



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA**



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO POR HPLC PARA LA
DETERMINACIÓN DE IMATINIB EN PLASMA DE RATAS Y SU
APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE FARMACOCINÉTICA.**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA
ALDAHIR GEOVANNI HERNÁNDEZ SORIANO**

**DIRECTOR
DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ.
ASESOR
M. EN C. MARÍA TERESA GRISELDA FUENTES LARA.**

Ciudad de México, 2017.



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.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO** y a la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA** por la formación académica, personal y profesional proporcionada durante la licenciatura. Soy afortunado de haber concluido mis estudios de licenciatura en una de las mejores instituciones del país.

Al **INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**, en especial al laboratorio 8 de Farmacología de la Unidad de Investigación Básica por proporcionarme las herramientas y el apoyo para la realización de este trabajo.

A la **Dra. Patricia García López** por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo y desarrollar este trabajo bajo su dirección. Gracias por el apoyo, la paciencia y los conocimientos recibidos durante el transcurso del proyecto.

Al **Dr. Valentín Islas Pérez**, a la **M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara**, a la **Mtra. Esperanza Jiménez Castañeda** y a la **Mtra. María Isabel Garduño Pozadas** por la amabilidad, la disponibilidad y hacer que este trabajo se realizara de la mejor manera. Gracias por sus consejos, correcciones y sugerencias.

A lo largo de la carrera, el servicio social y la tesis tuve el placer de conocer a maestros (as), compañeros (as) y amigos (as). Encontré en muchas ocasiones a grandes personas y simplemente es imposible mencionarlos a todos, sin embargo, me llevo gratos recuerdos, aprendizajes, conocimientos, experiencias, risas. Hasta la próxima ocasión.

A Lupita Saliza, le agradezco por todos esos momentos que compartimos juntos. Gracias por estar ahí conmigo.

DEDICATORIAS

A DIOS

Gracias por cuidar y proteger a mi familia, por guiarme, por estar ahí tanto en momentos de alegrías como en momentos difíciles, por darme salud y permitirme alcanzar esta meta. *No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia.* (Isa 41:10)

A MI FAMILIA

A mi padre Telesforo Hernández Martínez y mi madre Juana Soriano Pérez por darme la vida, por su amor, por sus enseñanzas, sus valores, sus consejos y su apoyo incondicional en todos los momentos. Deseo expresarles que los quiero mucho, los admiro y que mis ideales, esfuerzos y logros también son suyos.

A mi hermanita Jenny Anel Hernández Soriano y a mi hermanito Lenin Omar Hernández Soriano por todos esos momentos que hemos vivido de juegos, de risas, de consejos, etc. Deseos expresarles que los quiero mucho y siempre estaré ahí para escucharlos, cuidarlos y ayudarlos.

A mi abuelito (as), mis tíos (as) y primos (as) por todos esos momentos que hemos compartido en la vida. Los quiero mucho.

INDICE

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 1 |
| 1. RESUMEN | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 3.1 Validación de un método bioanalítico | 5 |
| 3.1.1 Precisión del sistema | 5 |
| 3.1.2 Linealidad del sistema..... | 5 |
| 3.1.3 Selectividad del método | 6 |
| 3.1.4 Linealidad del método | 7 |
| 3.1.5 Precisión del método..... | 7 |
| 3.1.6 Exactitud del método..... | 7 |
| 3.1.7 Límite de detección | 8 |
| 3.1.8 Límite de cuantificación..... | 8 |
| 3.1.9 Estabilidad..... | 8 |
| 3.2 Conceptos generales de farmacocinética..... | 9 |
| 3.2.1 Absorción | 9 |
| 3.2.2 Distribución | 9 |
| 3.2.4 Metabolismo..... | 11 |
| 3.2.5 Eliminación..... | 13 |
| 3.3 Parámetros farmacocinéticos | 13 |
| 3.3.1 Biodisponibilidad y área bajo la curva (ABC) | 14 |
| 3.3.2 Concentración plasmática máxima (C_{max}) y tiempo máximo (T_{max})..... | 14 |
| 3.3.3 Volumen de distribución (Vd) | 15 |
| 3.3.4 Tiempo de vida media ($T_{1/2}$)..... | 15 |
| 3.4 Leucemia mieloide crónica | 15 |
| 3.4.1 Fisiopatología..... | 17 |
| 3.5 Imatinib | 17 |
| 3.5.1 Mecanismo de acción..... | 18 |
| 3.5.2 Farmacocinética..... | 19 |
| 3.5.3 Resistencia a Imatinib | 20 |

| | |
|--|----|
| 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 22 |
| 5. HIPÓTESIS | 23 |
| 6. OBJETIVOS | 23 |
| 7. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| 7.1 Material | 24 |
| Reactivos | 24 |
| Material biológico | 25 |
| Equipos | 25 |
| 7.2 Metodología | 26 |
| 7.2.1 Condiciones cromatográficas..... | 26 |
| 7.2.2 Validación del sistema | 26 |
| 7.2.3 Validación del método | 27 |
| 7.2.4 Estudio de farmacocinética | 30 |
| 8. RESULTADOS | 32 |
| 8.1 Validación del sistema | 32 |
| 8.1.1 Linealidad..... | 32 |
| 8.1-2 Precisión | 33 |
| 8.2 Validación del método..... | 34 |
| 8.2.1 Selectividad..... | 34 |
| 8.2.2 Linealidad..... | 34 |
| 8.2.3 Precisión | 35 |
| 8.2.2 Exactitud | 37 |
| 8.2.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ) | 37 |
| 8.2.6 Estabilidad..... | 37 |
| 8.3 Farmacocinética | 39 |
| 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS | 41 |
| 10. CONCLUSIONES..... | 45 |
| 11. PERSPECTIVAS..... | 46 |
| 12. REFERENCIAS..... | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ATP | Trifosfato de Adenosina |
| ABC | Área bajo la curva |
| Cmax | Concentración máxima |
| EI | Estándar Interno |
| FEUM | Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| IFN α | Interferón α |
| LMC | Leucemia Mieloide Crónica |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Pg-p | Glicoproteína P |
| Ph+ | Cromosoma Filadelfia. |
| T _{1/2} | Tiempo de vida media. |
| Tmax | Tiempo máximo |
| Vd | Volumen de distribución |
| %CV | Porcentaje del coeficiente de variación. |

1. RESUMEN

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, todo análisis de muestras biológicas en estudios de biodisponibilidad debe ser validado, esto con el fin de asegurar que los resultados obtenidos son confiables y que el método empleado es adecuado, sensible, preciso, exacto y reproducible.

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método bioanalítico para la cuantificación de Imatinib en plasma de ratas utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes: columna Symmetry C-18 5 μ m (3.9 x 150 mm), velocidad de flujo de 1.8 mL/min, volumen de inyección de 20 μ L y llevándose a cabo la lectura a una longitud de onda de 264 nm. La fase móvil utilizada fue Trietilamina – Acetonitrilo. Posteriormente, el método cromatográfico se utilizó para determinar la farmacocinética del Imatinib en ratas Wistar, obteniéndose al final la curva concentración vs tiempo con sus respectivos parámetros (concentración máxima, tiempo máximo, área bajo la curva y tiempo de vida media).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el método desarrollado para la cuantificación del Imatinib en plasma de ratas es adecuado para emplearse en estudios de farmacocinética preclínica, ya que cumple con los criterios de aceptación establecidos en dicha normatividad, en un rango de 0.5 μ g/mL a 16 μ g/mL y con un límite de cuantificación de 0.318 μ g/mL.

2. INTRODUCCIÓN

Desde el siglo pasado, el cáncer era considerado una enfermedad común que paulatinamente se convirtió en un problema importante de salud a nivel mundial. Desde el 2012, datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) refieren al cáncer como unas de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, con 8.2 millones de defunciones en ese año y con un aumento a 22 millones en las próximas dos décadas.¹ En México, las leucemias en general representan el 4% de incidencia de todos los cánceres, existiendo alrededor 80,000 casos de leucemia de los cuales el 10% corresponden a la Leucemia Mieloide Crónica (LMC).²

El origen de la LMC resulta de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, produciendo el denominado cromosoma Filadelfia (Ph+), que codifica a la proteína BCR-ABL, responsable de la activación de múltiples señales proliferativas, de la reducción de la dependencia de los factores de crecimiento y de la apoptosis.^{3, 28}

Históricamente, al ser un padecimiento incurable, la LMC ha recibido diferentes enfoques para su tratamiento, pasando por la radioterapia, la quimioterapia hasta el uso de Interferón α (IFN α) en la década de los 80. En diciembre de 2002, la FDA (Food and Drug Administration) aprobó al Mesilato de Imatinib como primera línea de tratamiento en pacientes con LMC, pues además de contar con un buen perfil farmacocinético, lo que facilita al fármaco llegar a su sitio de acción, se observaron remisiones citogenéticas completas hasta en 87% de los pacientes en

fase crónica, con una disminución en el riesgo de recaída y una supervivencia global a 60 meses del 89%.³

El Imatinib actúa de manera específica sobre las células hematopoyéticas Ph+ evitando así la transducción de las señales de energía necesarias para la proliferación celular y la inducción de la apoptosis.^{14,15} Si bien dicho fármaco resultó muy efectivo, pronto se empezaron a documentar casos de pacientes que presentaban resistencia al fármaco causada por diferentes mecanismos, entre ellos, de tipo farmacocinético pues se ha observado que la administración crónica puede inducir la sobre-expresión de glicoproteína p (pg-p), la cual tiene la capacidad de expulsar el fármaco de la célula maligna ocasionando concentraciones intracelulares inadecuadas y/o niveles plasmáticos bajos causado por el metabolismo del sistema citocromo P450 3A4 y 3A5 lo que limita la biodisponibilidad y en consecuencia la eficacia del fármaco.^{23,31,42,43}

Es por ello que es fundamental contar con métodos bioanalíticos validados que nos permitan la cuantificación de Imatinib aplicado a estudios de farmacocinética con el objetivo de buscar alguna estrategia para revertir dicha resistencia que se genera tras la administración crónica del medicamento. En el presente trabajo se desarrolló y validó un método por HPLC para la determinación de Imatinib en plasma de ratas bajo los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013, demostrando así que los resultados obtenidos son confiables y que el método es sensible, preciso, exacto y reproducible.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Validación de un método bioanalítico

La validación es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para su aplicación analítica, demostrando así que los resultados son fiables y adecuados para su propósito.⁴ De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, todos los estudios de biodisponibilidad deben de cumplir con los criterios de aceptabilidad para cada parámetro de validación señalado en dicha norma.⁵

