cv%	2.59896339	1.30386707	1.0470562
recobro	51.056847	88.9211023	

6.4.1.3 *Lisis de eritrocitos con HFBA*

Los experimentos realizados para la lisis celular por medios ácidos con HFBA demostraron una mejor ruptura de eritrocitos en el experimento 1 del cuadro siguiente obteniendo una mayor respuesta, aunque es importante resaltar que los picos obtenidos en el cromatograma demostraban un fraccionamiento en el pico lo cual lo deformó, este fenómeno fue producido probablemente por la interacción del ácido con la Casiopeína la cual al trabajar con una mayor cantidad de HFBA , en algunos casos mayor concentración que la usualmente utilizada y por un tiempo más prolongado generó un fraccionamiento mayor que el esperado de la Casiopeína III-ia®.

Cuadro 22. Respuestas de la lisis de células con HFBA

Experimento	Volumen HFBA(μ l)	Concentración (%)	Respuesta
1	500	5	6182150.32
2	500	8	5187290.18
3	1000	5	4158690.48
4	1000	8	3987432.06
5	1000	10	3101390.40
6	500	10	3090390.01
7	750	10	3102211.00

En la curva de calibración realizada con esta metodología de lisis se observó de igual manera una tendencia lineal.

Haciendo un estudio comparativo entre los métodos probados para la ruptura de eritrocitos se observa que el método en el cual se libera una mayor cantidad de fármaco de estas células es por el proceso de congelación-descongelación.

Al momento de analizar los resultados de los experimentos realizados tanto para la cuantificación del fármaco extraído de los eritrocitos por los dos métodos como con los resultados obtenidos de pruebas realizadas en plasma sin aplicar procesos de lisis, se observó que el área de los picos cromatográficos que se hicieron directamente en plasma tienen una respuesta considerablemente mayor que los picos resultantes de las pruebas de extracción del compuesto de la sangre total.

Este resultado demuestra que pudiera haber algún o algunos componentes en la sangre total como enzimas, proteínas o ácidos grasos que pudiesen estar interaccionando con la Casiopeína III-ia® alterando la estructura del fármaco y por lo tanto reduciendo considerablemente su respuesta.

Cuadro 23. Cuadro comparativo de respuestas con y sin métodos de ruptura celular

fluido	método	respuesta
Sangre total	Congelación- descongelación	6427459.59
Sangre total	Lisis con HFBA	6182150.32
Plasma	Sin lisis	11194126.3

Debido a los resultados anteriores (cuadro 23) se concluyó que el método más conveniente dado las condiciones trabajadas sería en el cual no hay una ruptura de eritrocitos que pudiera afectar la señal cromatográfica por lo tanto se eligió la metodología propuesta por Yu *et. al.* en la que se plantea un cálculo de la constante de partición sangre/plasma utilizando como matriz biológica el plasma sin romper los eritrocitos manteniendo la integridad de las células en la sangre.

6.5 **Obtención de la constante de partición sangre/plasma (Kb/p) de la Casiopeina III-ia®**

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 tienen 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.

6.5.1 **Curva de calibración**

Es importante resaltar que en este trabajo de tesis se decidió trabajar tomando algunos criterios establecidos por la FDA en cuanto a los valores mínimos en los coeficientes de variación, número de muestras en las curvas de calibración, así como parámetros para la validación de metodologías esto con el objetivo de mejorar la calidad de los resultados obtenidos.

En la curva de calibración resultante se puede observar el comportamiento lineal observado a lo largo de todo el desarrollo teniendo un tiempo de retención promedio de 2.718 minutos y una coeficiente de correlación (r) igual a 0.99705 lo cual basados en los parámetros establecidos en la FDA la cual establece por lo menos un valor de $r=0.98$, es un resultado adecuado para continuar el estudio.

