

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES SANGUÍNEOS EN ENSAYOS PRECLÍNICOS. ¿POR QUÉ Y PARA QUÉ?

GONZALO SANTIAGO¹, FACUNDO J. SALINAS¹, ENZO CABAÑA², ANTONELA STASSI^{1, 2},
HUGO H. ORTEGA^{1, 2}, GUSTAVO J. HEIN^{1, 3}

¹Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Esperanza, Santa Fe, ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Esperanza, Santa Fe, ³Centro Universitario Gálvez, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Gálvez, Santa Fe, Argentina

Resumen El descubrimiento de un nuevo principio activo farmacéutico implica estudios preclínicos, que tienen como objetivo demostrar que es eficaz y seguro para un posterior ensayo en seres humanos. Esto conduce a la necesidad de desarrollar tecnologías que aprovechen las nuevas herramientas analíticas disponibles dentro de un contexto donde los resultados de las pruebas realizadas, estén plenamente documentados, bajo sistemas de buenas prácticas de laboratorio auditables. En esta revisión se actualizan y describen algunos de los ensayos realizados en la etapa preclínica del desarrollo de un nuevo fármaco y el estado actual de la tecnología analítica empleada para el dosaje de diferentes biomarcadores sanguíneos de interés. Se analizaron los biomarcadores más relevantes, las normativas de validación de las técnicas analíticas empleadas para su determinación y los problemas que se presentan al tratar de aplicarlas.

Palabras clave: estudios preclínicos, técnicas analíticas, biomarcadores sanguíneos, validación, buenas prácticas de laboratorio

Abstract *Development and validation of analytical techniques for the determination of blood biomarkers in preclinical trials. Why and what for?* New drug discovery involves preclinical studies to demonstrate its effectivity and safety for further tests in humans. This leads to the need to develop technologies that take advantage of the new analytical tools available within a context where the results of the tests carried out are fully documented, under auditable systems of good laboratory practice. This review updates and describes some of the tests carried out in the preclinical stage of the development of a new drug and the current state of the analytical technology used to measure different blood biomarkers of interest. Biomarker parameters were analyzed at the physiological level, considering both the validation regulations of the analytical techniques used for their determination as the problems that arise when trying to apply them, since many of these biomarkers are endogenous compounds in the used matrices.

Key words: preclinical studies, analytical techniques, blood biomarkers, validation, good laboratory practices

PUNTOS CLAVE Conocimiento actual

- El descubrimiento de un nuevo principio activo comprende el estudio sobre los procesos de obtención, caracterización de la actividad y estudios preclínicos para evaluar su toxicidad. El uso de biomarcadores bioquímicos como criterios de valoración sustitutos, se encuentra en auge para diferentes modelos experimentales.

Contribución del artículo al conocimiento actual

- En esta revisión, se evalúa la validación apropiada de técnicas empleadas para el dosaje de biomarcadores bioquímicos en estudios preclínicos, bajo normas BPL, y se describen los inconvenientes asociados al bajo volumen de muestra disponible, y al cumplimiento de las normas vigentes supeditado a las realidades de los laboratorios analíticos.

El descubrimiento de un nuevo principio activo comprende el estudio de los procesos de síntesis, el aislamiento desde una fuente natural o la obtención biotecnológica, la caracterización de su actividad y la fase preclínica completa, donde se incluye la evaluación toxicológica. Estos estudios tienen como objetivo demostrar que el compuesto es aceptable, en cuanto a su eficacia y seguridad, para un ensayo en seres humanos en las diferentes fases clínicas. Se ha descrito que solo 1 de cada 10 000 moléculas descubiertas, con posible actividad terapéutica, pasa a la fase de desarrollo farmacéutico, 1 de cada 100 000 supera los ensayos clínicos y logra registrarse, y solo 3 de cada 10 nuevos medicamentos registrados recuperan su inversión inicial^{1, 2}. Por otra parte, en los casos de medicamentos oncológicos que superan exitosamente las etapas preclínicas y clínicas y llegan al registro, pueden tener un recuperado de las inversiones cercano a 55 dólares por cada dólar invertido³. Por este motivo, el diseño racional de fármacos y de métodos para su estudio constituye una herramienta indispensable en el desarrollo actual de nuevos medicamentos, contribuyendo al aumento de las posibilidades de éxito y a una disminución de los costos.

Evaluación de fármacos y dispositivos biomédicos. Estudios preclínicos

En la actualidad, se descubren o sintetizan cada año más de 1000 nuevos productos entre sustancias químicas, medicamentos, cosméticos, plaguicidas, aditivos alimentarios, etc. Al respecto, y de acuerdo al avance de la investigación biológica en medicina humana y veterinaria, resulta indiscutible la importancia que han tenido los modelos animales. Las sustancias mencionadas anteriormente, ya sea en las etapas de investigación básica o en las preclínicas, deben estudiarse mediante el

desarrollo de protocolos experimentales adecuados que, cualquiera sea su naturaleza, implican la interacción de reactivos físicos, químicos y/o biológicos.

Sumado a esto, los cambios continuos en las tecnologías de dispositivos médicos plantean desafíos únicos en la evaluación de la biocompatibilidad de los productos. Por ejemplo, la valoración de los productos polimerizados *in situ* requiere especial atención en la selección y el diseño de los ensayos adecuados para evaluar la toxicidad potencial de los monómeros y otras sustancias químicas involucradas en el proceso de polimerización. Estos dispositivos requieren estudios especiales de implantación para documentar el curso completo de la degradación y reabsorción del mismo, a fin de demostrar que el sitio del implante no se altera de manera significativa y que la degradación no produce efectos tóxicos. Para la correcta evaluación de los resultados, las presentaciones ante los organismos de control deben incluir una justificación de la elección de los ensayos realizados y la validación de todos los métodos y técnicas aplicadas, siguiendo estándares basados en normas internacionales⁴⁻⁷. Además, es esencial que todos los datos, incluyendo los resultados de las pruebas realizadas, estén plenamente documentados, bajo sistemas de buenas prácticas de laboratorio auditables⁸.

La primera parte del estudio de nuevos fármacos consiste en la realización de pruebas físicas y químicas orientadas a determinar principalmente la susceptibilidad a la degradación de moléculas potencialmente útiles. Usualmente las moléculas más inestables son rápidamente descartadas o se modifican químicamente para aumentar su estabilidad. Posteriormente, las moléculas más estables son evaluadas en su actividad biológica en diversos modelos experimentales, incluyendo cultivos celulares, órganos aislados, ensayos en animales de experimentación, etc. El uso de modelos animales presupone que los principios fisiológicos y patológicos básicos son comunes en diferentes especies, sobre todo si comparten características genéticas. Este supuesto rara vez se cumple debiendo realizarse pruebas en más de una especie, como lo determina la autoridad regulatoria de cada país⁹.

Las pruebas biológicas son los primeros ensayos que se realizan para comprobar tanto la eficacia como la seguridad de un nuevo fármaco y pueden llegar a condicionar la continuidad del estudio y el desarrollo. La prueba de eficacia no solo implica la observación del efecto propiamente dicho, sino un estudio toxicocinético, farmacocinético y farmacodinámico. Las pruebas de seguridad en esta fase deben contemplar la determinación global de la toxicidad (aguda, subaguda y crónica), los posibles efectos sobre el sistema reproductor y la embriogénesis, y la posibilidad de mutagénesis y/o carcinogénesis. En estas pruebas se usan dosis muy superiores a aquellas que se supone serán usadas definitivamente en la clínica,

lo que permite la detección de respuestas tóxicas de baja frecuencia. Todos estos procedimientos están comprendidos dentro de la fase preclínica del estudio de nuevos fármacos, debido a que pueden conducir a la prueba del nuevo fármaco en humanos, etapa que se conoce como fase clínica. En la fase preclínica es crucial la selección adecuada del modelo experimental, ya que al costo del ensayo se le suma el de la síntesis del nuevo producto que en general es muy elevado. Esto ha llevado a la necesidad de utilizar animales de baja masa corporal (como los ratones, de 25 gramos aproximadamente), donde se reduce significativamente el volumen de las sustancias a administrar y consecuentemente se reduce el volumen de la muestra de sangre a obtener en cada punto de muestreo para la determinación de biomarcadores asociados a la toxicidad¹⁰.