3.1.1 Precisión del sistema

Parámetro que describe el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración conocida. El analista, el equipo, los instrumentos de medición, las soluciones de referencia, etc. Originan una variabilidad inherente que se asocia con la respuesta analítica, por lo que, es importante verificar, que su valor no sea una fuente importante de la variabilidad. El criterio de aceptabilidad es un coeficiente de variación (CV) $\leq 3\%$.⁴

3.1.2 Linealidad del sistema

La curva de calibración del sistema es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan al modelo matemático dentro de un intervalo de concentraciones de acuerdo al propósito del método, es decir, que los resultados obtenidos sean directamente proporcionales a las concentraciones del analito; ya que de no existir dicha relación lineal dará una inexactitud en el

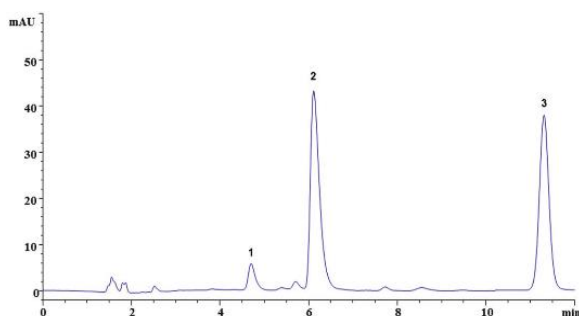
método. Los límites aceptables de la linealidad del sistema son un coeficiente de correlación ($r \geq 0.99$).⁴



Esquema 1. Se establece el comportamiento lineal mediante una gráfica concentración vs respuesta, dentro de un intervalo de concentraciones de acuerdo al propósito del método.²²

3.1.3 Selectividad del método

Es la capacidad de un método analítico para obtener solo la respuesta del analito de interés y no de otros componentes que se pudiesen encontrar en la matriz biológica, es decir, investiga la influencia de otros componentes que pudiesen estar presentes (especificidad) o que pudiesen presentarse por efectos ambientales y/o interacciones entre los mismos componentes (selectividad) de la muestra.⁵



Esquema 2. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación y del 5% para el estándar interno.^{5, 23}

3.1.4 Linealidad del método

Tradicionalmente se considera que un método es lineal cuando existe una relación directamente proporcional entre la respuesta obtenida y la concentración del analito en la matriz biológica en un intervalo dado de acuerdo a la aplicación analítica del método. Los límites aceptables de la linealidad del método son un coeficiente de correlación $(r) \geq 0.99$.^{4,5}

De acuerdo a la norma anteriormente mencionada dicho parámetro debe incluir el porcentaje de recuperación. El % de concentración recuperada debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.⁵

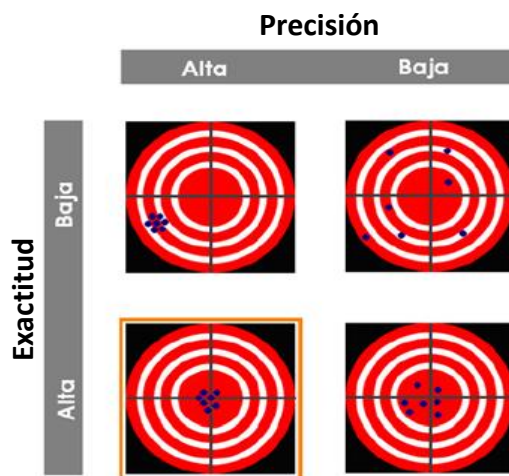
3.1.5 Precisión del método

Se refiere al grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad). Este parámetro refleja los errores aleatorios que se producen cuando se utiliza el método. El %CV para cada nivel de concentración no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20%.^{4,5}

3.1.6 Exactitud del método

La exactitud se refiere a la concordancia absoluta entre los resultados obtenidos con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, dicho parámetro refleja el error sistemático del método y del laboratorio, por lo tanto, la exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. El valor promedio del

porcentaje de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.^{4, 5}



Esquema 3. Representación esquemática de los parámetros de precisión y exactitud, obsérvese que se cumplen ambos casos en el tiro al blanco que se encuentra en el cuadrante inferior izquierdo.²²

3.1.7 Límite de detección

Se designa límite de detección a la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. Para dar validez al cálculo, el coeficiente de correlación (r^2) de la linealidad debe ser mayor al 98%.^{4, 5}

3.1.8 Límite de cuantificación

Es la cantidad mínima del analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable. Para dar validez al cálculo, el coeficiente de determinación (R) de la linealidad debe ser mayor al 98%.^{4, 5}

3.1.9 Estabilidad

Para validar un método debe demostrarse que los analitos se mantienen estables durante todo el procedimiento de análisis, incluido su almacenamiento antes y

después de éste. En general, la medición se hace comparando patrones recién preparados con una concentración conocida con patrones similares almacenados durante diferentes períodos de tiempo y en diferentes condiciones.⁶ Para cada nivel de concentración deber ser $\leq 15\%$ de la concentración nominal.⁵

3.2 Conceptos generales de farmacocinética

Una vez que el Fármaco es administrado por una de las diferentes vías, la farmacocinética se encarga de estudiar el curso temporal de las concentraciones del o los fármacos en el organismo y construye modelos para interpretar estos datos. Son cuatro propiedades farmacocinéticas que determinan la rapidez con la que se ejerce la acción terapéutica, la intensidad de este, hasta la total eliminación en el organismo. Esto permite diseñar, optimizar el tratamiento farmacológico, la vía de administración, la dosis, la frecuencia y la duración del tratamiento.⁷

3.2.1 Absorción

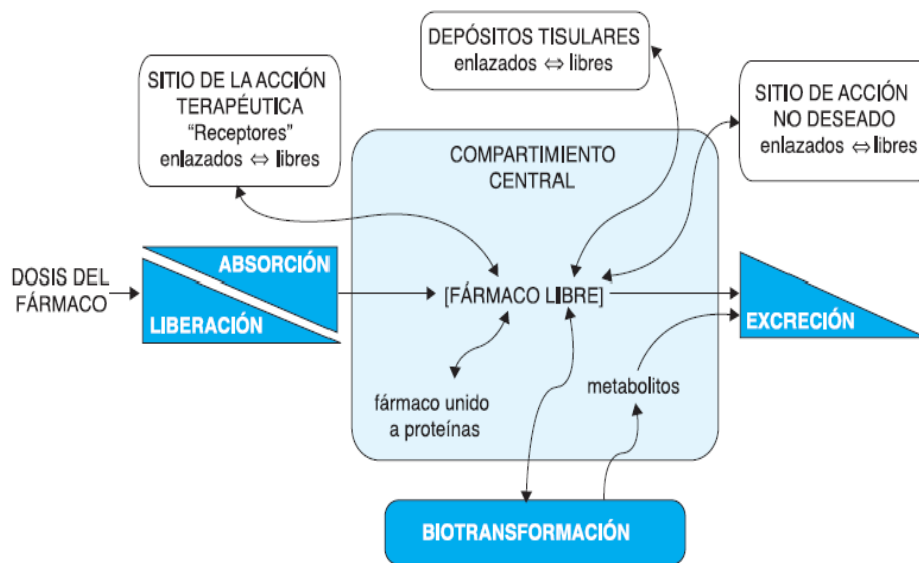
La absorción consiste en el paso del fármaco desde su sitio de administración hasta llegar a la circulación sanguínea, la velocidad con que se lleva este proceso está condicionada por la vía de administración, la naturaleza del fármaco, factores propios del paciente y barreras gastrointestinales modificando la biodisponibilidad del fármaco en el sitio diana.⁷

3.2.2 Distribución

Una vez que el fármaco llega a circulación sanguínea, es transportado por proteínas plasmáticas principalmente albúmina y 1-glucoproteína ácida

distribuyéndose de forma reversible a las distintas estructuras extravasculares y/o al sitio de acción hasta alcanzar un equilibrio entre las velocidades de entrada y salida del fármaco.⁸ Los factores que pueden modificar la llegada del fármaco hacia el espacio intersticial (líquido extracelular) y las células de los tejidos son:

- Naturaleza química del fármaco: El peso molecular, el grado de ionización y la liposolubilidad, condiciona el paso del fármaco a través de las membranas biológicas, pues una molécula pequeña, poco ionizada y muy liposoluble atraviesa rápidamente las membranas celulares.⁹
- Grado de unión del fármaco a proteínas: Uno de los principales factores que alteran la distribución es el grado de unión a proteínas plasmáticas, pues solamente el fármaco que no esté unido a proteínas puede distribuirse hacia los tejidos y ejercer el efecto farmacológico. Las concentraciones de estas proteínas pueden verse modificadas en ciertas enfermedades o patologías.
- Barreras fisiológicas: Existen en el organismo ciertas barreras fisiológicas que condicionan la llegada del fármaco a algunos sitios. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica limita la entrada de los fármacos al sistema nervioso central, especialmente de fármacos altamente ionizados o de gran peso molecular.
- Patologías: En ciertas enfermedades el flujo sanguíneo, la fisiología de ciertos órganos o las concentraciones de las proteínas plasmáticas se ven alterados lo que condiciona la distribución del fármaco.

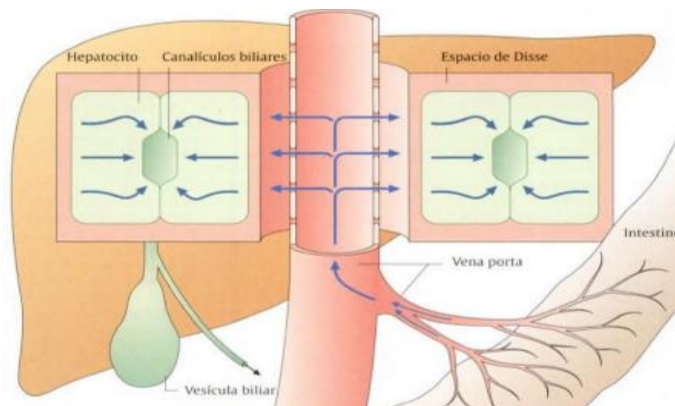


Esquema 4. Representación del proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos.⁸

3.2.4 Metabolismo

El metabolismo se define como la biotransformación química de los fármacos en moléculas (metabolitos) generalmente inactivas y con mayor hidrosolubilidad, facilitando así su excreción del organismo. Diversos órganos como los riñones, el tubo digestivo, los pulmones y otros órganos tienen la capacidad de metabolizar los fármacos a través de reacciones enzimáticas (sistema microsomal), no obstante, el hígado (esquema 5) que además de recibir 1,100 mL de sangre por minuto por medio de la vena porta y 350 mL de la arteria hepática, lo cual favorece un intercambio intensivo de sustancias entre la sangre y las células hepáticas, posee la mayor variedad y cantidad de enzimas metabolizadoras, por lo que la mayor parte del metabolismo de los fármacos se producen en este órgano, destacándose dos reacciones principalmente de fase I (oxidación/reducción) y de fase II (conjugación/hidrolisis).^{9, 20}

1. Reacciones de Fase I (oxidación/reducción): Consisten en la introducción o exposición de un grupo funcional en la molécula del fármaco para inactivarlo y hacerlo más hidrosoluble. El sistema enzimático del citocromo P450 interviene en un gran número de reacciones oxidativas. Estas reacciones son llevadas a cabo en el retículo endoplasmático liso del hepatocito.
2. Reacciones de Fase II (conjugación/hidrolisis): Estas reacciones culminan en la formación de un enlace covalente entre un grupo funcional de la molécula de fármaco y una molécula grande y polarizada. Entre los grupos más usados están los glucuronatos, los sulfatos, el glutatión y los acetatos. Los compuestos formados suelen ser rápidamente excretados en orina y heces.