Cuadro 24. Resultados correspondientes a curva de calibración en sangre donde se observa comportamiento lineal

Concentración(ng/ml)	T. retención (min.)	Concentración experimental(ng/ml)	Respuesta
25	2.71	25.61	8836.04
100	2.72	95.34	34041.18
150	2.71	136.18	48806.42
500	2.70	489.43	176505.36
800	2.720	828.28	298999.25
1000	2.73	1100.11	397268.37
Promedio	2.72		

$y = 361.499984 * x - 422.580958$
 $R^2 = 0.99411272$
 Type:Linear, Origin:Ignore, Weight:1/x^2

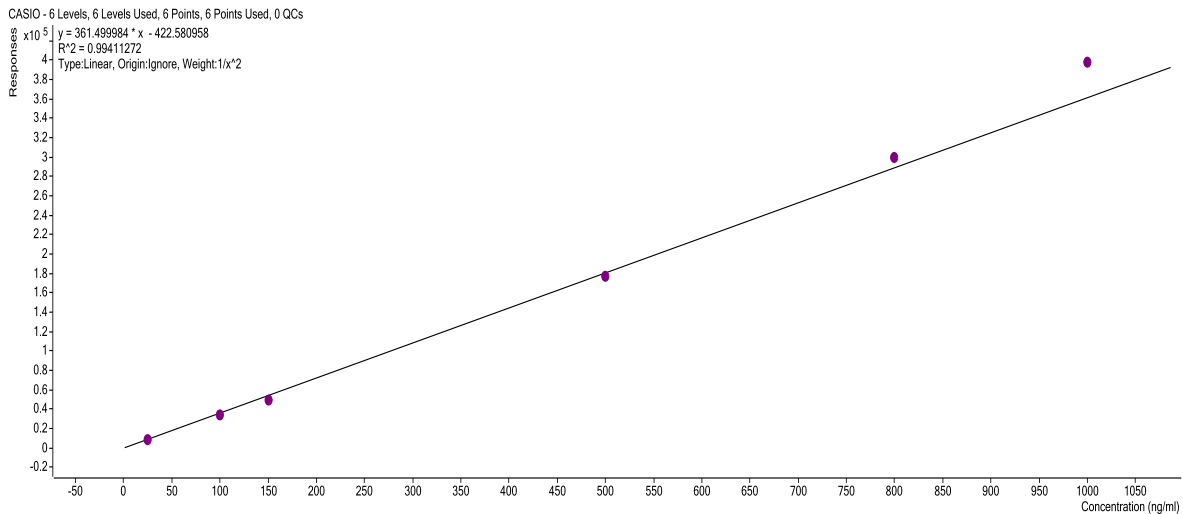


Figura 22. Curva de calibración en sangre para calculo kb/p

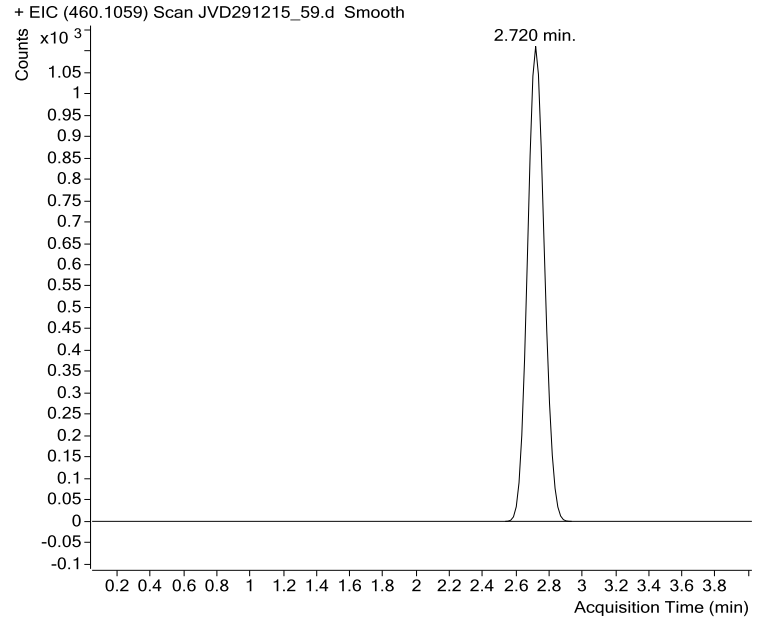
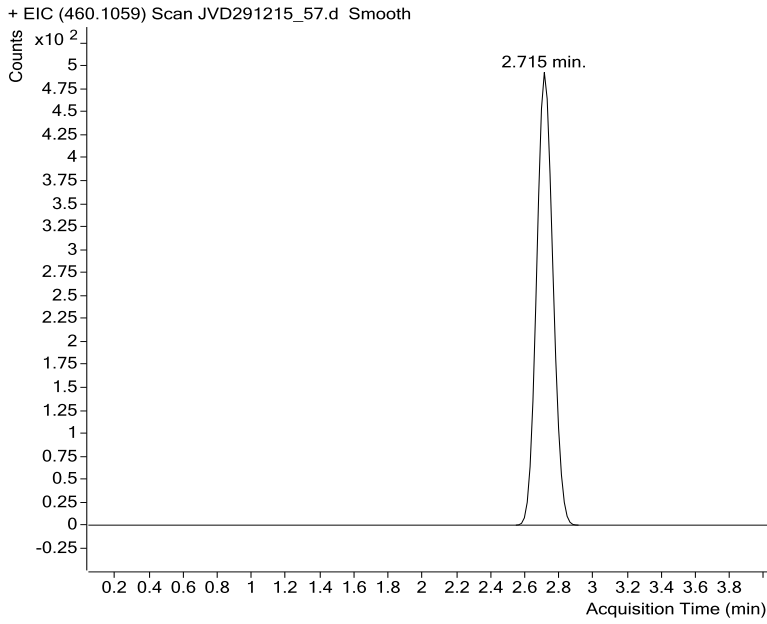


Figura 23. cromatogramas de las concentraciones 25 y 100 η g/ml de la curva de calibración

Concentración teórica	DONADOR 1		DONADOR 2		DONADOR 3	
	Conc. exp.	Kb/p	Conc. exp..	Kb/p	Conc. exp.	Kb/p
50 T0	58,02	T0	57,49	T0	55,33	T0
350 T0	297,19	1,03	257,07	1,03	266,51	1,12
600 T0	509,28	1,04	600,33	1,43	607,32	1,74
50 PL T0	58,90	1,26	58,35	1,08	58,35	0,97
350 PL T0	302,49		308,74		358,74	
600 PL T0	570,22	T1	623,98	T1	598,01	T1