El uso de biomarcadores como sustitutos de los resultados en ensayos clínicos, deben cumplir con determinados criterios, como por ejemplo: ser confiables de acuerdo a la recopilación de datos de seguridad adecuados; demostrar una clara asociación entre el resultado subrogado (biomarcador) y la capacidad para predecir beneficios significativos en los pacientes; estudios aleatorizados de drogas de la misma clase que demuestren que cambios en el sustituto conduce a mejorías clínicas relevantes; evidencia de efectos precisos y duraderos al usar los sustitutos y beneficios que superen los daños, entre otros aspectos¹¹.

Definiciones de biomarcador

Diferentes publicaciones han descripto la aplicación de biomarcadores en el desarrollo de fármacos, utilizando diversas nomenclaturas para describir aspectos distintos de este proceso^{4, 5, 12}. La estandarización de la terminología para facilitar la comprensión de la literatura conduce a la definición consensuada de que un biomarcador es un indicador que mide y evalúa objetivamente los procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. El punto final clínico se define como una variable que mide cómo los pacientes se sienten, funcionan o sobreviven, mientras que el punto final sustituto, es un biomarcador que está destinado a sustituir el punto final clínico. En este caso, se espera que un parámetro sustituto, prediga el beneficio clínico. Otra distinción crítica que debe hacerse cuando un biomarcador experimenta una validación del método analítico, es compararlo con una calificación clínica.

El uso de biomarcadores como criterios de valoración sustitutos en un ensayo clínico, requiere la unificación de los criterios de valoración clínicos que se están sustituyendo, la clase de intervención terapéutica que se aplica y las características de la población y el estado de la enfermedad en el que se realiza la sustitución. El término

sustituto significa literalmente “sustituir”; por lo tanto, se desaconseja el uso del término marcador sustituto porque el término sugiere que la sustitución es por un marcador, más que por un criterio de valoración clínico¹¹.

La validación del método analítico es el proceso de evaluación del ensayo, sus características de rendimiento y las condiciones óptimas que generarán la reproducibilidad y exactitud del ensayo. La calificación clínica es el proceso probatorio de vincular un biomarcador con procesos biológicos y puntos finales clínicos. Mientras que la “validación” y la “calificación” o “evaluación” se han utilizado indistintamente en la literatura, la distinción debe hacerse para describir adecuadamente la fase particular que el biomarcador está atravesando en el proceso de desarrollo de fármacos. Como tal, el término “validación” está reservado para los métodos analíticos, y la “calificación” para la evaluación clínica de los biomarcadores. Tanto los procesos de validación como los de calificación están entrelazados y, por lo tanto, su integración guía el desarrollo de biomarcadores con el principio de vincular un biomarcador con su uso previsto⁵.

Importancia de los biomarcadores en ensayos preclínicos

En los últimos años, los biomarcadores clínicos integran parte del diagnóstico y seguimiento de numerosas enfermedades. En este sentido, un biomarcador se define como una sustancia elaborada por un tejido específico que puede ser detectada en la circulación sanguínea. Para ser útil desde el punto de vista clínico, debe liberarse en una cantidad proporcional a la evolución del proceso patológico concreto y proporcionar información sobre la presencia, gravedad y el pronóstico de la enfermedad¹². Lo ideal sería que el biomarcador fuera estable y fácil de detectar mediante análisis disponibles, rápidos y económicos. Sin embargo, esto no sucede en el caso de animales de laboratorio, debido a que los diseños de estudios se basan generalmente en la medicina humana y en las principales especies de interés veterinario. Los biomarcadores se utilizan en medicina habitualmente para evaluar la función de diferentes órganos. El número de biomarcadores con potencial interés clínico crece cada año, y muchos de ellos han sido aprobados por agencias reguladoras o están en fases avanzadas de investigación. Clásicamente, por ejemplo, la urea y la creatinina son biomarcadores para controlar la función renal, y la bilirrubina total, fosfatasa alcalina (FAS), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y gamma glutamil transferasa (GGT) lo son para evaluar la lesión hepatocelular o hepatobiliar, la amilasa para evaluar la integridad pancreática, creatina quinasa (CK) y *lactato deshidrogenasa* (LDH) para el tejido muscular, FAS para metabolismo óseo, incluyendo también metabolitos (glu-

cosa, colesterol, triglicéridos, proteínas totales, albúmina) e iones (Ca, P, K), entre muchos otros^{5,9}.

Un biomarcador debe ser un parámetro que pueda ser objetivamente medido y evaluado como indicador de un proceso biológico normal o patológico, o como respuesta a una intervención terapéutica. Los biomarcadores farmacodinámicos se refieren específicamente a aquellos asociados a la duración de una respuesta farmacológica, mientras que los biomarcadores de punto final son aquellos que permiten predecir el beneficio clínico o la ausencia de él durante el estudio de un nuevo fármaco⁴.

Los biomarcadores son ampliamente utilizados en el desarrollo de nuevos fármacos, contribuyendo a incrementar la productividad y mejorando el cuidado de los pacientes a través de numerosas acciones durante la fase traslacional del desarrollo de un medicamento. Recientemente ha aumentado el estudio de biomarcadores como consecuencia de su extensa aplicación en el desarrollo preclínico y clínico de un fármaco. Este hecho permite acelerar el proceso de registro y aprobación, aumentar la eficiencia y facilitar la selección de la dosis antes de los ensayos clínicos de fase III, que son los de mayor costo para la industria farmacéutica¹⁴. Los biomarcadores utilizados en los ensayos de toxicidad y eficacia pueden ayudar a identificar riesgos en los modelos animales y mejorar los futuros ensayos clínicos, contribuyendo a la selección adecuada de dosis y a la estratificación de pacientes. Es por ello que los biomarcadores adecuados contribuyen a descartar tempranamente fármacos potencialmente tóxicos, aumentando la productividad en las etapas de desarrollo y reduciendo el tiempo y los costos asociados. Debido al gran aporte de los biomarcadores en la industria farmacéutica y de diagnóstico se han convertido en foco de nuevas e importantes validaciones y regulaciones¹⁵.

Los biomarcadores han sido incluidos en la "agenda de trabajo" de la *National Institute of Health (NIH-USA)*¹⁶, con el objetivo de facilitar una investigación médica más efectiva y productiva. Además, la *Federal Drug Administration (FDA-USA)*, ha generado una iniciativa para identificar las fuentes que generan las mayores demoras y otros problemas durante el desarrollo de nuevos fármacos, citando específicamente la importancia de contar con herramientas adecuadas para la evaluación preclínica entre las que se mencionan los biomarcadores bioquímicos⁶.

Como ya hemos mencionado, los avances en las ciencias básicas asociadas al descubrimiento y desarrollo de fármacos, ha llevado a un incremento significativo en el número de potenciales candidatos terapéuticos, sin embargo, esto no se traduce linealmente en un incremento de medicamentos aprobados para su uso¹⁴. Consecuentemente, los esfuerzos para mejorar la eficiencia de este proceso están siendo implementados permanentemente en el ámbito de la investigación traslacional¹⁵. En este sentido, el uso de biomarcadores constituye una herra-

mienta fundamental para mejorar la eficiencia del proceso de desarrollo de nuevos medicamentos.

Para comprender la importancia de los biomarcadores en estudios preclínicos, a continuación, se enumeran los biomarcadores más importantes en relación a diferentes órganos y sistemas:

Biomarcadores hepáticos

El hígado es un órgano crítico debido a su amplio papel en la homeostasis y el metabolismo, la desintoxicación y excreción de xenobióticos y compuestos endógenos. Ejemplos de la función hepática son la síntesis de albúmina y los factores de coagulación, la síntesis *de novo* y almacenamiento de glucosa, el uso y reciclaje de bilirrubina y colesterol, el metabolismo de hormonas y la degradación de diferentes medicamentos¹⁷.

La lesión hepática inducida por fármacos se encuentra entre las principales causas por las cuales éstos han sido retirados del mercado en las últimas tres décadas^{18,19}. Es así que se ha ido incrementado el alcance y la complejidad de los biomarcadores en estudios preclínicos, con el fin de lograr mejorar la predicción de una posible lesión hepática generada por ciertas drogas. Varios marcadores tradicionales indican lesión hepática tanto en especies clínicas como en las preclínicas. Sin embargo, los conceptos de lesión hepática y función hepática deben diferenciarse cuidadosamente, para lograr comprender y diferenciar las respuestas tóxicas del hígado a las diferentes lesiones^{19,20}. Es importante recordar que puede existir una alteración biológica estadísticamente significativa en los biomarcadores de lesión hepática, pero sin evidenciar efecto alguno en los índices de función hepática, y viceversa. Con respecto a lesión hepática, a su vez podemos diferenciar entre lesión hepatocelular y hepatobiliar¹⁷.