Esquema 5. Hígado órgano principal en el metabolismo de los medicamentos. El hepatocito segrega líquido biliar en los canaliculos biliares.²⁰

3.2.5 Eliminación

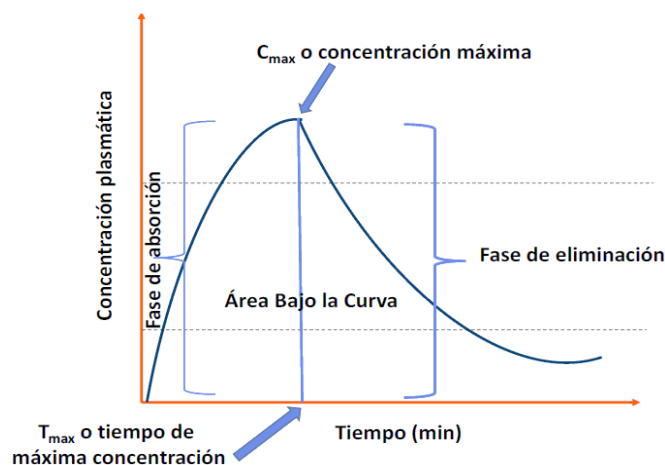
La excreción es el proceso por el cual los fármacos son eliminados de los tejidos y de la circulación ya sea en su forma inalterada o como metabolitos. Los órganos más importantes para la excreción son los riñones, aunque la excreción también puede llevarse a cabo por heces, bilis, sudor, etc., dichos órganos eliminan con mayor eficiencia compuestos polares que sustancias con alta liposolubilidad, estas sustancias primero deben metabolizarse en compuestos más polares.^{8,20}

La velocidad de eliminación a través de los riñones depende del balance entre las velocidades de filtración, secreción y reabsorción del fármaco; además de que el aumento del flujo sanguíneo y de la reducción de unión a las proteínas plasmáticas, provocan que el fármaco se excrete con mayor rapidez. Por otra parte, las sustancias que se eliminan por las heces son medicamentos administrados por vía oral que no se absorbieron o metabolitos de fármacos excretados por la bilis o secretados directamente al intestino. Componentes de la familia de transportadores de ABC presentes en la membrana canalicular del hepatocito secretan fármacos y metabolitos de manera activa a la bilis. Como el conducto biliar entra en el tubo digestivo, dichos fármacos deben pasar a lo largo de los intestinos delgado y grueso antes de ser eliminados.^{9, 20}

3.3 Parámetros farmacocinéticos

El principio fundamental de la farmacocinética es que existe una relación directa entre el efecto farmacológico de un medicamento y su concentración plasmática, es por ello, que se vale de diversos parámetros para explicar el comportamiento del fármaco en el organismo. Entre los principales se pueden mencionar el

volumen de distribución (V_d), el área bajo la curva (ABC), la concentración y tiempo máximos (C_{max} y t_{max}) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$).



Esquema 6. Curva de concentración plasmática vs tiempo tras la administración oral de un fármaco.²⁹

3.3.1 Biodisponibilidad y área bajo la curva (ABC)

A la cantidad de fármaco administrado que llega a circulación sistémica y que está disponible para acceder a los tejidos y producir un efecto se define como biodisponibilidad. El área bajo la curva representa la exposición total del fármaco en el organismo reflejando el grado de absorción de un fármaco y las variaciones de las concentraciones plasmáticas en función del tiempo y facilita la evaluación, el análisis y la comparación de los perfiles de biodisponibilidad entre fármacos.^{8, 30}

3.3.2 Concentración plasmática máxima (C_{max}) y tiempo máximo (T_{max})

La C_{max} hace referencia a la concentración plasmática máxima alcanzada en circulación sanguínea y está relacionada con la cantidad del fármaco absorbido, expresándose en unidades de mg/mL. El tiempo requerido para alcanzar dicha

concentración después de la administración extravascular se denomina tiempo máximo (T_{max}).

3.3.3 Volumen de distribución (Vd)

El volumen de distribución (Vd) hace referencia al grado de distribución del fármaco en el organismo. Un Vd elevado indica que el fármaco se distribuye ampliamente en los tejidos. Inversamente, un Vd pequeño indica que existe una gran afinidad por las proteínas plasmáticas.^{8, 9} La llegada de un fármaco desde el plasma al intersticio depende principalmente del flujo sanguíneo, del grado de unión fármaco-proteínas plasmáticas y de la hidrofobia relativa del fármaco.

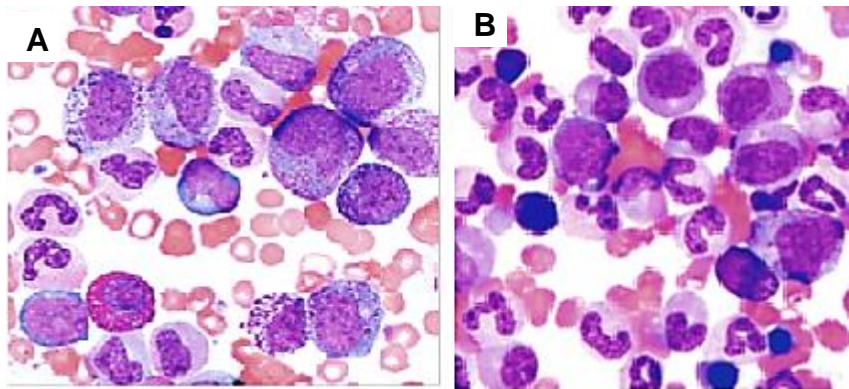
3.3.4 Tiempo de vida media ($T_{1/2}$)

La vida media es un parámetro que hace referencia al tiempo que tarda la concentración sanguínea de un fármaco en reducirse a la mitad y nos indica cada que tiempo el fármaco debe ser administrado, esto con el fin de, mantener la concentración en el intervalo terapéutico.^{7, 10}

3.4 Leucemia mieloide crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden clonal de células madre hematopoyéticas, de evolución lenta y originado en la médula ósea que da lugar a un número excesivo de células mieloides (células que producen glóbulos rojos, plaquetas, y la mayoría de los tipos de glóbulos blancos; excepto linfocitos) en todas las fases de maduración (esquema 7), se presenta en tres fases: fase crónica, fase acelerada y fase blástica.¹¹

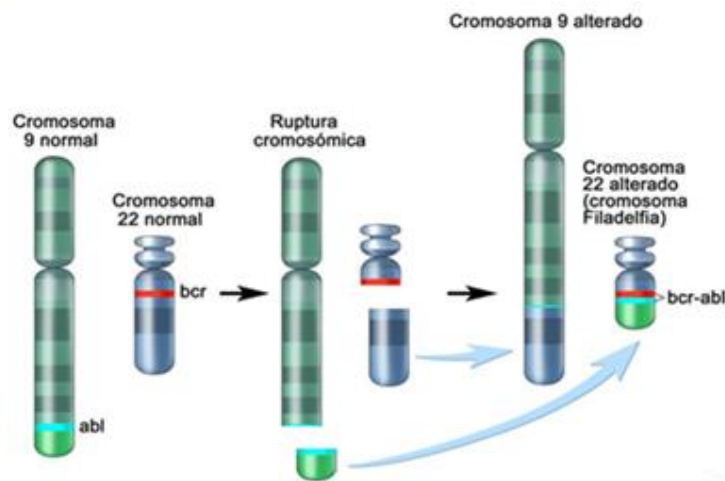
1. Leucemia mielógena crónica en fase crónica: Fase en la cual menos del 10% de las células de la sangre y de la médula ósea son células blásticas (células sanguíneas inmaduras). Esta fase puede durar desde varios meses a varios años.
2. Leucemia mielógena crónica en fase acelerada: En esta fase, entre 10 y 19% de las células de la sangre y la médula ósea son blastos, además de presentar síntomas como fiebre, falta de apetito, dolor de huesos y pérdida de peso.
3. Leucemia mielógena crónica en fase blástica: Fase en la que más del 20% de las células de la sangre y de la médula ósea son blastos. Además de presentar sintomatología de la anterior fase, es característico un agrandamiento del bazo durante esta fase, llamada crisis blástica.