50 T1	46,19	1,59	52,38	1,66	51,69	1,27
350 T1	220,84	1,69	270,64	1,04	273,22	1,82
600 T1	609,28	0,96	621,64	0,81	625,11	0,86
50 PL T1	58,90		68,71		58,35	
350 PL T1	292,03		276,28		378,74	
600 PL T1	597,22	T2	566,66	T2	583,98	T2
50 T2	45,51	1,29	40,69	1,70	95,10	1,63
350 T2	336,47	1,06	264,85	1,73	333,85	1,11
600 T2	592,40	1,07	581,01	1,16	618,02	0,92
50 PL T2	51,76		54,09		58,35	
350 PL T2	345,51		355,98		351,74	
600 PL T2	610,75	T3	625,98	T3	593,85	T3
50 T3	48,85	1,44	61,61	1,20	58,57	0,99
350 T3	384,77	0,86	360,86	1,03	381,013	0,88
600 T3	585,11	1,02	605,76	1,21	581,01	1,16
50 PL T3	58,90		67,24		58,35	
350 PL T3	358,76		365,85		358,74	
600 PL T3	589,28	T4	665,85	T4	623,98	T4
50 T4	49,17	1,09	50,32	1,34	52,56	1,23
350 T4	294,86	1,42	269,53	1,65	308,50	1,35
600 T4	615,32	1,00	569,53	1,20	508,50	1,40
50 PL T4	51,28		58,35		58,35	
350 PL T4	353,59		351,74		358,74	
600 PL T4	616,29		623,98		603,98	

Cuadro 25. Respuestas obtenidas del ensayo a las concentraciones trabajadas (50ng/ml, 350ng/ml, 600ng/ml). "PL" representa el plasma de referencia a cada tiempo.