La recomendación actual para analizar la seguridad en estudios preclínicos, sugiere usar un mínimo de cuatro parámetros séricos para evaluar la lesión hepatocelular y hepatobiliar¹⁸. La actividad de ALT, AST, la sorbitol deshidrogenasa (SDH) y/o la actividad de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) evaluarán la lesión hepatocelular, mientras que la actividad de FAS, la GGT, la bilirrubina total, los ácidos biliares totales evaluarán la lesión hepatobiliar. Entre estos parámetros séricos, ALT, AST, FAS y la bilirrubina total también se usan para la identificación clínica de lesiones hepáticas en humanos, por lo que tienden a usarse con mayor frecuencia (Tabla 1). Es importante tener en cuenta que la elección y utilidad de estos biomarcadores varía entre las diferentes especies involucradas en estudios preclínicos¹⁷. Entre los biomarcadores tradicionales de lesión hepatocelular, se encuentra la ALT, la cual se la considera un indicador sensible y traducible de esta lesión en especies preclínicas comunes. La actividad de la ALT sérica es el indicador de los efectos hepatotóxicos generados por fármacos²¹, aunque no siem-

TABLA 1.— Resumen de los biomarcadores hepáticos

Biomarcadores que indican alteración en la función	Biomarcadores que indican lesión	
	Hepatocelular	Hepatobiliar
Bilirrubina total	Alanina aminotransferasa (ALT)	Gamma glutamil transferasa (GGT)
Ácidos biliares totales	Aspartato aminotransferasa (AST)	Fosfatasa alcalina (FAS)
Proteínas totales	Sorbitol deshidrogenasa	Bilirrubina total
Albumina	Glutamato deshidrogenasa (GLDH)	Ácidos biliares totales
Urea	Malato deshidrogenasa (MDH)	5'-nucleotidasa
Colesterol		
Triglicéridos		
Glucosa		

pre se correlaciona bien con los datos histopatológicos obtenidos²². Debido a la falta de especificidad de la ALT para definir una lesión hepatocelular, a menudo se utilizan pruebas complementarias de química clínica e histopatología para ayudar a interpretar los valores obtenidos. Una regla útil para la interpretación de los valores de ALT como signo de lesión hepática, en ausencia de resultados histopatológicos, es la regla de los dos biomarcadores. La misma considera que una elevación en tres veces los valores normales de ALT, combinado con una alteración significativa en otro biomarcador de lesión hepática, es un signo de lesión hepatocelular²³. Después de la introducción de un nuevo fármaco en estudios preclínicos a corto plazo, especialmente en ausencia de otros indicadores de lesión hepática, la respuesta de ALT se produce como elevaciones transitorias, las cuales no son consideradas clínicamente relevantes, mientras que los valores vuelvan a la normalidad después de una exposición continua al fármaco²⁴. La magnitud del incremento de ALT suele ser mayor que el de AST cuando ambas enzimas están elevadas debido a una lesión hepatocelular. Esto se debe a que la ALT tiene una vida media más larga que la AST y que la mayor fracción de AST se une a las mitocondrias²⁵.

La actividad de la GLDH aumenta con la lesión hepatocelular y sus valores basales pueden ser mayores y más duraderos que la ALT²⁶. La GLDH es una enzima sérica clásica como la ALT y AST. A diferencia de la ALT, la actividad de la GLDH sérica no se ve afectada por el daño del músculo esquelético ni inducida por los corticosteroides. Si bien la GLDH no se usa de manera rutinaria en estudios preclínicos, debido a la baja disponibilidad de reactivos confiables, está dejando de ser un biomarcador clásico de poco uso, por la ventaja para detectar lesión hepática aguda en comparación con la ALT¹⁷.

La sorbitol deshidrogenasa (SDH) es un indicador sensible y específico de una lesión hepatocelular aguda en ratones, perros, primates y también en humanos²². Sin embargo, la SDH tiene una vida media corta (4 horas en

caninos) y una estabilidad limitada en comparación con la mayoría de otras enzimas importantes en la química clínica, por lo que se requiere que se realice su determinación inmediatamente luego de la toma de la muestra²³. Hasta el momento, se desconoce si en ciertos estudios, la cuantificación de la SDH solo aporta un valor adicional junto a la cuantificación de la ALT¹⁷.

Los ácidos biliares totales son importantes en el metabolismo hepático del colesterol y la absorción de grasas y vitaminas liposolubles. Los niveles de ácidos biliares circulantes están influenciados por la dieta y el ayuno, pero el aumento en sus valores también puede deberse a un cambio funcional en el hígado²⁷. Su cuantificación es un complemento útil para evaluar la extensión y las consecuencias de la lesión hepática, ya que se lo considera un índice de la función hepática en especies preclínicas.

La FAS es un biomarcador principal de lesión hepatobiliar en especies preclínicas comunes. Al igual que la ALT, la FAS no es específica para la lesión hepatobiliar, ya que se puede observar un aumento de la actividad de esta enzima en condiciones de crecimiento y/o enfermedad ósea²⁸. Las fluctuaciones de FAS deben interpretarse con cautela en ensayos preclínicos, porque hay una isoforma intestinal de la FAS que provoca una disminución de la actividad de la misma, particularmente en ratones, durante el ayuno o la anorexia, y un aumento transitorio posprandial¹⁹.

La bilirrubina total es un producto de la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos envejecidos. Las elevaciones de este biomarcador suelen ser indicativas de lesión hepatobiliar o alteración de la función hepática²⁹.

La GGT se eleva por inducción en condiciones de lesión hepatobiliar y puede usarse para confirmar las elevaciones de la actividad de FAS asociada a esta patología¹⁹.

La actividad sérica de la malato deshidrogenasa (MDH) se la correlaciona con la lesión hepática, aunque una lesión cardíaca puede provocar también una elevación de la actividad de esta enzima. Al igual que la GLDH,

los niveles de MDH son estables en pacientes sanos de todos los sexos y grupos de edad, pero están elevados a causa de una lesión hepática³⁰.

Por su parte, la cuantificación de proteínas totales (PT), las cuales en su mayoría se sintetizan en el hígado, excepto las gammaglobulinas, son de sumo interés, ya que su dosaje puede indicar si existe un problema hepático, renal, intestinal, hemorrágico o inflamatorio. La concentración de PT se determina generalmente en suero o plasma³¹. La albúmina se sintetiza sólo en el hígado y una disminución en su concentración sérica se denomina hipoalbuminemia, la cual, si es significativa, puede deberse a una lesión hepática. No se registra incrementos en la *síntesis de albúmina relacionado con afecciones hepáticas*. El hígado es el único órgano que convierte el amoniaco en urea. En una disfunción hepática grave, pero también en una dieta pobre en proteínas, la concentración sérica de urea está disminuida³¹.

Es importante también destacar el dosaje de otros biomarcadores esenciales para evaluar el correcto funcionamiento del hígado, como son la cuantificación sérica de colesterol, triglicéridos y glucosa. El colesterol es el precursor de los ácidos biliares, que son importantes para la digestión y absorción de lípidos de la dieta en el intestino. Si el valor del colesterol total está aumentado, es un indicador de lesión hepatobiliar. Por su parte, valores altos de triglicéridos pueden indicar una obstrucción biliar y en una hepatitis crónica puede observarse una disminución de este biomarcador. La glucosa es la principal fuente de energía de los tejidos y su concentración en sangre está controlada por la insulina, el glucagón, la adrenalina y el cortisol. La glucosa no es un buen analito para evaluar la función hepática, ni para hacer un diagnóstico hepático, ya que solo en los casos más severos de una insuficiencia hepática se observa una hipoglucemia significativa³¹.