Esquema 7. Leucemia mieloide crónica **(A)** Sangre periférica 500X. Basófilos y eosinófilos inmaduros. **(B)** Médula ósea 500X. Múltiples mielocitos, formas de banda y un basófilo

3.4.1 Fisiopatología

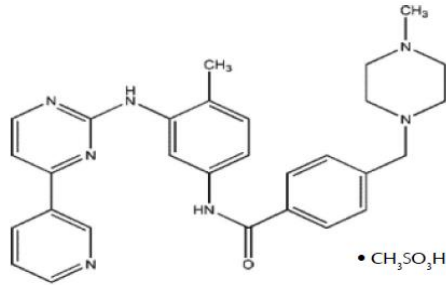
La enfermedad resulta de una anomalía cromosómica adquirida la cual es originada por una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, denominado cromosoma Philadelphia (Ph⁺), dicho cromosoma está compuesto por el gen ABL que contiene el dominio Y-cinasa y el gen BCR que contiene un dominio de autofosforilación, la cual codifica una proteína en la membrana celular tipo tirosin cinasa con capacidad autofosforilativa incrementada promoviendo señales de supervivencia y proliferación celular, reduciendo la dependencia de los factores de crecimiento y la apoptosis.^{13, 14, 28}



Esquema 8. Translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 dando origen a un cromosoma corto citogenéticamente visible, llamado cromosoma Filadelfia.²⁵

3.5 Imatinib

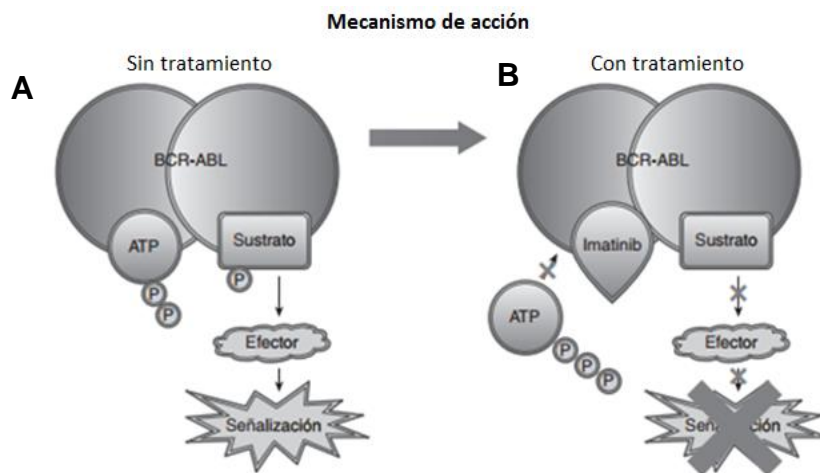
En diciembre de 2002, la FDA aprobó al Mesilato de Imatinib como tratamiento de primera línea en pacientes con LMC demostrando remisiones citogenéticas completas hasta en 87% de los pacientes, con un progresó a fases aceleradas o blásticas del 7% y una supervivencia global del 89% con seguimiento a 60 meses.¹⁴



Esquema 9. Estructura química del Mesilato de Imatinib.³

3.5.1 Mecanismo de acción

Imatinib actúa específicamente bloqueando el lugar de unión para el ATP en la quinasa Abl, lo que inhibe la capacidad de ésta para transferir grupos fosfato desde el ATP a los sustratos, lo que, a su vez, impide la transducción de las señales de energía necesarias para la proliferación celular y la apoptosis inducida por Abl. De este modo, la vía específica de transducción de señales activada anormalmente en el proceso de transformación leucémica resulta inactivada por Imatinib mientras que las vías normales no se ven afectadas.¹⁴



Esquema 10. Mecanismo de acción del Imatinib. (A) La proteína BCR-ABL se une a una molécula de ATP, provocando la fosforilación de diferentes sustratos y por lo tanto, la activación de múltiples vías de señalización de supervivencia y proliferación celular. (B) El Imatinib ocupa el sitio del ATP, impidiendo que este pueda unirse, de esta manera se inhiben las señales inducidas por la proteína.¹⁴

3.5.2 Farmacocinética

En pacientes adultos en fase crónica se administra por vía oral una dosis de 400 mg/día mientras que en fase acelerada y blástica es de 600 mg/día con posibilidad de aumentarlo a 800 mg/día, esto en caso de no conseguir una respuesta hematológica satisfactoria después de al menos tres meses de tratamiento, o no conseguir una respuesta citogenética completa después de doce meses de tratamiento. Niños con LMC en fase crónica la dosis estándar de inicio es de 260 mg/m² mientras que en etapas más avanzadas es de 340 mg/m².¹⁵ Se recomienda primero ingerir alimentos ligeros, esto con el fin de minimizar el riesgo de irritaciones gastrointestinales.¹⁶

El perfil farmacocinético del Imatinib se ha reportado después de la primera administración y en el séptimo día (concentración estable) en 64 pacientes con dosificación diaria. Los resultados obtenidos (tabla 1) han demostrado que el fármaco es rápidamente absorbido a nivel intestinal, alcanzando una concentración máxima (C_{max}) de 1.9 mg/l en el primer día y 2.59 mg/l en el séptimo día alrededor de las 3 horas (t_{max}) logrando una biodisponibilidad del 98% después de una dosis de 400 mg/día, lo que indica la ausencia del efecto de primer paso en el hígado. Una vez que llega a circulación sanguínea, alrededor del 95% se une a proteínas plasmáticas principalmente a albúmina y 1-glucoproteína ácida, encontrándose altas concentraciones de este último en pacientes con LMC.⁵ Es biotransformado principalmente en el hígado por algunas isoenzimas del sistema citocromo P-450, principalmente CYP3A4 y CYP3A5. La vida media (t_{1/2}) se encuentra alrededor de las 16 horas indicando que la administración una vez al

día es adecuada. La mayor parte del Imatinib es eliminado como metabolitos, principalmente el CGP74588 y se elimina principalmente por vía fecal (68%) y renal (13%).¹⁷

Esquema 11. Parámetros farmacocinéticos de Imatinib en adultos. (Desviación estándar).

| Dose (mg) | C _{max} (mg/l) | T _{max} (h) | AUC _{0-24h} (mg/l.h) | Cl (ml/min) | t _{1/2} (hours) |
|--------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------|--------------------------|
| 400 (single dose) | 1.90 (0.35) | 3.1 (2.0) | 24.8 (7.4) | 208.3 (120) | 14.8 (5.8) |
| 400 (steady state) | 2.59 (0.78) | 3.3 (1.1) | 40.1 (15.7) | 186.6 (66.6) | 19.3 (4.4) |

C_{max}: concentration peak; T_{max}: time for concentration peak; AUC: area under the serum concentrations-time curve; Cl: clearance assuming a bioavailability of 100%; t_{1/2}: terminal half-life

3.5.3 Resistencia a Imatinib

Durante los primeros años como tratamiento de primera elección, el Imatinib produjo un cambio radical mejorando la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes. Si bien el Imatinib resultó muy efectivo, pronto se empezaron a documentar casos de pacientes que presentaban intolerancia a dicho fármaco (debido a su toxicidad) o resistencia al mismo.

Actualmente se han descubierto las causas de resistencia a Imatinib, entre las que destacan, de tipo farmacocinético pues se ha observado que la administración crónica puede inducir la sobre-expresión de transportadores de la familia ABC expulsando el fármaco de la célula maligna dando como resultado niveles intracelulares de Imatinib inadecuados y/o niveles plasmáticos bajos causado por el metabolismo del sistema citocromo P450 3A4 lo que limita la biodisponibilidad y en consecuencia la eficacia del Imatinib.²⁶

La familia de los Transportadores ABC (ATP binding cassette) son proteínas que en su mayoría se especializan en el transporte activo primario de sustancias,

dependen de la hidrólisis del ATP para bombear los sustratos a través de la membrana plasmática.¹⁸ La glucoproteína P (gp-P, MDR1) fue el primer transportador ABC descubierto, se localiza en la membrana plasmática de las células y tiene amplia distribución en los tejidos del cuerpo humano (células epiteliales del intestino, canalículos biliares del hepatocito, células del tubo proximal del riñón, etc.)^{19,40} Muchos pacientes con LMC, presentan sobreexpresión de gp-P, confiriéndole cierta resistencia pues no solo tiene la capacidad de transportar hacia el exterior de la célula tumoral el fármaco, sino que además disminuye la entrada de esta, generando una disminución en la concentración intracelular mediante un mecanismo de transporte dependiente de ATP.^{27,42,43}

Por otra parte, los citocromos son enzimas que participan en el metabolismo de los fármacos encontrándose principalmente en el hígado y en menor proporción en el epitelio intestinal, presentan una amplia especificidad de sustrato, de manera que fármacos con diferentes estructuras químicas pueden ser metabolizados por una misma proteína enzimática.²⁰ El Imatinib es metabolizado por las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5 provocando niveles plasmáticos bajos, limitando la biodisponibilidad y por lo tanto, la eficacia del fármaco.^{38,44,46}

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien el Imatinib ha resultado muy efectivo en el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica, se han documentado casos de pacientes que presentan resistencia al fármaco, la cual es causada por diferentes mecanismos, entre ellos, de tipo farmacocinético limitando la eficacia del fármaco. Es por ello que es importante contar con métodos analíticos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que permitan el monitoreo del Imatinib en estudios de farmacocinética con el fin de realizar investigaciones que nos ayuden a revertir dicha resistencia generada tras la administración crónica del medicamento, los cuales deben de cumplir con los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013, la cual indica que todo análisis de muestras biológicas en estudios de biodisponibilidad debe de ser validado, esto con el fin de asegurar que los resultados que se obtienen son confiables y que el método es sensible, preciso, exacto y reproducible, teniendo en cuenta la optimización del tiempo, la reducción de costos, el volumen de muestra y la simplicidad para llevar a cabo el estudio.

5. HIPÓTESIS

El desarrollo de un método bioanalítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) permitirá la cuantificación de Imatinib en plasma de ratas obteniendo resultados confiables, precisos, exactos y reproducibles, lo que permitirá aplicarlo a estudios de farmacocinética.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un método bioanalítico simple, sensible, preciso y reproducible para la determinación de Imatinib por HPLC en plasma de rata y su aplicación en estudios de farmacocinética.

Objetivos Particulares

1. Evaluar los parámetros de validación del sistema para la cuantificación del Imatinib por HPLC.
2. Determinar los parámetros de validación del método para la cuantificación de Imatinib en plasma por HPLC.
3. Aplicar el método validado para determinar la farmacocinética del Imatinib en ratas y sus respectivos parámetros (V_d , ABC , $t_{1/2}$ y C_{max}).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Experimental - prolectivo - longitudinal - comparativo.

Población: Ratas Wistar.

Criterios de inclusión: Ratas Wistar machos sanos de 250 g aproximadamente.

Criterios de exclusión: Ratas Wistar hembras.

Criterios de eliminación: Ratas que se murieron durante el estudio farmacocinético.

Variables dependientes: Concentración de Imatinib, Ratas Wistar.

Variables independientes: Respuesta del Cromatógrafo.

Análisis estadístico: Coeficiente de correlación de Pearson.