Conc. (ng/ml)	Conc. experimentales (ng/ml)			Respuestas (Áreas)		
	SD	PROM	cv%	SD	PROM	cv%
50 T0	1.43	56.95	2.50	515.49	20163.73	2.56
350 T0	20.98	273.59	7.67	7584.73	98479.49	7.70
600 T0	54.70	572.31	9.56	19774.23	206467.58	9.58
50 PL T0	0.32	58.53	0.54	114.66	20736.05	0.55
350 PL T0	30.83	323.32	9.54	11145.35	116458.19	9.57
600 PL T0	26.89	597.41	4.50	9718.93	215539.78	4.51
50 T1	3.39	50.09	6.78	1227.20	17684.03	6.94
350 T1	29.52	254.90	11.58	10672.58	91724.49	11.64
600 T1	8.32	618.68	1.35	3008.59	223228.72	1.35
50 PL T1	5.83	61.98	9.40	2107.16	21984.37	9.59
350 PL T1	55.18	315.68	17.48	19945.68	113695.91	17.54
600 PL T1	15.33	582.62	2.63	5539.95	210195.80	2.64
50 T2	2.68	43.77	6.11	967.43	33474.67	2.89
350 T2	40.61	311.73	13.03	14681.27	112266.11	13.08
600 T2	18.95	597.14	3.17	6851.74	215444.99	3.18
50 PL T2	3.34	54.73	6.10	778.13	19965.65	3.88
350 PL T2	5.27	351.08	1.50	1903.46	126491.41	1.51
600 PL T2	16.07	610.20	2.63	5809.47	220162.93	2.64
50 T3	6.66	56.34	11.83	2408.44	19944.95	12.08
350 T3	12.86	375.55	3.42	4649.60	135337.63	3.44
600 T3	13.27	590.63	2.25	4795.45	213089.59	2.25
50 PL T3	4.99	61.50	8.11	1802.14	21808.04	8.26
350 PL T3	4.10	361.12	1.14	1481.87	130120.86	1.14
600 PL T3	38.34	626.37	6.12	13860.70	226010.04	6.13
50 T4	1.72	50.69	3.40	623.40	17900.65	3.48
350 T4	19.77	290.96	6.80	7147.31	104760.84	6.82
600 T4	53.59	564.45	9.50	19373.63	203625.76	9.51
50 PL T4	4.08	55.99	7.28	1805.48	19393.19	9.31
350 PL T4	3.63	354.69	1.02	1311.34	127797.22	1.03
600 PL T4	10.09	614.75	1.64	3647.06	221810.87	1.64

Cuadros 26a y 26b. Coeficiente de variación de las respuestas obtenidas del ensayo en sangre a las concentraciones trabajadas (50ng/ml, 350ng/ml, 600ng/ml). "PL" representa el plasma de referencia a cada tiempo.

El promedio de las respuestas (áreas de pico) obtenidas a cada tiempo determinado (cuadro 26b) tienen congruencia ya que demostraron tener coeficientes de variación menores al 15 % y debido a la complejidad de la muestra (sangre humana) trabajada así como la naturaleza de la Casiopeína III-ia®, son CV% aceptables. En el caso de las concentraciones experimentales, se puede observar en el cuadro 26a que se respeta la misma tendencia es decir que los coeficientes de variación se mantienen por debajo del 15% lo cual nos indica que la prueba es reproducible en cada lote de sangre sin tomar en cuenta el punto correspondiente a la concentración de 350 ng/ml en plasma en el segundo tiempo ya que tiene un coeficiente de variación ligeramente más alto.