Biomarcadores renales

La nefrotoxicidad y la lesión renal aguda son de ocurrencia común en los estudios preclínicos de seguridad y continúa siendo una de las principales razones del descarte de nuevos fármacos y/o prometedores candidatos. Los riñones son especialmente susceptibles a una amplia gama de xenobióticos debido a que reciben una gran pro-

porción del volumen sanguíneo circulante (hasta el 25% del volumen de sangre bombeada por el corazón), lo que da como resultado la exposición a una elevada cantidad de compuestos y/o sus metabolitos. Las nefronas participan en el proceso de formación de la orina, que además concentran las sustancias tóxicas en el líquido tubular renal. Entre las nefrotoxinas más importantes se incluyen metales pesados como el cromo, plomo y el mercurio, agentes terapéuticos antiinflamatorios no esteroideos como el acetaminofeno, antibióticos aminoglucósidos como por ejemplo la gentamicina, y agentes inmunosupresores y quimioterapéuticos como la ciclosporina o el cisplatino³². Los clásicos biomarcadores que se valoran como indicadores de la función renal, son la valoración de la urea, expresada como nitrógeno ureico en sangre (BUN), la creatinina sérica y el fósforo. La creatinina se elimina con más facilidad y generalmente se incrementa después que la urea, por eso, para evaluar la función renal, es importante determinar en el suero las concentraciones de urea y creatinina³¹. La creatinina sérica es una prueba imprecisa, ya que no refleja con precisión la tasa de filtración glomerular cuando la función renal cambia constantemente³³.

Debido al importante papel de los riñones en el mantenimiento de la homeostasis del fósforo, una concentración elevada de este catión en suero sugiere una enfermedad renal crónica avanzada que puede conducir a problemas de salud sustanciales, principalmente enfermedades óseas y cardiovasculares³⁴. Sin embargo, estos parámetros son indicadores relativamente insensibles de lesión renal y no demuestran alteraciones discernibles hasta que ocurra una falla funcional de hasta un 65-75% de la capacidad renal³⁵.

Claramente, el rendimiento de estos biomarcadores no es suficiente para controlar la lesión renal en muchos ensayos preclínicos. La necesidad de obtener indicadores renales con mayor sensibilidad, ha llevado al descubrimiento de una serie de biomarcadores de nueva generación que proporcionan una detección más temprana y más específica de la lesión renal para su uso en el desarrollo de fármacos (Tabla 2). Inicialmente, la FDA calificó un conjunto de biomarcadores urinarios en ratas para controlar la lesión renal inducida por fármacos junto con el dosaje de la urea (BUN) y la creatinina sérica³⁶.

TABLA 2.– Resumen de los biomarcadores renales

Biomarcadores que indican alteración en la función	Biomarcadores que indican lesión	
	Glomerular	Renal
Creatinina sérica	Proteínas totales Albúmina Fósforo	Nitrógeno ureico en sangre (BUN)

Entre estos biomarcadores se encuentran la albúmina, las proteínas totales, la cistatina C, la clusterina, la molécula de lesión renal 1 y la β 2-microglobulina¹⁷.

Es importante señalar que la calificación de un biomarcador, por parte de un organismo regulador, representa la aprobación de su uso en circunstancias muy específicas, en una especie determinada, y no descarta la utilidad ni impide la inclusión de datos de otros biomarcadores con fines informativos con el fin de proporcionar una perspectiva adicional. Los biomarcadores renales generalmente se clasifican en varios grupos que indican su asociación con la lesión de una parte específica de la nefrona, como por ejemplo el túbulo proximal, glomérulo o el conducto colector. Sin embargo, un trabajo reciente sugiere que existe una buena cantidad de superposición y redundancia entre los biomarcadores individuales con respecto al segmento específico de la nefrona, por lo tanto, clasificar los efectos de biomarcadores en el glomérulo o los túbulos parece ser el enfoque más apropiado en la mayoría de los casos³⁷.

Biomarcadores de lesiones musculares cardíacas y esqueléticas

La cardiotoxicidad puede ser causada por una variedad de xenobióticos y terapias químicas que incluyen agentes antiarrítmicos como los bloqueadores adrenérgicos β , compuestos inotrópicos positivos como la digoxina o el isoproterenol, anestésicos como el isoflurano o el propofol, narcóticos como la cocaína y agentes antineoplásicos como la doxorubicina. Es importante distinguir entre los biomarcadores asociados a efectos cardiotoxicos a aquellos biomarcadores vinculados con efectos sobre el sistema cardiovascular. Los biomarcadores utilizados para la identificación y caracterización de los efectos de la lesión cardíaca, se pueden clasificar en términos generales como aquellos que identifican la lesión de los miocitos cardíacos estructurales, como las troponinas y las proteínas de unión a ácidos grasos y aquellos que indican alteraciones en la función cardíaca como los péptidos natriuréticos. Aunque la lesión cardíaca se puede detectar a través de una variedad de métodos que incluyen electrocardiogramas y otro tipo de evaluaciones, la cuantificación de biomarcadores en sangre y otros fluidos corporales (suero o plasma), son los más utilizados en estudios preclínicos y en estudios de toxicología¹⁷.

Los dos biomarcadores más importantes para la detección de la lesión o la necrosis aguda de miocitos cardíacos incluyen la medición de la troponina I cardíaca (cTnI) y/o la troponina T (cTnT) en suero o plasma. Ambas moléculas están involucradas en la regulación del proceso de excitación y acoplamiento del aparato contráctil dentro del miocito cardíaco, y se liberan a la circulación luego de una lesión celular o necrosis. Estos biomarcadores han demostrado repetidamente su alta sensibilidad y especificidad en la detección de lesiones

agudas del miocardio en una variedad de enfermedades y condiciones experimentales tanto en humanos como en ratas^{38, 39}. Las elevaciones en estos biomarcadores a menudo precederán a la primera evidencia histológica de lesión cardíaca y se correlacionarán con los efectos observados mediante ecocardiografía y con las puntuaciones generales de daño histológico^{40, 41}. En animales sanos, las troponinas cardíacas circulan en niveles bajos, casi indetectables, y pueden aumentar en cuestión de horas después de una lesión⁴⁰. La detección de estos biomarcadores a nivel plasmático (señal positiva) es de corta duración ya que el *clearance* de las moléculas de cTnI es rápido y ocurre dentro de 24 a 48 horas después de la primera lesión. Dada la sensibilidad de la mayoría de los ensayos comerciales para determinar troponina, generalmente se estima necesario observar un aumento de más del doble en los valores de cTnI antes de considerar que la señal es biológicamente o toxicológicamente significativa⁴². Al igual que con la mayoría de los ensayos de biomarcadores más nuevos, la falta de métodos estandarizados hace que la comparación de valores absolutos entre diferentes técnicas y laboratorios sea problemática. Se debe considerar cuidadosamente el método de dosaje y los rangos históricos específicos del laboratorio antes de determinar la interpretación de las señales positivas. Existen moléculas de troponina similares que también están presentes en el músculo esquelético como la troponina esquelética (sTnI), pero son antigénicamente distintas de sus contrapartes cardíacas, lo que aumenta la especificidad de ambos grupos de biomarcadores para la detección de lesiones musculares esqueléticas y cardíacas, respectivamente⁴³. Aunque cTnI y cTnT tienen una utilidad interpretativa y características cinéticas similares, los ensayos de cTnI han sido mejor caracterizados, están ampliamente disponibles y han demostrado una buena reactividad cruzada y capacidad de traducción entre múltiples especies. La cTnI es el biomarcador más utilizado para la detección de lesiones miocárdicas en las evaluaciones de seguridad farmacológica³⁹.

Históricamente, se han utilizado diferentes biomarcadores enzimáticos para la detección de lesiones de miocitos cardíacos en humanos y animales (Tabla 3). Estos incluyen a la AST, la LDH, la CK y la isoenzima creatina quinasa MB (CK-MB), que ya no se recomiendan para su uso como biomarcadores cardíacos debido a su baja especificidad, su rendimiento inconsistente entre especies, su amplia distribución en los tejidos y su falta de relevancia clínica⁴⁴. Solo sirven para identificar señales inflamatorias generales y siempre deben usarse junto con otros biomarcadores cardíacos más específicos. Sin embargo, muchos de estos biomarcadores son muy adecuados como biomarcadores de la lesión del músculo esquelético.