7.1 Material

Pipetas de 10, 20, 100, 200 y 1000 μ L

Columna Symmetry C-18 5 μ m (3.9 x 150 mm)

Tubos Eppendorf de 2 mL

Tubos Eppendorf de 1.5 mL con 30 μ L de Heparina

Estuche de Canulación

Reactivos

Mesilato de Imatinib Santa Cruz Biotechnology[®]

Clorhidrato de Erlotinib Santa Cruz Biotechnology[®]

Nitrógeno líquido

Acetonitrilo grado HPLC Meyer®

Metanol grado HPLC Burdick & Jackson®

Trietilamina al 99% Sigma-Aldrich®

Cloruro de Metileno EM Science®

Agua Milli-Q Reagent Water (Millipore®)

Heparina Sigma-Aldrich®

Isoflurano Baxter®

Material biológico

Ratas Wistar de 250 gramos

Equipos

Balanza analítica Scientech®

Centrifuga MIKRO 22R®

Vaporizador de flujo continuo para anestésico Cyprane® Keighley®

HPLC Water Alliance 2695®

Detector UV/visible Water Alliance 2489®

7.2 Metodología

7.2.1 Condiciones cromatográficas

HPLC Waters Alliance 2695 con detector UV/visible 2489 a 264 nm. Fase móvil: Trietilamina – Acetonitrilo. Flujo: 1.8 mL/min. Columna Symmetry C-18 5 μ m (3.9 x 150 mm). Temperatura de la muestra: 10°C y Temperatura de la columna: 26°C

7.2.2 Validación del sistema

Todos los stock se prepararon usando agua Milli Q. A partir del stock primario de 10 mg/mL de Imatinib se elaboraron los stock de trabajo de 10, 25, 50 y 100 μ g/mL, con ellos se prepararon por duplicado en cada día de validación (3 días de validación) 100 μ L de cada estándar analítico de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μ g/mL (6 curvas de calibración). Posteriormente, a cada estándar analítico se adicionó 16 μ L de una dilución de 100 μ g/mL de Erlotinib (estándar interno), dichas muestras fueron leídas en el HPLC bajo las condiciones mencionadas anteriormente. A partir de la relación de alturas (Imatinib/Erlotinib) que se obtuvieron de los cromatogramas (Water[®] Empower[®] Software) y de sus respectivas concentraciones, se calcularon los parámetros de precisión y de linealidad del sistema.

Linealidad

Se elaboró una curva de calibración (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μ g/mL) del promedio de las 6 curvas totales que se obtuvieron en los 3 días de validación. Por medio del coeficiente de correlación de Pearson se describió el grado de relación entre la

respuesta cromatográfica de cada nivel de concentración en la curva de calibración obteniéndose el coeficiente de determinación (r^2) y la ecuación matemática $y = mx + b$.

Precisión

A partir del promedio de los datos obtenidos de las 6 curvas de calibración se calculó el coeficiente de variación (%CV) de cada nivel de concentración.

7.2.3 Validación del método

Para los parámetros de Linealidad, Precisión, Limite de Detección y Limite de Cuantificación se prepararon por duplicado en cada día de validación (3 días de validación) 100 μ L de estándar de plasma de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μ g/mL (6 curvas estándar) con los estándares de trabajo que se usaron en la validación del sistema y plasma de ratas Wistar. Posteriormente, se adicionó a cada estándar 16 μ L de una dilución de 100 μ g/mL de Erlotinib (EI).

Método de extracción

Una vez concluido el paso anterior, a cada estándar de plasma se le añadió 1.5 mL de cloruro de metileno, se vortexearon, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, las muestras se congelaron a -20°C por 5 minutos y 1 mL de la fase orgánica fue transferida a tubos de vidrio de 15 mL, dicha fase se evaporó con corriente de Nitrógeno líquido. El residuo se resuspendió con 100 μ L de fase móvil, posteriormente se inyectó al sistema cromatográfico 20 μ L de muestra y se realizó la lectura a 264 nm bajo las condiciones ya mencionadas. Con la relación de alturas (Imatinib/Erlotinib) que se obtuvieron de los cromatogramas y de sus

respectivas concentraciones, se calcularon los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, porcentaje de recuperación, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad.

Selectividad

A través de los cromatogramas se evaluó la selectividad del método, analizando las posibles interferencias cerca del tiempo de retención del Imatinib y del Erlotinib (EI) que pudieran afectar la cuantificación de estos fármacos en la matriz biológica (plasma).

Linealidad

Se elaboró una curva de calibración (0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL) a partir del promedio de las 6 curvas totales que se obtuvieron en los 3 días de validación. Por medio de un análisis de regresión lineal se obtuvo la ecuación matemática $y = mx + b$ y el coeficiente de determinación (r^2) describiendo la relación entre la respuesta cromatográfica con su respectiva concentración.

A partir de la altura de los picos del Imatinib que se obtuvieron de los cromatogramas de las 6 curvas totales y aplicando los cálculos correspondientes se obtuvo el promedio del % de recuperación de dicho fármaco.

Precisión

Dicho parámetro se evaluó a través de la repetibilidad y de la reproducibilidad. En el primer caso, se calculó el %CV de cada nivel de concentración con los datos obtenidos del promedio de las 6 curvas de calibración. Para la reproducibilidad, se

calculó el %CV a partir del promedio de las dos curvas que se realizaron en cada día de validación (3 días de validación).

Exactitud

Se prepararon en un día por triplicado estándares analíticos de concentraciones de 0, 0.8, 1.6, 6 y 12 µg/mL y se procedió a realizar el método de extracción que se describió previamente. Se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) para cada concentración empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de desviación} = \left| \frac{\text{valor nominal} - \text{valor calculado}}{\text{valor nominal}} \right| \times 100$$

Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Con los datos de la pendiente (b) y de la desviación estándar (S_e) del promedio de los valores de 0.5, 1 y 2 µg/mL de las 6 curva de calibración, se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) con las siguientes formulas:

$$LD = \frac{3.3(S_e)}{b} \quad LC = \frac{10(S_e)}{b}$$

Cabe mencionar que para dar validez a los cálculos, el coeficiente de determinación de la linealidad debe ser mayor al 98%.

Estabilidad

A fin de investigar la integridad del fármaco bajo condiciones operacionales y de almacenamiento se llevaron a cabo estudios de estabilidad de muestras plasmáticas y de residuo seco.

Para el primer caso, se prepararon por triplicado estándares de plasma de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL (sin estándar interno) y se almacenaron a -20°C por un mes. Concluido ese periodo se procedió a realizar el método de extracción que se describe anteriormente.

Por otro lado, se prepararon estándares de plasma de 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL, se procedió a realizar el método de extracción hasta la obtención del residuo seco, y posteriormente, se guardaron en el congelador a -20°C por un mes. Al concluir dicho tiempo, las muestras se resuspendieron con 100 µL de fase móvil y se procedió a realizar la lectura en el HPLC bajo las condiciones ya mencionadas.

Para ambos casos, la relación de alturas (Imatinib/Erlotinib) que se obtuvieron de los cromatogramas (Water[®] Empower[®] Software) de cada concentración fueron interpoladas en la curva de calibración y las concentraciones obtenidas se compararon con su respectiva concentración nominal.

7.2.4 Estudio de farmacocinética

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano, posteriormente, se realizó el procedimiento de canulación en la vena caudal, introduciendo un tubo de polietileno para facilitar la toma de muestras sanguínea. Posteriormente, a cada rata se le administró 50 mg/kg de Imatinib vía oral. A los tiempos 0, 5, 10, 15, 3

min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 hrs se recolectaron 300 μ L de muestra sanguínea en tubos Eppendorf con 20 μ L heparina y se centrifugaron a 10, 000 rpm por 10 min a 4°C. 100 μ L de plasma de cada muestra se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL, posteriormente se sometieron al método de extracción mencionado anteriormente finalizando con las lecturas proporcionadas por el HPLC. La relación de alturas (Imatinib/Erlotinib) que se obtuvieron de los cromatogramas de cada tiempo de muestreo fueron interpoladas en la curva de calibración. Se utilizó el software WinNonlin[®] Professional[®], programa especializado en este tipo de estudios que nos proporcionó los parámetros farmacocinéticos.

8. RESULTADOS

8.1 Validación del sistema

En la figura 1 un Cromatograma típico, después de la inyección de una solución de Imatinib (A) y de su estándar interno Erlotinib (B).

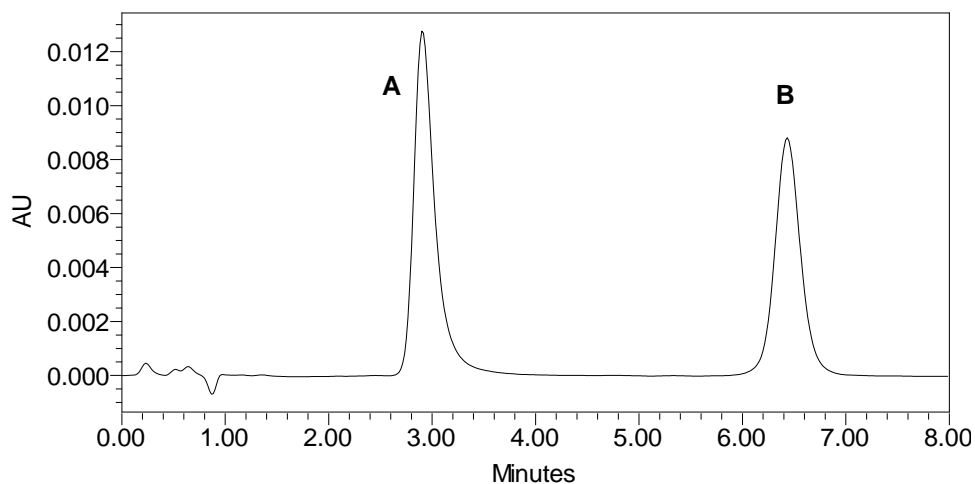


Figura 1. Cromatograma de la validación del sistema a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Imatinib (A) con 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del estándar interno (B).

8.1.1 Linealidad

La figura 2 muestra la curva de calibración de los valores del promedio de las 6 curvas obtenidas en un rango de concentraciones de 0 a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con su respectiva ecuación matemática $y = mx + b$ y coeficiente de determinación (r^2).