El cálculo del de la constante de partición sangre/plasma se determinó utilizando la ecuación reportada por Yu. T. 2010. Tomando en cuenta el valor del hematocrito igual a 0.47, así como los valores de concentración experimental reportados en la tabla como se muestra a continuación:

$$K_b/p = \left(\frac{1}{0,47} * \left(\left(\frac{58,90}{58,02} \right) - 1 \right) + 1 \right) = 1,032$$

Figura 24. Ejemplo de cálculo de la constante de partición sangre/plasma (K_b/p), tomado del dato del donador 1 en la concentración de 50 ng/ml mostrada en el cuadro 25.

En el siguiente cuadro se muestran los resultados completos de los coeficientes de partición sangre/plasma (K_b/p) correspondientes a cada donador;

Cuadro 27. Resultados del coeficiente de partición sangre plasma (kb/p) para Cas III-ia a cuatro tiempos

Tabla de kb/p` s obtenidos a cada tiempo					
TIEMPOS	CONC.	DONADOR 1	DONADOR 2	DONADOR 3	PROMEDIO
T0	50	1.03	1.03	1.12	1.06
	350	1.04	1.43	1.74	1.40
	600	1.26	1.08	0.97	1.10
T1	50	1.59	1.66	1.27	1.51
	350	1.69	1.04	1.82	1.52
	600	0.96	0.81	0.86	0.88
T2	50	1.29	1.70	1.63	1.54
	350	1.06	1.73	1.11	1.30
	600	1.07	1.17	0.92	1.05
T3	50	1.44	1.20	0.99	1.21
	350	0.86	1.03	0.88	0.92
	600	1.02	1.21	1.16	1.13
T4	50	1.09	1.34	1.23	1.22
	350	1.42	1.65	1.35	1.47
	600	1.00	1.20	1.40	1.20