La toxicidad o la lesión del músculo esquelético son un hallazgo común en los estudios preclínicos, luego de la

TABLA 3.— Resumen de los biomarcadores del músculo cardíaco y esquelético

Biomarcadores que indican lesión
Troponina I cardíaca (cTnI)
Troponina T (cTnT)
Mioglobina
Creatina quinasa (CK)
CK-MM
CK-MB
Lactato deshidrogenasa (LDH)
Aspartato aminotransferasa (AST)
Troponina esquelética (sTnI)

exposición de los animales a diferentes compuestos químicos como por ejemplo los inhibidores de la colinesterasa o el carbofurano. A diferencia de la extensa investigación dedicada al desarrollo de ensayos para el diagnóstico de la enfermedad miocárdica, se ha dedicado muy poco esfuerzo al desarrollo de biomarcadores para la detección de lesiones del músculo esquelético. Tradicionalmente, se han utilizado una serie de enzimas como la CK, AST o la LDH y diferentes biomarcadores de proteínas como por ejemplo la mioglobina, pero generalmente estos carecen de la sensibilidad y especificidad necesaria para distinguir de manera confiable los efectos sutiles en el músculo esquelético de los efectos ocasionados en otros tejidos. La CK es una enzima citosólica que se encuentra en una gran variedad de tejidos, incluidos el músculo esquelético y cardíaco, el cerebro, en menor medida el tracto gastrointestinal, el útero, la vejiga y el riñón⁴⁵. Es el biomarcador más utilizado para detectar lesiones musculares generales y tiene tres isoenzimas distintas (CK-MM, CK-BB y CK-MB), que pueden determinarse mediante separación electroforética. Tradicionalmente, CK-MM y CK-MB se han utilizado como biomarcadores de lesión muscular esquelética y cardíaca, respectivamente; sin embargo, la mayor parte de la actividad de CK en el músculo cardíaco y esquelético se atribuye a la CK-MM⁴⁴. También existe un alto grado de variabilidad en el contenido de CK y las proporciones de sus isoenzimas entre ubicaciones musculares específicas, tipos de músculos (contracción rápida/contracción lenta) y entre especies, particularmente en lo que respecta a la actividad miocárdica de CK-MB^{46, 47}. La CK es un buen biomarcador para la lesión del músculo esquelético, pero la isoenzima CK-MB carece de la especificidad y consistencia entre especies para ser utilizada sola como un biomarcador cardíaco específico.

La LDH es una enzima que se encuentra en la mayoría de las células, incluidas células musculares esqueléticas

y cardíacas, hepatocitos y eritrocitos, con una distribución muy variable entre los diferentes tipos de tejidos y entre especies^{35, 48}. Dada su amplia distribución en los tejidos, el aumento en la actividad de la LDH no es específico de un solo órgano. La actividad de la LDH es generalmente mayor en el músculo esquelético y el hígado en comparación con el músculo cardíaco, lo que respalda su uso como biomarcador de una lesión en estos dos tipos de músculos⁴⁵. Se han realizado intentos de usar algunas isoenzimas de la LDH como la LDH1 o la LDH2, para aumentar la especificidad en el músculo cardíaco, obteniendo resultados similares a los de las isoenzimas de la CK, ya que existe una considerable variabilidad entre los diferentes tipos de músculos, entre especies y concentraciones dentro del corazón que lo excluye como un biomarcador útil de lesión cardíaca⁴⁴.

La AST y ALT son enzimas que se encuentran, entre otros, en el músculo esquelético e hígado. El aumento de las actividades de AST generalmente se asocia con efectos sobre el hígado y el músculo esquelético, pero también se observa con afecciones hemolíticas³⁵. El aumento de ALT se asocia clásicamente con una lesión hepatocelular; sin embargo, los casos de lesión muscular significativa también se han asociado con aumentos en la actividad de esta enzima⁴⁹. Recientemente, se han descubierto otros biomarcadores con una mejor especificidad para el músculo esquelético y están ganando una mayor aceptación. El más prometedor de estos es la sTnI, se ha demostrado que es un biomarcador sensible y específico para la lesión del músculo esquelético⁵⁰.

La sTnI es similar, pero antigénicamente distinta de su contraparte cardíaca específica, la cTnI, y se ha demostrado que ofrece la capacidad de distinguir entre el daño esquelético y cardíaco en ratas donde se han probado una variedad de diferentes toxinas cardíacas y miotoxinas⁵¹. Este biomarcador también se ha incluido en varios paneles de lesiones musculares destinados a diferenciar entre la lesión muscular cardíaca y esquelética.

Control y validación de técnicas analíticas

Las normativas más utilizadas para el control y validación de técnicas analíticas son la guía de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA: *European Medicines Agency*)⁷, la guía de la FDA-USA⁶ y las normas de la Conferencia internacional de armonización (ICH: *International Conference of Armonization*)⁵². Estas guías definen los elementos claves y las cifras de mérito a evaluar, necesarias para la validación de las técnicas analíticas destinadas a medir las concentraciones de biomarcadores en matrices biológicas como suero, plasma u orina; obtenidas en estudios toxicocinéticos en animales y en todas las fases de ensayos clínicos.

Los criterios sugeridos por las guías FDA y la EMA para la validación de un método bioanalítico son similares, pero no idénticos, ya que las cifras de méritos requeridas en ambas guías son diferentes. Las fortalezas de la guía de la FDA recaen en la facilidad de su interpretación ya que se presenta mucha información en los anexos. Por otro lado, la guía EMA describe la conducta práctica de los experimentos con mayor precisión, en comparación a la FDA⁵³.

Los parámetros a determinar para la validación de las técnicas analíticas se describen a continuación (las diferencias entre las distintas guías son aclaradas)

Linealidad

Se define como la capacidad o la habilidad de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito, dentro de un rango dado⁵². Los requerimientos que debe cumplir la curva de calibrado para asegurar su linealidad, de acuerdo a las guías son:

- Se deben ejecutar 6 estándares de calibración, al menos por duplicado y se deben espaciar de manera uniforme. El coeficiente de determinación (R^2) para la curva estándar debe ser ≥ 0.95 ^{6,7}.

- El coeficiente de variación porcentual (CV%) de los replicados de los estándares debe ser $\leq 20\%$; 25% en el límite inferior de cuantificación (LLOQ: *lower limit of quantification*) y en el límite superior de cuantificación (ULOQ: *upper limit of quantification*). En el caso de tratarse de triplicados, y de no cumplir con este criterio, puede descartarse el valor de absorbancia más alejado, considerándolo como error técnico^{6,7}.

- La concentración de cada punto de la curva, calculados nuevamente en base a la ecuación de la recta obtenida, debe ser $100 \pm 20\%$ (25% en los extremos) con respecto a la concentración nominal para al menos el 75% de los estándares de calibración que se encuentren dentro del rango cuantificable de la curva^{6,7}.

- La concentración más baja en la curva de calibración debe ser el LLOQ, si se cumplen las condiciones descritas en los ítems anteriores^{6,7}.

- El estándar más alto definirá al ULOQ de la metodología analítica^{6,7}.

La unión de química pura y aplicada (IUPAC: *The Union of Pure and Applied Chemistry*) desalienta los coeficientes de correlación como indicadores de linealidad en la relación entre concentración y señal. Para probar la linealidad, sugiere a los autores que deben informar el valor experimental de F correspondiente a la relación de la varianza residual al error puro al cuadrado, y la F crítica tabulada para la comparación. Esta prueba es el indicador de linealidad más adecuado y equivale a verificar estadísticamente si la varianza residual es mayor que el error puro al cuadrado derivado del estudio de muestras replicadas (método de regresión de los cuadrados míni-

mos). Se sugiere cumplir, además de los requerimientos descritos por las guías anteriormente enunciadas, con el método de regresión de los cuadros mínimos, ya que existen ejemplos donde la correlación es cercana a 1 pero no cumplen con este método⁵⁴.

Rango

El rango de un procedimiento analítico se define como el intervalo entre la concentración superior e inferior (definidas por el LLOQ y el ULOQ) de analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para el cual el procedimiento analítico ha demostrado tener un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad⁵².

Precisión y exactitud

La precisión se define como un procedimiento analítico que expresa la cercanía (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas del muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. Puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad⁵².

- Repetibilidad (precisión intra-ensayo): es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

- Precisión intermedia (precisión inter-ensayo): es la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en tres días distintos por el mismo o diferentes analistas, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

- La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (en el caso de estudios colaborativos, generalmente aplicados a la estandarización de la metodología).

La precisión debe investigarse utilizando muestras homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtenerla, puede analizarse utilizando muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra. La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación porcentual (CV%) de una serie de mediciones⁵².

Para la FDA, la precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 15% del CV%, excepto para el LLOQ, donde no debe exceder el 20% del CV%⁶. En cambio, para EMA, la precisión determinada en cada nivel de concentración no debe exceder el 20% del CV%, excepto para el LLOQ y el ULOQ, donde no debe exceder el 25% del CV%⁷.