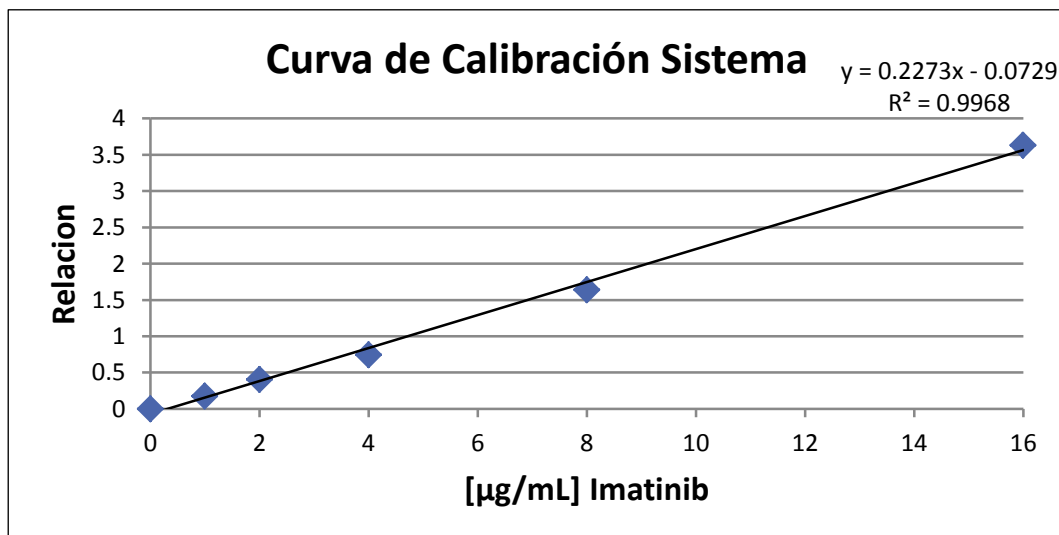


Figura 2. Promedio de las 6 curvas de calibración del sistema. El criterio de aceptación es un coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.99 .

8.1-2 Precisión

La tabla 1 nos muestra que el coeficiente de variación de cada nivel de concentración cumple con el criterio de aceptación ($\%CV \leq 3\%$).

| Tabla 1. Precisión del sistema en solución acuosa (n=6) | | | |
|---|----------|--------|------|
| [Imatinib] | Promedio | D.E | % CV |
| 1 µg/mL | 0.177 | 0.0045 | 2.56 |
| 2 µg/mL | 0.409 | 0.0116 | 2.84 |
| 4 µg/mL | 0.748 | 0.0205 | 2.74 |
| 8 µg/mL | 1.642 | 0.0253 | 1.54 |
| 16 µg/mL | 3.633 | 0.0756 | 2.02 |

8.2 Validación del método

8.2.1 Selectividad

La figura 3 muestra los cromatogramas de una muestra blanco y un estándar de plasma de 16 µg/mL, no se observan interferencias próximas al tiempo de retención que afecten la cuantificación del Imatinib.

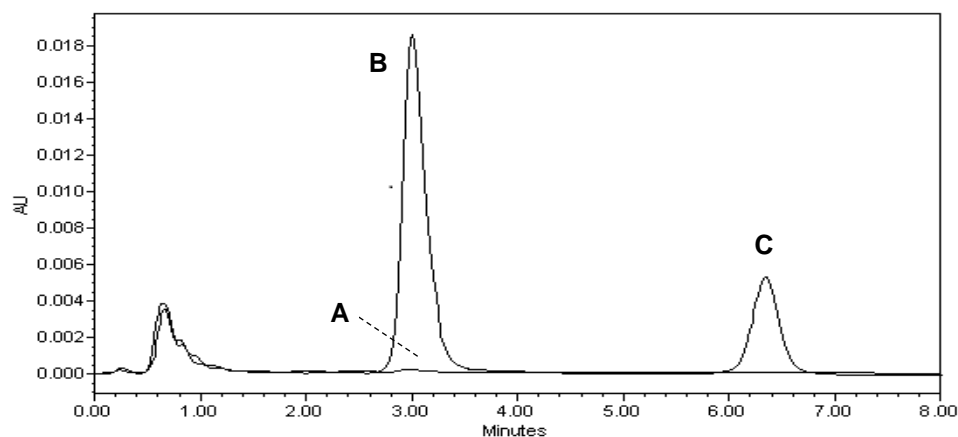


Figura 3. Cromatogramas del blanco (A) y del estándar de plasma de 16 µg/mL (B) con el estándar interno (C)

8.2.2 Linealidad

La figura 4 muestra la curva de calibración de los valores del promedio de las 6 curvas obtenidas en un rango de concentraciones de 0 a 16 µg/mL con su respectiva ecuación matemática $y = mx + b$ y coeficiente de determinación (r^2).

De acuerdo a los cálculos correspondientes el porcentaje de recuperación del Imatinib fue del 98.52%, este valor cumple con el criterio de aceptación (El % de concentración recuperada debe estar dentro del 15% de la concentración nominal).

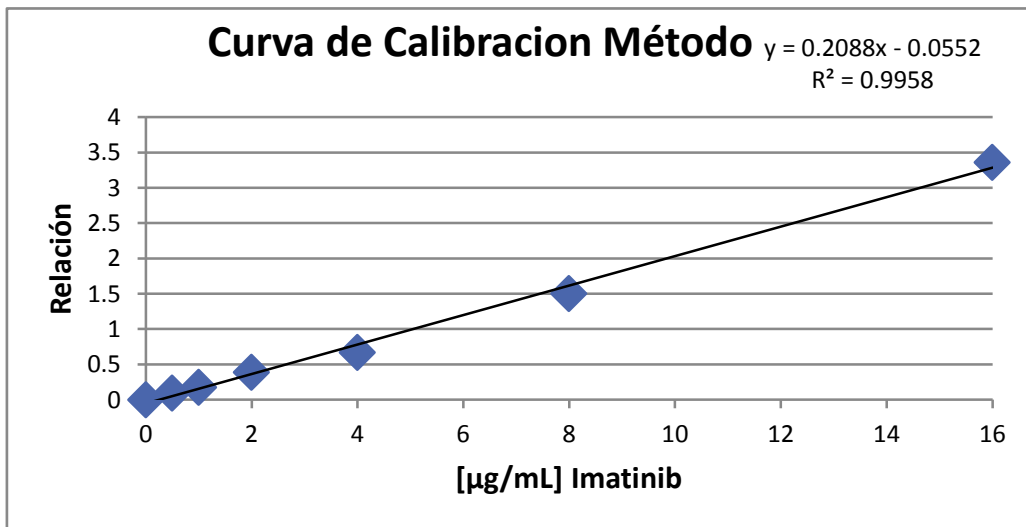


Figura 4. Promedio de las 6 curvas de calibración del método. El criterio de aceptación es un coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.99 .

8.2.3 Precisión

La reproducibilidad (interdía) se calculó del promedio de las 6 curvas totales (3 días de validación) de cada concentración. El %CV de cada nivel de concentración cumple con los criterios de aceptación (% CV ≤ 15 %.)

| Tabla 2. Reproducibilidad (interdía) n = 6 curvas | | | |
|---|----------|-------|------|
| [Imatinib] | Promedio | D.E | % CV |
| 0.5 µg/mL | 0.094 | 0.007 | 8.09 |
| 1 µg/mL | 0.173 | 0.012 | 6.92 |
| 2 µg/mL | 0.387 | 0.016 | 4.30 |
| 4 µg/mL | 0.670 | 0.035 | 5.26 |
| 8 µg/mL | 1.503 | 0.096 | 6.38 |
| 16 µg/mL | 3.363 | 0.107 | 3.19 |

En el caso de la repetibilidad (intradía), se calculó el %CV a partir del promedio de las dos curvas que se realizaron en cada día de validación (3 días de validación). El %CV de cada nivel de concentración cumple con los criterios de aceptación (% CV ≤ 15 %.)

Tabla 3. Repetibilidad día 1 (curva 1 y 2)

| [Imatinib] | Promedio | D.E | % CV |
|------------|----------|-------|-------|
| 0.5 µg/mL | 0.097 | 0.010 | 10.87 |
| 1 µg/mL | 0.183 | 0.007 | 3.86 |
| 2 µg/mL | 0.371 | 0.007 | 2.10 |
| 4 µg/mL | 0.631 | 0.028 | 4.59 |
| 8 µg/mL | 1.483 | 0.053 | 3.62 |
| 16 µg/mL | 3.269 | 0.019 | 3.15 |

Tabla 4. Repetibilidad día 2 (curva 3 y 4)

| [Imatinib] | Promedio | D.E | % CV |
|------------|----------|-------|------|
| 0.5 µg/mL | 0.097 | 0.008 | 8.74 |
| 1 µg/mL | 0.161 | 0.009 | 5.69 |
| 2 µg/mL | 0.386 | 0.012 | 3.11 |
| 4 µg/mL | 0.658 | 0.031 | 5.04 |
| 8 µg/mL | 1.614 | 0.028 | 1.75 |
| 16 µg/mL | 3.313 | 0.123 | 3.73 |

Tabla 5. Repetibilidad día 3 (curva 5 y 6)

| [Imatinib] | Promedio | D.E | % CV |
|------------|----------|-------|------|
| 0.5 µg/mL | 0.090 | 0.004 | 4.71 |
| 1 µg/mL | 0.177 | 0.009 | 5.55 |
| 2 µg/mL | 0.404 | 0.011 | 2.80 |
| 4 µg/mL | 0.700 | 0.019 | 2.72 |
| 8 µg/mL | 1.377 | 0.074 | 5.38 |
| 16 µg/mL | 3.463 | 0.041 | 2.59 |

8.2.2 Exactitud

Se calculó el % de desviación para cada concentración (0.8, 1.6, 3, 6 y 12 µg/mL) empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de desviación} = \left| \frac{\text{concentración nominal} - \text{concentración concentrada}}{\text{concentración nominal}} \right| \times 100$$

| Tabla 6. Exactitud del método n = 3. | | | |
|--------------------------------------|------------|-------|------------|
| [Imatinib] | [Promedio] | D.E | % de desv. |
| 0.8 µg/mL | 0.74 | 0.037 | 7.50 |
| 1.6 µg/mL | 1.51 | 0.040 | 5.25 |
| 6 µg/mL | 5.74 | 0.078 | 4.33 |
| 12 µg/mL | 11.49 | 0.171 | 4.25 |

8.2.5 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ)

Con la pendiente ($b = 0.9938$) y de la desviación estándar ($S_e = 0.0316$) del promedio de los valores de 0.5, 1 y 2 µg/mL de las 6 curva de calibración, se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) con las siguientes formulas:

$$LD = \frac{3.3(S_e)}{b} = 0.1052 \text{ µg/mL} \quad LC = \frac{10(S_e)}{b} = 0.318 \text{ µg/mL}$$

8.2.6 Estabilidad

Con la finalidad de investigar la integridad del fármaco bajo condiciones operacionales y de almacenamiento se llevaron a cabo estudios de estabilidad de muestras plasmáticas y de residuo seco. En ambos casos, los resultados obtenidos se interpolaron en una curva de calibración y las concentraciones

obtenidas se compararon contra la concentración nominal. Las tablas 8 y 9 nos muestran que cada nivel de concentración cumple con el criterio establecido (la concentración promedio de cada nivel \leq 15% de la concentración nominal).