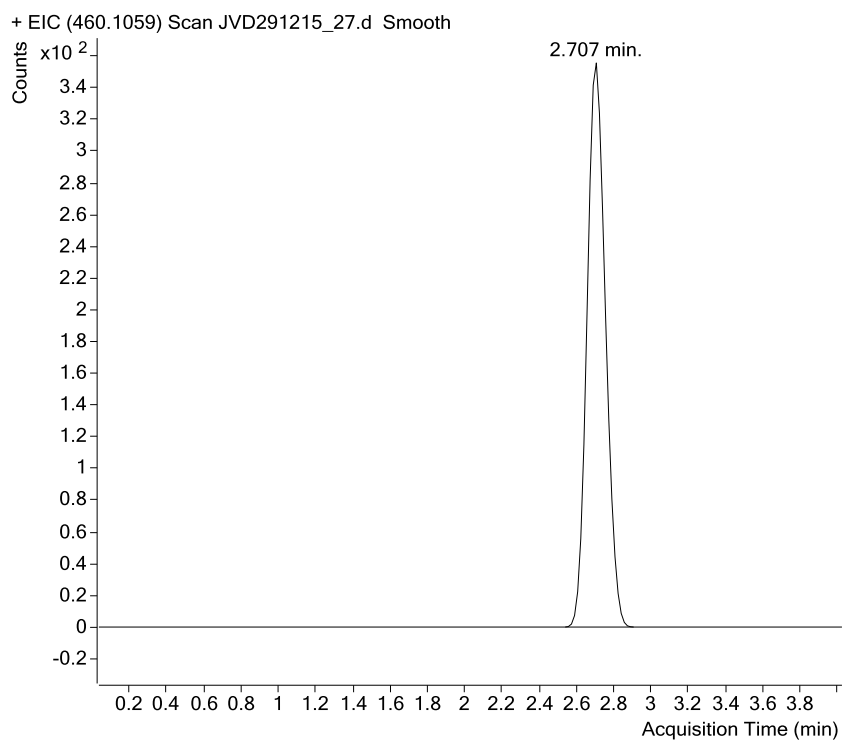


Figura 25. cromatograma de muestra 50 ng/ml a tiempo 1

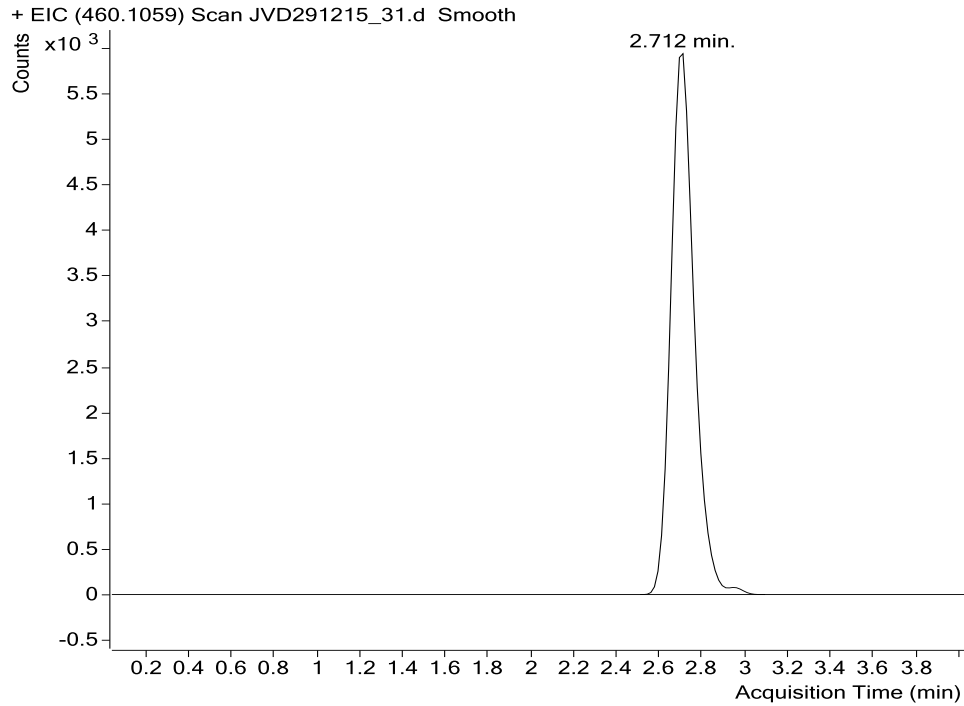


Figura 26.cromatograma de muestra 350 ng/ml a tiempo 1

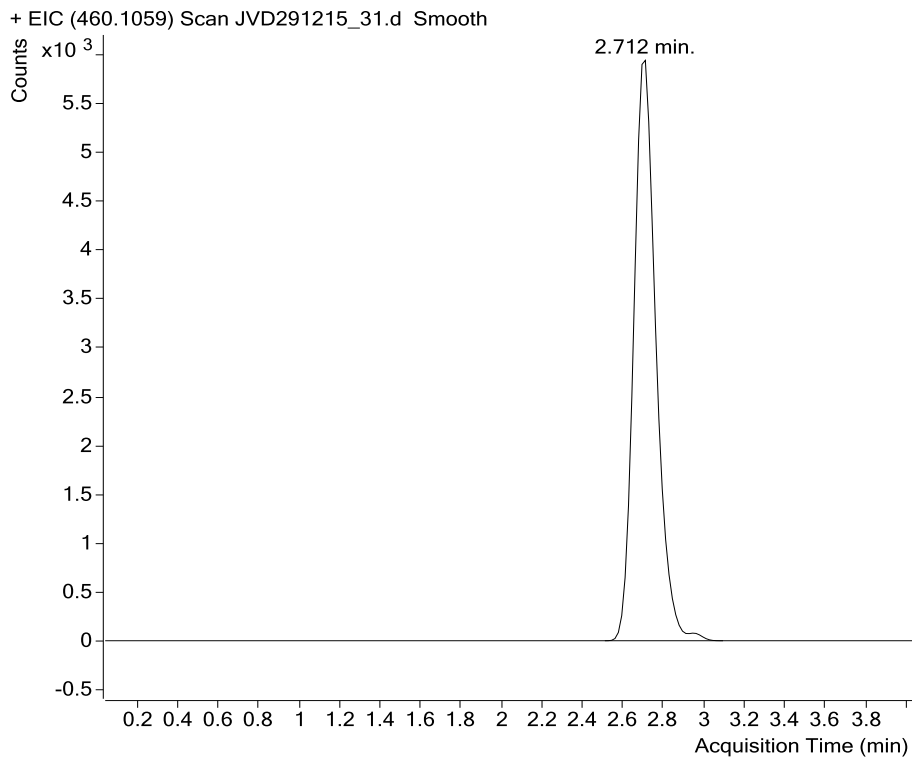


Figura 27.cromatograma de muestra 600 ng/ml a tiempo 2

Cuadro 28. Resultados sintetizados del coeficiente de partición sangre plasma (kb/p) para Cas III-ia a cuatro tiempos

CONC.	Coeficiente de partición sangre/plasma				
	T0	T1	T2	T3	T4
50	1.06	1.51	0.99	1.21	1.23
350	1.40	1.52	1.05	0.92	1.47
1000	1.10	0.88	1.07	1.23	1.20

Los resultados mostrados en el cuadro 28 indican con base en el promedio y el intervalo de kb/p reportado, que la Casiopeína III-ia® se encuentra en una proporción importante en plasma ($kb/p < 2$) ya que los valores promedio del coeficiente de partición (kb/p) a lo largo del tiempo se mantienen por debajo de 2. Cabe mencionar que aunque con este resultado podemos asegurar que el fármaco se encuentra predominantemente en plasma, hay también cierta cantidad que se encuentra unida en glóbulos rojos. Aunque al encontrarse la mayor parte del fármaco en el plasma, es posible justificar de manera correcta el trabajo de los distintos estudios biofarmaceuticos correspondientes de la fase clínica utilizando este fluido.

Es importante resaltar que al parecer a la tercera hora después de que el fármaco es colocado directamente a la sangre total, se llega al equilibrio ya que después del tiempo tres el valor de kb/p es prácticamente el mismo lo cual nos da una idea de la biodisponibilidad de la Casiopeína III-ia®.