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la cercanía entre el valor que se acepta como uno verdadero convencional o de referencia aceptado y el valor encontrado. También se la conoce como veracidad⁵². La exactitud de un método analítico describe la cercanía de la media

de los resultados de la prueba obtenidos por el método utilizado con el valor real (concentración) del analito. Se determina mediante el análisis replicado de muestras que contienen cantidades conocidas del analito (es decir, controles internos). La exactitud debe medirse utilizando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres controles internos en el rango de concentraciones de muestra de estudio esperadas. Para la FDA, el valor medio obtenido debe estar comprendido entre el 85 y el 115% del valor nominal, excepto en el LLOQ, donde debe estar comprendido entre el 80 y el 120%. La desviación de la media del valor nominal sirve como medida de exactitud⁶. En cambio, para EMA, el valor medio obtenido debe estar comprendido entre el 80 y el 120% del valor nominal, excepto en el LLOQ y en el ULOQ, donde este debe estar entre el 75 y el 125% del valor nominal⁷.

Límite de detección y de cuantificación

El límite de detección (LOD: *limit of detection*), se define como la mínima concentración que da una señal estadísticamente distinta del blanco, y el límite de cuantificación (LOQ: *limit of quantification*), se define como la menor cantidad de analito que puede ser determinado en la muestra con valores aceptables de precisión y exactitud, bajo las condiciones experimentales establecidas⁵².

El LOD generalmente se estima utilizando la definición anterior, ahora abandonada por IUPAC, basada en la concentración de analito que proporciona una señal

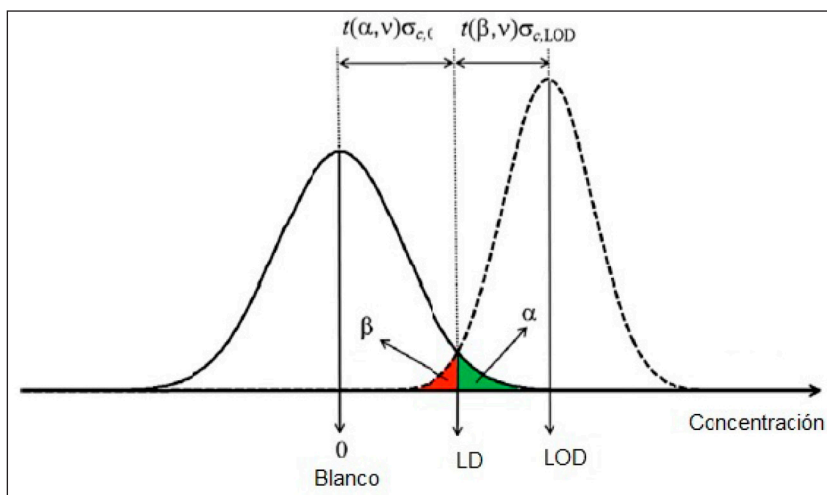
al menos tres veces mayor que la desviación estándar de la señal del blanco. Este valor de LOD suele ser una subestimación^{55,56}. La recomendación moderna de IUPAC primero requiere definir un nivel para el límite de detección (LD), lo que implica un cierto riesgo de falsas detecciones (también llamados falsos positivos, errores α o errores de tipo I). Como se ilustra en la Figura 1, el área sombreada en verde representa una parte de la distribución gaussiana de los valores de concentración que tienen una probabilidad de declarar a un analito "analito ausente", mientras que en realidad está presente. Este es el significado de la detección falsa o el falso positivo. El LOD se define como un nivel de concentración para el cual el riesgo de una falsa detección (falsos negativos, errores β o errores de Tipo II) tengan una probabilidad β . Esto corresponde al área sombreada en rojo en la Figura 1, donde el analito puede declararse presente mientras de hecho está ausente. A los errores α y β , generalmente se les asignan valores razonablemente pequeños, dependiendo de la aplicación analítica específica.

La fórmula entonces para calcular el LOD es la siguiente:

$$LOD = t(\alpha, \nu) \sigma_{c,0} + t(\beta, \nu) \sigma_{c,LOD} = \frac{3.3s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}}$$

donde $t(\alpha, \nu)$ y $t(\beta, \nu)$ son coeficientes de Student con n grados de libertad y probabilidades α y β , respectivamente, $\sigma_{c,0}$ y $\sigma_{c,LOD}$ son los errores estándar de concentración para los niveles en blanco y LOD, A es la pendiente de la curva de calibrado, I es el número de muestras de calibración,

Fig. 1.- Ilustración de la definición oficial (IUPAC) del límite de decisión (LD) y el límite de detección (LOD). Dos bandas gaussianas se centran en el blanco y en el LOD, respectivamente. El LD ayuda a decidir si el analito se detecta o no con una tasa a de falsas detecciones, mientras que el LOD implica la detección con una tasa a de falsas detecciones y una tasa b de falsas no detecciones. Las áreas sombreadas corresponden a la tasa de falsas detecciones (verde) y falsas no detecciones (rojo)³⁶



$S_{x/y}$ es la desviación estándar residual y h_0 viene dado por la siguiente ecuación:

$$LOQ = \frac{10s_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}}$$

donde c_{cal} es la concentración de la calibración media y c_i es cada uno de los valores de concentración de la calibración.

Conceptos similares se aplican al LOQ, que se calcula mediante la fórmula:

$$h_0 = \frac{\bar{c}_{cal}^2}{\sum_{i=1}^I (c_i - \bar{c}_{cal})^2}$$

donde el factor 10 asegura una incertidumbre relativa máxima del 10%.

Cabe señalar que la Comisión Europea ha adoptado recomendaciones similares⁵⁷, incluida la capacidad de detección (CC β), que es la concentración más pequeña de la sustancia que se puede detectar, identificar y/o cuantificar en una muestra con una probabilidad de error de β . Esto puede interpretarse como la concentración mínima de analito que puede discriminarse del blanco, controlando los riesgos de falsos positivos y falsos negativos. La definición de CC β es análoga a la LOD anterior⁵¹.

Selectividad

La selectividad se define como la capacidad de medir el analito de interés en presencia de compuestos no relacionados en la matriz. La selectividad se prueba agregando al menos 10 fuentes de interferencias como por ejemplo muestras lipémicas o hemolizadas en el LLOQ o cerca de él. La selectividad debe evaluarse en el extremo inferior de un ensayo donde ocurren problemas en la mayoría de los casos. También puede ser prudente evaluar la selectividad a concentraciones de analitos más altas. En los casos en que la interferencia depende de la concentración, es esencial determinar la concentración mínima donde se produce la interferencia. Puede ser necesario ajustar el nivel más bajo de cuantificación en consecuencia, antes de la validación del ensayo. La exactitud debe estar comprendida entre el 80 y el 120% (75 al 125% en el LLOQ) de la concentración nominal enriquecida en al menos el 80% de las matrices evaluadas⁷.

Linealidad dilucional

En casos donde el rango de la curva de calibración es muy estrecho, es necesario demostrar con muestras de estándares de calibración que el analito de interés, cuando está presente en concentraciones que exceden el rango de cuantificación (por encima del ULOQ), puede medirse con precisión después de diluirlo en una matriz blanco, para llevar las concentraciones del analito dentro del ran-

go validado para el análisis. La concentración calculada para cada dilución debe estar comprendida entre el 80 y el 120% de la concentración nominal, después de la corrección por la dilución realizada, y la precisión de las concentraciones finales en todas las diluciones no debe exceder el 20% del CV⁷.

Efecto matriz

El efecto matriz (ME: *matrix effect*) se define como la alteración o interferencia directa o indirecta en la respuesta debido a la presencia de analitos no deseados u otras sustancias interferentes en la muestra⁵².

El ME se evalúa mediante el método de adición de estándar⁵⁴. Describe la desviación entre la pendiente de las curvas de calibración matriciales y la pendiente de las curvas de calibración estándar externas, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% ME = \left[\left(\frac{\text{Pendiente de curva de calibración en matriz}}{\text{Pendiente de curva de calibración en solvente}} \right) - 1 \right] \times 100$$

El resultado de % ME = cero, significa que no se ha observado señal, supresión o mejora; % ME \pm 10, significa un efecto matriz nulo; % ME \pm (10 - 20) significa un efecto matriz suave; % ME \pm (20 - 50), significa un efecto matriz medio y un % ME + 50, significa un efecto matriz fuerte⁵⁸.

Estabilidad

Los estudios de estabilidad se efectúan para determinar el período de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales el analito se mantiene dentro de las especificaciones sobre identidad, potencia, calidad y pureza⁵².