| Tabla 7. Estabilidad de muestras plasmáticas almacenadas a -20°C por un mes | | | |
|---|------------|-------|------------|
| [Imatinib] | [Promedio] | D.E | % de desv. |
| 0.5 µg/mL | 0.46 | 0.024 | 7.4% |
| 1 µg/mL | 0.92 | 0.055 | 7.9% |
| 2 µg/mL | 1.90 | 0.059 | 5.1% |
| 4 µg/mL | 3.67 | 0.166 | 8.2% |
| 8 µg/mL | 7.44 | 0.178 | 6.9% |
| 16 µg/mL | 15.34 | 0.181 | 4.1% |

| Tabla 8. Estabilidad de residuo seco almacenadas a -20°C por un mes | | | |
|---|------------|-------|------------|
| [Imatinib] | [Promedio] | D.E | % de desv. |
| 0.5 µg/mL | 0.45 | 0.017 | 9.2% |
| 1 µg/mL | 0.91 | 0.043 | 8.1% |
| 2 µg/mL | 1.85 | 0.062 | 7.3% |
| 4 µg/mL | 3.69 | 0.083 | 7.5% |
| 8 µg/mL | 7.73 | 0.106 | 3.4% |
| 16 µg/mL | 15.27 | 0.170 | 4.4% |

8.3 Farmacocinética

A manera de ilustración se observa en la figura 5 un cromatograma de una muestra plasmática tomada a las 4 hrs tras la administración de 50 mg/mL de Imatinib por vía oral (A) y alrededor de los 6 minutos se encuentra el estándar Interno Erlotinib (B), no se observan interferencias próximas al tiempo de retención que afecten la cuantificación del Imatinib en ambos casos.

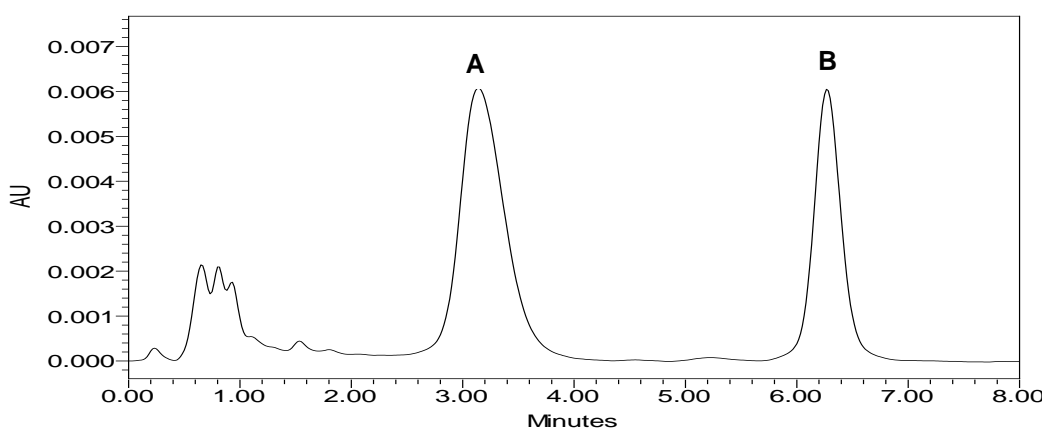


Figura 5. Cromatograma del estudio farmacocinético del Imatinib a las 4 hrs.

Imatinib (A) y Erlotinib (B)

Las concentraciones plasmáticas de Imatinib en función del tiempo tras la administración por vía oral se muestra en la figura 6, observando un incremento de estas hasta alcanzar un máximo y posteriormente una disminución. A partir de esta curva se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos (C_{max} , T_{max} , AUC y $t_{1/2}$), las cuales se muestran en la tabla 10.

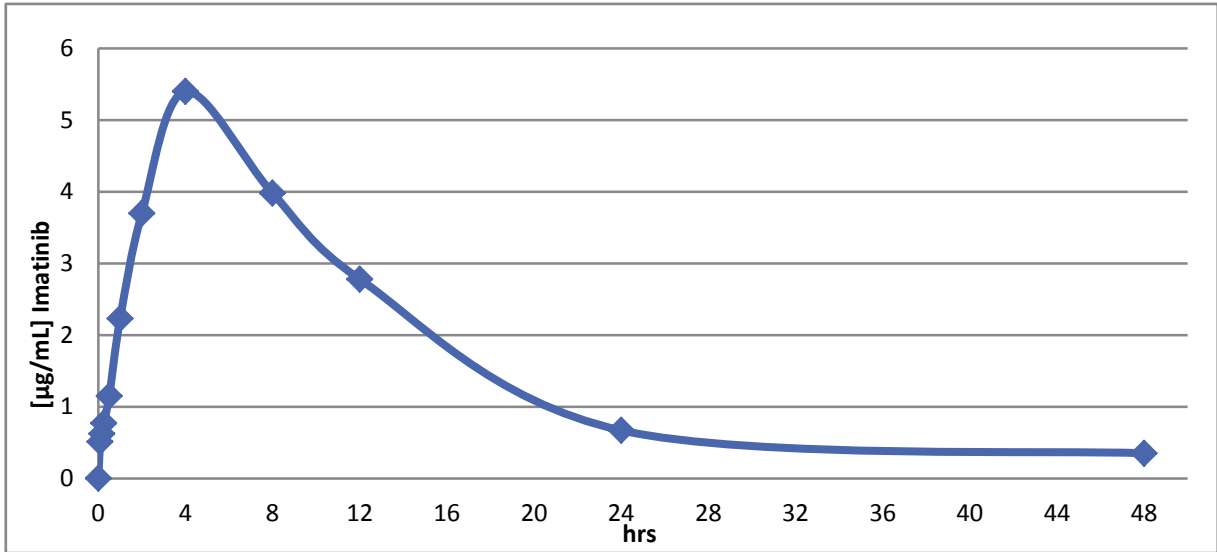


Figura 6. Representación gráfica del perfil farmacocinético del Imatinib en plasma de ratas Wistar

| Tabla 10. Parametros farmacocinéticos del Imatinib en plasma de ratas | |
|---|----------------|
| Cmax | 5.4 µg/mL |
| Tmax | 4 hrs |
| AUC | 65.637 µg.h/mL |
| T _{1/2} | 6.9 hrs |

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La validación es el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que los resultados obtenidos son confiables y que el método es sensible, preciso, exacto, reproducible y adecuado para su propósito.

El desarrollo del método para la extracción del Imatinib en plasma de rata y su posterior cuantificación que se aplicaron en la validación del sistema y del método se basaron en antecedentes de la literatura y en condiciones propias del laboratorio de farmacología, teniendo en cuenta la optimización del tiempo, el volumen de muestra, la reducción de costos y la simplicidad del método para llevar a cabo el estudio

Antes de la validación del método bioanalítico, se realizó la validación del sistema, esto con el fin de asegurar que el equipo, en este caso el HPLC funciona correctamente con base a los criterios preestablecidos. Los resultados indican que los parámetros de linealidad y precisión del sistema cumplen con los criterios de aceptación en un rango de concentraciones de 0 a 16 µg/mL, lo que nos asegura la confiabilidad de los resultados del sistema cromatográfico.

Los resultados obtenidos a partir de nuestro trabajo muestran un coeficiente de correlación (r^2) de 0.9968 indicando que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta y la concentración de Imatinib de 0 a 16 µg/mL, cumpliendo así con el criterio establecido ($r^2 \geq 0.99$) (figura 2). En el caso de la precisión (tabla 2), el coeficiente de variación promedio de las 6 curvas de calibración no fue mayor al 3% (criterio de aceptación) indicándonos que la

precisión del sistema en todas las concentraciones está dentro de los valores establecidos por la norma.

Se seleccionó al Erlotinib como estándar interno, ya que además de tener una estructura y propiedades fisicoquímicas similares al Imatinib, los cromatogramas muestran que el tiempo de retención entre ambos analitos son lo suficientemente diferentes que permiten su cuantificación. Teniendo un tiempo de retención de 6.2 y 3.0 minutos respectivamente.

De acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, todo análisis de muestras biológicas en estudios de biodisponibilidad debe ser validado, esto con el fin de asegurar que los resultados que se obtienen son confiables y que el método es sensible, preciso, exacto y reproducible.

Para el caso de la validación del método, el primer parámetro que se analizó fue la selectividad, el tiempo de retención del Imatinib se encontró alrededor de los 3 minutos mientras que del Erlotinib fue de 6.2 minutos, al comparar los cromatogramas blanco con muestras a diferentes concentraciones en la matriz biológica no se observó ningún pico que interfiera con los tiempos de retención de cada analito que pudiera afectar la cuantificación tanto del fármaco como del estándar interno (figura 3), por lo que se establece que el método desarrollado es selectivo para los dos analitos de interés.

La linealidad del método (figura 4) corresponde a un coeficiente de correlación del 0.9968, dicho valor indica que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta y la cantidad de Imatinib de 0 a 16 µg/mL a 264 nm, cumpliendo así con el criterio establecido ($r^2 \geq 0.99$).

El valor del porcentaje de recuperación del Imatinib fue del 98.52%, indicando una buena recuperación del fármaco por medio del método de extracción cumpliendo así con el criterio de aceptación (el % de recuperación debe estar dentro del 15% de la concentración nominal).

Las tablas 3, 4, 5 y 6 muestran los resultados de la precisión, el %CV de cada nivel de concentración en ningún caso superó el 15% tanto en condiciones de reproducibilidad como de repetibilidad, indicándonos que existe buena concordancia entre los resultados obtenidos, cumpliendo así con el criterio establecido en la NOM-177-SSA1-2013 (%CV < 15 %).

El parámetro de exactitud se evaluó con diferentes concentraciones a las de la curva de calibración (tabla 7) y se calculó % de desviación, se observa que cada nivel de concentración cumple con el criterio de aceptación (% de desv. <15 %), con lo que aseguramos que el método es exacto, es decir, que existe una concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

A partir de la pendiente y de la desviación estándar aplicado en sus respectivas formulas se calculó el límite de detección y de cuantificación, para el primer caso el valor fue de 0.105 µg/mL y para el segundo caso fue de 0.318 µg/mL, es decir, que a partir de este valor se puede cuantificar con precisión y exactitud aceptable.