7 **CONCLUSIONES**

- Se obtuvo la constante de partición sangre/plasma de la Casiopeína III-ia® en sangre humana el cual es de alrededor de 1.5.
- Se encontró que el fluido humano más recomendable para realizar los estudios de fase clínica correspondientes es el plasma ya que el valor de la constante (K_b/p) es menor a 2.
- Se logró optimizar el método de cuantificación establecido para Casiopeína III-ia® lográndose disminuir el volumen de la muestra utilizada de 1000 μ l a 500 μ l.
- Se logró determinar el tiempo en el cual el fármaco se encuentra equilibrio en la sangre (3 horas)

8 REFERENCIAS

Albanel, J. Mestres J. Torres, B. (2000) Capitulo 1.13 Principios de Quimioterapia: Tratamiento del cáncer con quimioterapia. Díaz-Rubio, E. García-Conde, J. *Oncología Clínica Básica*. 179-187. Madrid, España. Editorial Aran.

Antonio--Jarquín, J. Tesis Maestro en Ciencias Química "*Farmacocinética de Casiopeína III--i : estudio preclínico en conejos*". Asesor: Fuentes--- Noriega, I. Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

Bravo, M.E. Tovar, A. et al. (2002) *Diseño, Síntesis y Caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®. Historia Química de un proyecto exitoso*. Primer Congreso de Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ex Hacienda El Chorrillo, Taxco, Guerrero. 2 y 3 de Diciembre 2002.

Cañas-Alonso, R.C. (2013) Desarrollo y Validación de Métodos Bionalíticos para cuantificar Casiopeína II-gly en plasma y sangre de perro Beagle por HPLC-MS y su aplicación en un estudio farmacocinético. Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM.