Las muestras para evaluar estabilidad se deben comparar con los calibradores y/o los controles de calidad recién preparados. Se deben evaluar al menos tres réplicas en cada una de las concentraciones, bajas y altas. Las evaluaciones de la estabilidad del analito deben realizarse en la misma matriz que las muestras del estudio. Todas las determinaciones de estabilidad deben usar muestras preparadas a partir de una solución madre recién preparada. Las condiciones usadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que probablemente se encuentren durante el manejo y el análisis de la muestra real (por ejemplo, almacenamiento a largo plazo, a temperatura ambiente, y ciclos de congelación-descongelación). También debe evaluarse la estabilidad de la solución madre. Para la FDA, los resultados de las muestras de estabilidad deben estar comprendidos entre el 85 y el 115% de las concentraciones nominales⁶. Para la EMA, los resultados de las muestras de estabilidad deben estar comprendidos entre el 80 y el 120% de las concentraciones nominales⁷.

Problemática en la determinación de biomarcadores endógenos

Como en muchos otros campos de análisis, demostrar la validez de los métodos bioanalíticos se ha vuelto cada vez más relevante. En los últimos 15 años, la validación de un método bioanalítico ha sido objeto de arduo debate, y han surgido varios documentos, directrices y publicaciones acerca de esta temática^{59, 60}. Como resultado, los principios de validación para estos métodos se encuentran ahora razonablemente bien establecidos. El enfoque general es que los parámetros de validación importantes como por ejemplo la selectividad, precisión, exactitud y estabilidad se determinan usando muestras enriquecidas y que se utilizan como modelo para las llamadas muestras incurridas (es decir, muestras tomadas de sujetos humanos o animales después de la administración de un compuesto en particular). El supuesto subyacente es, por lo tanto, que están disponibles tanto una matriz libre de analito como un estándar de referencia del analito bien caracterizado. La determinación cuantitativa de los compuestos endógenos, es decir, naturales en muestras biológicas, es más complicada, tanto analíticamente como desde un punto de vista de la validación. A menudo es difícil, sino imposible, obtener muestras sin analitos de la matriz biológica auténtica o muestras con concentraciones de analitos conocidas con precisión, por lo que la preparación de muestras de referencia debe abordarse de una manera diferente y, como consecuencia, la validación también se vuelve menos sencilla. Los compuestos endógenos se han medido en laboratorios clínicos durante muchos años y con una variedad de técnicas, pero el interés en la determinación de estos biomarcadores, como parte del proceso de desarrollo de nuevos fármacos, es relativamente reciente. Como se dijo anteriormente, las decisiones críticas sobre la continuación de un programa de desarrollo de fármacos se basan frecuentemente en concentraciones de uno o más biomarcadores bien seleccionados, ya que estos proporcionan información crucial sobre la eficacia y la seguridad de un fármaco. La validación de las técnicas analíticas para analitos endógenos, hasta ahora se ha visto obstaculizada por la ausencia de directrices oficiales. Muchos investigadores intentan aplicar los principios de validación de métodos para ensayos de fármacos, en particular los emitidos por la FDA, también a sus métodos de analitos endógenos, a fin de garantizar resultados con un nivel de calidad comparable, pero cabe señalar que estos principios no estaban destinados a compuestos endógenos y, en muchos casos, no pueden aplicarse directamente⁶¹.

Una parte esencial del desarrollo del método es la selección de una forma adecuada de preparar muestras de calibración y control de calidad. Idealmente, estas muestras son partes (alícuotas) de la matriz biológica auténtica que contiene una concentración conocida exacta del ana-

lito auténtico. Para compuestos endógenos, la matriz biológica auténtica típicamente contiene una concentración desconocida del analito, lo que lo hace inadecuado para la preparación de muestras de referencia. Un enfoque bien conocido para solucionar este problema es la aplicación del método de adición estándar. Al agregar concentraciones crecientes del analito a alícuotas individuales de la muestra de interés, se crea una curva de calibración y la concentración endógena en la muestra se determina a partir de la intersección de esta curva de calibración con el eje de las abscisas. Aunque este enfoque se ha aplicado ampliamente y durante muchos años, y ciertamente tiene aspectos atractivos (por ejemplo, descarta los efectos de la matriz), generalmente requiere un mayor volumen de muestra (en el caso de ratones el volumen de muestra es limitante) y tiempo de análisis de lo que puede permitirse en el bioanálisis contemporáneo⁶¹.

La FDA propone que para aquellos analitos que también sean compuestos endógenos, la precisión de la medición de éstos es un desafío cuando el ensayo no puede distinguir entre el agente terapéutico y la contraparte endógena. En tales situaciones, recomienda los siguientes enfoques para validar y controlar el rendimiento del ensayo:

- La matriz biológica utilizada para preparar los estándares de calibración debe ser la misma que las muestras de estudio y estar libre del analito endógeno. Para abordar la idoneidad del uso de una matriz biológica libre de analitos, se debe demostrar que la matriz tiene: a) ningún analito endógeno medible; y b) sin ME o interferencia cuando se compara con la matriz biológica.

- El uso de matrices alternativas debe estar justificado. Los controles deben prepararse añadiendo cantidades conocidas del analito en la misma matriz biológica que las muestras de estudio.

- Las concentraciones endógenas del analito en la matriz biológica deben evaluarse mediante análisis repetido de las mismas. Las concentraciones de los controles deben tener en cuenta las concentraciones endógenas en la matriz biológica (es decir, aditivo) y ser representativas de las concentraciones esperadas del estudio⁶.

Estado actual de la tecnología

La realización de ensayos preclínicos demanda una tecnología acorde a los requisitos de las entidades regulatorias y a la complejidad de las respuestas requeridas por los patrocinantes. En la clínica, se han utilizado los biomarcadores bioquímicos para monitorear el proceso terapéutico, la progresión de las enfermedades y la eficiencia de las intervenciones médicas. Recientemente los mismos han sido aplicados al desarrollo de fármacos, aunque, como se mencionó previamente, las tecnologías no se han adaptado a las necesidades específicas de los modelos

de animales utilizados en la investigación traslacional. La principal limitante es la falta de técnicas analíticas validadas que permitan la realización de un panel complejo de biomarcadores con el escaso volumen de muestra obtenible del ratón, por ejemplo, la principal especie utilizada para ensayos preclínicos a nivel mundial y en la cual se han desarrollado numerosos modelos de enfermedades humanas, a través de modificaciones genéticas específicas. Sumado a esto, toda tecnología desarrollada requiere, para su uso en estudios preclínicos de registro, ser validada de acuerdo a los más altos estándares de las agencias regulatorias internacionales^{4, 15, 61}.

Dentro de estos estándares internacionales, las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) son un concepto de gestión que abarca los procesos organizativos y las condiciones en las cuales los estudios de laboratorio se planifican, aplican, monitorean, registran e informan. Estos principios aplican a entidades de ensayo que llevan a cabo estudios de seguridad preclínicos con fines de registro de productos farmacéuticos, cosméticos, pesticidas, fármacos de uso veterinario, aditivos para la alimentación humana y animal, y productos químicos, con objeto de obtener datos acerca de sus propiedades y/o seguridad para ser presentados a las autoridades regulatorias competentes. Su cumplimiento ha sido considerado una herramienta fundamental para el desarrollo en el sector estratégico SALUD del PAI2020. Las BPL constituyen un estándar aceptado y promovido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) que proveen datos confiables y de alta calidad en el desarrollo de estudios preclínicos de seguridad de los productos mencionados previamente con fines de registro. A partir de septiembre de 2011, Argentina, a través del Organismo Argentino de Acreditación (OAA), en su carácter de Autoridad Nacional de Monitoreo de las BPL de la OCDE, ha alcanzado su condición de Adherente Pleno al Acuerdo de Aceptación Mutua de Datos (MAD) para la Evaluación de Químicos de la OCDE. Dicha adhesión, permite que los datos generados por las entidades de ensayo inspeccionadas por el OAA, y declaradas en conformidad con las BPL, sean aceptados por los países miembros y adherentes plenos, y de este modo, minimizar las barreras no tarifarias al comercio. De este modo, Argentina avanza hacia un marco de armonización global que fortalece la integración económica, eliminando potenciales barreras no comerciales entre los países miembros y no miembros de la OCDE. La calidad de los datos es un problema que posee una importante dimensión internacional. Si las autoridades normativas de un país pueden poner su confianza en los datos procedentes de otro país, la repetición tanto de las pruebas como de los gastos incurridos, se podrá evitar a los gobiernos, así como a las industrias. Por otra parte, los principios de BPL comunes facilitan el intercambio de información e impiden la aparición de obstáculos no arancelarios para los intercambios, al mismo

tiempo que contribuyen para la protección de la salud y del medio ambiente⁸.