En el estudio de estabilidad el tiempo y las condiciones de almacenamiento fueron adecuados de acuerdo a las necesidades del estudio, los resultados de la tabla 8 y 9 muestran que tanto las muestras plasmáticas como en residuo seco cumplen con el criterio establecido (cada nivel de concentración deber ser $\leq 15\%$ de la concentración nominal), demostrando así que el Imatinib es estable en la matriz biológica y bajo condiciones de procesamiento almacenados por un mes a -20°C .

Una vez que se validó el método bioanalítico, se realizó la farmacocinética del Imatinib en plasma de ratas por vía oral hasta las 48 hrs, el Cromatograma de la figura 5 muestra la farmacocinética a las 4 hrs, el tiempo de retención del Imatinib se encuentra alrededor de los 3 minutos mientras que el del Erlotinib está a los 6.3 minutos, en ambos casos ninguno muestra alguna interferencia cerca de sus tiempos de retención.

De acuerdo al perfil farmacocinético mostrado en la figura 6 y tabla 10 el Imatinib muestra una rápida absorción en las primeras horas, alcanzando una concentración máxima en circulación sanguínea de $5.4 \mu\text{g/mL}$ alrededor de las 4.0 hrs con un área bajo la curva (AUC) es de $65.637 \mu\text{g.h/mL}$. El tiempo de vida media del Imatinib es de 6.9hrs, lo que nos sugiere que a las 34.5 hrs dicho fármaco se ha eliminado completamente del organismo, pues de acuerdo a la literatura son $5 t_{1/2}$ necesarias para estar seguros que el 100% del fármaco se ha eliminado. Los parámetros farmacocinéticos obtenidos a partir de nuestro estudio son similares a los reportados en la literatura (Validation of an HPLC method for determination of Imatinib Mesylate in rat serum and Its application in a pharmacokinetic Study. Journal of Chromatographic Science vol. 48, 2010)

10. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó un método bioanalítico por HPLC para extraer y cuantificar Imatinib en plasma de ratas bajo los parámetros de la NOM-177-SSA1-2013 y de la FEUM 11° edición, usando Erlotinib como estándar interno en un intervalo de trabajo de 0 a 16 $\mu\text{g/mL}$ y con un límite de cuantificación de 0.318 $\mu\text{g/mL}$, demostrando así que los resultados son confiables, precisos, exactos y reproducibles.

Se aplicó el método validado para cuantificar Imatinib en un estudio de farmacocinética con ratas Wistar, obteniéndose al final la curva tiempo-concentración y sus respectivos parámetros (C_{max} , T_{max} , ABC y $t_{1/2}$).

Con base al trabajo realizado, se concluye que el método desarrollado para la cuantificación de Imatinib por HPLC es adecuado para emplearse en estudios de farmacocinética, con la finalidad de llevar a cabo investigaciones relacionadas con el tratamiento del Imatinib en la Leucemia Mieloide Crónica.

11. PERSPECTIVAS

Evaluar la farmacocinética del Imatinib con y sin sustancias inhibidoras de Pg-P y/o CYP P450 3A4 en ratas Wistar o fármacos que se utilicen en combinación con la terapia de Imatinib.

12. REFERENCIAS

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>. Organización Mundial de la Salud. Consultado el día 20 de julio de 2017
2. Alvarado M, Cardiel M, García A, González L, Hernández E. Consenso de leucemia mieloide crónica por hematólogos del ISSSTE. *Revista de Hematología México* 17 (1): 34-62, 2016.
3. Cruz J, Garrido O, Anguiano L, Rodríguez U, Pérez E, Sánchez J. Imatinib: farmacocinética. *Revista del Hospital Juárez de México* 80 (1): 67-72, 2013.
4. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). Secretaría de Salud. 11° edición, 2014.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de mayo de 2013.
6. Martínez J. Estandarización de un método para la cuantificación de la deshidrogenasa láctica (LDH) como indicador de citotoxicidad y/o muerte celular. Tesis de licenciatura. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 2016.

7. Golan D, Tashjian A, Armstrong J, Armstrong A. Principios de Farmacología Bases Fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. 3° ed. España: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
8. Laurence L, Randa H. Manual de Farmacología y terapéutica Goodman & Gilman. 2° ed. China: Mc Graw Hill, 2014.
9. http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/130/html/sec_12.html. La ciencia para todos. Consultado del día 28 de julio de 2017.
10. Zelaya M, Chavez M, Portillo P. Formulario Terapéutico. Instituto Hondureño de Seguridad Social Unidad de Farmacoterapia. 2010.
11. <https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/staging.html>. American Cancer Society. Consultado el día 27 de julio de 2017.
12. <http://www.aeal.es/leucemia-mieloide-cronica-espana/1-la-sangre-y-la-medula-osea-normales/>. Asociación Española de Afectados por Linfoma, Mieloma y Leucemia. Consultado del 29 de julio de 2017
13. <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cml-treatment-pdq>. National Cancer Institute. Consultado el día 27 de julio de 2017.
14. Avilés S, Chávez A, Mayani H. Inhibidores de cinasas de tirosina (ICT): la nueva revolución en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica. Gaceta Médica de México 149: 646-54, 2013.
15. Levegue D, Maloisel F. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib Mesylate. In vivo review. 19: 77-84, 2005.

16. Golan D, Tashjian Armstrong J, Armstrong W. Principios de Farmacología: Bases Fisiopatológicas del Tratamiento Farmacológico. 3° ed. España: lippincott williams & wilkins; 2012.
17. Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical Pharmakinetics of Imatinib. Clin Pharmacokinetic 44 (9): 879-894, 2005.
18. Álvarez A, Pulido M. Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 7 (6): 296-311, 2008.
19. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros33/glicoprot33.html>.
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Química Orgánica.
Consultado del día 10 de agosto de 2017.
20. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Farmacología Texto y Atlas*. 6° ed. España: Editorial Médica Panamericana, 2010.
21. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf.
Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Consultado el día 17 de agosto de 2017.
22. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, Aguilera M, Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos Generales sobre la validación de métodos". Santiago de Chile: Instituto de Salud Pública de Chile, 2010.
23. Gaotong L, Chenming W, Xiangjun Q, Zhe W, Anyue H, Tao X, Xin K, and Guoxin H. Differential effects of Ketoconazole, itraconazole and voriconazole on the pharmacokinetics of Imatinib and its main metabolite

- GCP74588 in rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40 (12): 1616-1622, 2014.
24. Rodak B, Carr J. *Atlas de Hematología Clínica*. 4° ed. México: Editorial Médica Panamericana, 2014.
 25. <https://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cml-treatment-pdq>. American Cancer Society. Consultado el día 16 de agosto de 2017.
 26. Daininger M, Buchdunger E, Druker J. The development of Imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood Journal*. American Society of Hematology 105: 2640-2653, 2005.
 27. Chen S, Sutiman N, Chowbay B. Pharmacogenetics of drug transporters in modulating imatinib disposition and treatment outcomes in chronic myeloid leukemia & gastrointestinal stromal tumor patients. *Pharmacogenomics Journal*. National Cancer Center Singapore 17: 2016-0124, 2016.
 28. <http://www.biocancer.com/journal/1115/41-receptores-con-actividad-tirosina-kinasa-autofosforilacion>. *Biocancer research journal*. Consultado el día 26 de septiembre de 2017.
 29. Medina R, Sámano J. *Introducción a la Farmacocinética (sistema LADME)*. Universidad Nacional Autónoma de México. Unidad de farmacología Clínica. Consultado el 29 de setiembre de 2017.
 30. <https://www.eupati.eu/es/glossary/area-bajo-la-curva/>. Academia Europea de Pacientes EUPATI. Consultado el 21 octubre de 2017.
 31. Bende G, Koripara S, Movva S, Moorthy G, Saha R. Validation of an HPLC method for determination of Imatinib Mesylate in rat serum and Its

- application in a pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Science* vol. 48, 2010.
32. Ocaña K. Evaluación de la farmacocinética y la eficacia terapéutica de un Sistema liposomal de Cisplatino-Mifepristona en un modelo experimental [Tesis de Maestría]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina, 2004.
 33. Yost R, Ettre L, Conlon R. *Practical Liquid Chromatography an Introduction*. Estados Unidos de America: The Perkin-Elmer Corporation, 1980.
 34. Carranza C, Olvera E, Flores I. *Manual de Validación de Métodos Analíticos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Julio del 2004.
 35. Masques M. *Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico Biológicas*. Mexico: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. PAPIME EN203503, 2004.
 36. Kulkarni P, Karaman A, Gurjar M, Dhoble S, Naik A. Effect of various anticoagulants on the bioanalysis of drugs in rat blood: Implication for pharmacokinetic studies of anticancer drugs. *Springer Plus* 5:2102, 2016.
 37. Esquivel E, Leal L. *Métodos Fisicoquímicos en Biotecnología: Cromatografía en fase reversa*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología, Junio del 2004.
 38. Skoglund K, Richter J, Bergquist J, Aluthgedara W, Kumari J, Vikingsson S. In vivo cytochrome p450 3A4 isoenzyme activity and pharmacokinetics of Imatinib in relation to therapeutic outcome in patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Wolters Kluwer Health* 38:2, 2016.

39. Alvarado H, García R, Espina G. Leucemia Mieloide Crónica: Concepto actuales. *Revista Medico Científica* 18:1, 2010.
40. Deininger M, Buchdunger E, Druker B. The development of Imatinib as a therapeutic agent for Chronic Myeloid Leukemia. *The American Society of Hematology* 105:7, 2005.
41. Chávez M, Ayala M, Mayani M. La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica* 61 (3): 221-232, 2009.
42. Mahon F, Belloc F, Legarde V, Chollet C, Moreau F, Reiffers J, Goldman J, Melo J. MDR1 gene overexpression confers resistance to Imatinib Mesylate in leukemia cell line models. *The American Society of Hematology: Blood* 101: 6, 2003.
43. Silva k, Silva P, Nestal G, Moellmann A, Vasconcelos F. XIAP and P-glycoprotein co-expression is related to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Elsevier* 37: 1350-1358, 2013.
44. Rumjanek V, Vidal R, Maia R. Multidrug resistance in chronic myeloid leukemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines?. *Bioscience Reports* 33(6), 2013.
45. Romero E, Mucientes A, Pedrido E, Lago N, Constenia L, Arias I. Efectividad y toxicidad de Erlotinib en la farmacoterapia del cáncer de pulmón no microcítico. *Farmacía Hospitalaria* 36 (2): 68-76, 2012.
46. Filppula A, Laitila J, Neuvonen P, Backman J. Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates. *British Journal of Pharmacology* 165: 2787-2798, 2012.