Carvalho-Cheigneau, F., Trejo-Solís, C., Gómez-Ruiz, C., Rodríguez-Aguilera, E., Macías-Rosales, L., Cortes-Barberena, E., Cedillo-Pelaez, C., Gracia-Mora, I., Ruiz-Azuara, L., Madrid-Marina, V. y Constantino-Casas, F. (2008) Casiopeina III-ia indices apoptosis in HTC-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals*. 14(4): p 467-72.

De oliveira, L;L. Greggi; H. Colleta y M. Pires. 2002. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in winstar rat bone marrow cells. *Mutation research* 518: 65-70

Fuentes-Noriega, Cañas Alonso, Rubio Carrasco (2013). Protocolo "Desarrollo y Validación del Método Bioanalítico para cuantificar la Casiopeína III en plasma humano" pp. 5-6.

Fuentes-Noriega, I. (2005). *Farmacocinética preclínica de Casiopeína III y su unión a proteínas plasmáticas*. Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM.

Fuentes-Noriega, I. Ruiz-Ramírez, L. Tovar-Tovar, A. Rico-Morales, H. y Gracia-Mora, I. (2002). Development and validation of a liquid chromatographic method for Casiopeína III in rat plasma. *Journal Chromatographic B. Analyt Technol Biomed Life Sci*, 772(1), p 115-121.

Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez. C., Gómez-Ruiz, M. et al. (2001) Knight's Move in the Periodic Table, from Platinum to Copper. New Anticancer compounds, Casiopeínas, *in vitro* evaluation. *Metal Based Drugs*. 8, (1) 19-28.

Gracia, I. Bravo M.E., Ruiz-Ramírez, L., Tinoco, M., Mayet, M.L., Huerta L. (2004) New Antineoplastic *in vivo* Screening of mixed Chelate Coordination Compounds (Casiopeínas) in several murine Tumoral Model. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.

Hinderling FH, "Red Blood Cells: A Neglected Compartment in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics", *Pharmacol Rev*, 1997, 49:279.

Khynriam, D. y S. Prasad. 2003. Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascies Dalton's lymphoma mutation research 526: 9-18

Martínez-Chapa, K.A. (2008). *Compilación de los Estudios Químicos y Farmacológicos de las Casiopeínas® III-ia y IIgly*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México.

Magos-Guerrero, A.G. y Lorenzana-Jiménez, M. (2009) Monografía. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. Vol. 52 No. 6 p260-264.

Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas. (2013). Secretaría de Salud, México.

National Institute Cancer (NCI). (2014). Hojas informativas NCI. En: www.cancer.gov/espanol/hojas-informativas. Julio 2014.

Pérez-Sánchez, P. y Sobredo-Galanes A. (2010) *Industria Farmacéutica y Patentes*. [Versión electrónica] Recuperado de: <http://www.books.google.com.mx/books?id=m7o0stnPtj0C&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Romero---Ramírez, A. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo "*Estudio preliminar de farmacocinética de Casiopeína IIIia : un nuevo anticancerígeno en ratas ,a partir del análisis de datos urinarios*". Asesor: Fuentes---Noriega, I. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.

Shaoxia Yu, Shelly Li, Hua Yang, Frank Lee, Jing-Tao Wu and Mark G. Qian, *A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery*, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19:250

Tovar-Tovar, A. Ruiz-Ramírez, L. Campero, A. Romerosa, A. Moreno-Esparza, R. Rosales-Hoz, M. (2004) Structural and reactivity studies on 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia®) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98, 1045-1053.

Truter, E.J., A.S. Santos y W.J. Els. 2002. Correlation between cell survival clonogenic activity and micronuclei induction in DMBA-OC-1R cells treated with immunospecific albumin microspheres containing cisplatin and Fluorouracil. *Cell Biology international*. Vol. 26 No. 6.. 505-516

Tucker J.D. Y R.J. Preston. 1996 chromosome aberration, micronuclei,aneuplidy. Sister nchromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutataion Research* 365;147-159