Conclusiones

En esta revisión se ha documentado que el uso de biomarcadores constituye una herramienta fundamental para mejorar la eficiencia del proceso de desarrollo de nuevos medicamentos. Se presentaron varios biomarcadores utilizados de forma rutinaria para evaluar diferentes tejidos y sistemas de órganos. Una característica clave de la interpretación de los datos de estos biomarcadores es tener en cuenta la heterogeneidad de las señales positivas de respuesta en el tiempo, magnitud y por especie, y lograr una buena comprensión del rendimiento analítico de cada ensayo individual. Un análisis cuidadoso, caso por caso, e integrador de los datos de estos biomarcadores, proporciona una mejor perspectiva sobre los riesgos potenciales de los problemas de seguridad e informa sobre las estrategias apropiadas de mitigación de riesgos en el desarrollo de fármacos. El objetivo final es minimizar los costos del desarrollo y, dependiendo de los resultados obtenidos, se puede llegar a condicionar la continuidad del estudio.

Por otro lado, en base a los conocimientos actuales, no se cuentan comercialmente con las técnicas analíticas necesarias para realizar estas determinaciones en pequeños volúmenes de muestra, considerando que la especie más utilizada en las etapas preclínicas es el ratón, por su baja masa corporal y en la cual se han desarrollado numerosos modelos de enfermedades humanas.

La determinación cuantitativa de biomarcadores endógenos, en muestras biológicas, presenta una serie de complicaciones para su validación y para el cumplimiento de los requerimientos detallados en las normas vigentes. Por lo tanto, el desafío que se presenta está centrado en el desarrollo y en la validación de técnicas analíticas específicas para la determinación de los biomarcadores de interés contando con muy bajos volúmenes de muestra, y el amoldamiento de las normas vigentes a las realidades y las posibilidades de los laboratorios que las realizan.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. Escalona Arranz JC, Carrasco Velar R, Padrón García JA. Introducción al diseño racional de fármacos. Cuba: Editorial Universitaria, 2008, p 1-54.
2. Shillingford CA, Vose CW. Effective decision-making: progressing compounds through clinical development. *Drug Discov Today* 2001; 18: 941-6.
3. Kiu TT, Ibawi A, Hill SR. Comparison of sales income and research and development costs for FDA-approved cancer drugs sold by originator drug companies. *JAMA Netw Open* 2019; 2: e186875.

4. Lee JW, Weiner RS, Sailstad JM, et al. Method validation and measurement of biomarkers in nonclinical and clinical samples in drug development: a conference report. *Pharm Res* 2005; 22: 499-511.
5. Chau CH, Rixe O, McLeod H, Figg WD. Validation of analytic methods for biomarkers used in drug development. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5967-76.
6. FDA F and DA. Bioanalytical Method Validation Guidance. U.S. Department of Health and Human Services. Food Drug Adm 2018. En: <https://www.fda.gov/media/70858/download>; consultado junio 2020.
7. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency 2011. En: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf; consultado junio 2020.
8. OECD. Principles of Good Laboratory Practice. Organisation for Economic Co-operation and Development. 1998. En: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_glpdm.pdf; consultado junio 2020.
9. Disposición 6677/ 2010. Buena Práctica Clínica para Estudios de Farmacología Clínica. Anmat 2010. En: http://www.anmat.gov.ar/Comunicados/Dispo_6677-10.pdf; consultado junio 2020.
10. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15-23.
11. Working G. Biomarkers Definitions. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95
12. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008; 358: 2148-59.
13. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* 2012; 82: 1024-32.
14. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003; 22: 151-85.
15. Lee JW, Devanarayan V, Barrett YC, et al. Fit-for-purpose method development and validation for successful biomarker measurement. *Pharm Res* 2006; 23: 312-28.
16. Zerhouni E. The NIH Roadmap. *Science* 2003; 302: 63-72.
17. Aulbach AD, Amuzie CJ. Biomarkers in nonclinical drug development. En: *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* Second Ed. Elsevier Inc. 2017; p 447-71.
18. Weiler S, Merz M, Kullak-Ublick GA. Drug-induced liver injury: the dawn of biomarkers. *F1000 Prime Rep* 2015; 7: 34.
19. Boone L, Meyer D, Cusick P, et al. Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Vet Clin Path* 2005; 34: 182-8.
20. Weingand K, Brown G, Hall R, et al. Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies. *Fundam Appl Toxicol* 1996; 29: 198-201.
21. Amacher DE. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21: 253-62.
22. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol* 2008; 194-205.
23. Ozer JS, Chetty R, Kenna G, et al. Recommendations to qualify biomarker candidates of drug induced liver injury. *Biom Med* 2010; 475-83.
24. Regev A. How to avoid being surprised by hepatotoxicity at the final stages of drug development and approval. *Clin Liver Dis* 2013; 17: 749-67.
25. Blair PC, Thompson MB, Wilson RE, Esber HH, Maronpot RR. Correlation of changes in serum analytes and hepatic histopathology in rats exposed to carbon tetrachloride. *J Comp Pathol* 1991; 98: 381-404.
26. O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR, Kramer K. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim* 2002; 36: 313-21.
27. Zollner G, Marschall HU, Wagner M, Trauner M. Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol Pharm* 2006; 3: 231-51.
28. Amacher DE, Schomaker SJ, Burkhardt JE. The relationship among enzyme induction, liver weight, and histological change in beagle toxicology studies. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 817-25.
29. Zucker SD, Qin X, Rouster SD, et al. Mechanism of indinavir-induced hyperbilirubinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12671-6.
30. Schomaker S, Warner R, Bock J, et al. Assessment of emerging biomarkers of liver injury in human subjects. *Toxicol Sci* 2013; 132: 276-83.
31. Quiroz Rocha G, Bouda J. Patología clínica de hígado. En: *Patología Clínica Veterinaria*. México: UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 2007; p 120-36.
32. Schnellman R. Toxic responses of the kidney. En: Klaassen CD. Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 2013. 8th Ed. New York: McGraw-Hill 2013; p 665-90.
33. Zappitelli M, Greenberg JH, Coca SG, et al. Association of definition of acute kidney injury by cystatin C rise with biomarkers and clinical outcomes in children undergoing cardiac surgery. *JAMA Pediatr* 2015; 169: 583-91.
34. Ensrud KE, Barbour K, Canales MT, et al. Renal function and nonvertebral fracture risk in multiethnic women: The Women's Health Initiative (WHI). *Osteoporos Int* 2012; 23: 887-99.
35. Stockham SL, Scott MA. Urinary System. En: *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. Iowa: Editorial lackwell Publishing 2008; p 415-94.
36. Dieterle F, Sistare F, Goodsaid F, et al. Renal biomarker qualification submission: A dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 455-62.
37. Ennulat D, Adler S. Recent successes in the identification, development, and qualification of translational biomarkers: The next generation of kidney injury biomarkers. *Toxicol Pathol* 2015; 43: 62-9.
38. Alpert JS, Antman E, Apple Fred, et al. Myocardial Infarction Redefined—A Consensus Document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000;36: 959-69.
39. Bertinchant JP, Robert E, Polge A, et al. Comparison of the diagnostic value of cardiac troponin I and T determinations for detecting early myocardial damage and the relationship with histological findings after isoprenaline-induced cardiac injury in rats. *Clin Chim Acta* 2000; 298: 13-28.
40. York M, Scudamore C, Brady S, et al. Characterization of troponin responses in isoproterenol-induced cardiac injury in the Hanover Wistar Rat. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 606-17.
41. Bertinchant JP, Polge A, Juan JM, et al. Evaluation of cardiac troponin I and T levels as markers of myocardial damage in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and their relationship with echocardiographic and histological findings. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 39-51.
42. Schultze AE, Carpenete KH, Wians FH, et al. Longitudinal

- studies of cardiac troponin-I concentrations in serum from male sprague dawley rats: baseline reference ranges and effects of handling and placebo dosing on biological variability. *Toxicol Pathol* 2009; 37: 754-60.
43. Metzger JM, Westfall MV. Covalent and noncovalent modification of thin filament action: The essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ Res* 2004; 94: 146-58.
 44. Walker D. Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 94-104.
 45. Cardinet G. Skeletal muscle function. En: Kaneko J, Harvey J, Bruss M, Ed. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th Ed. San Diego: Academic Press 1997; p 459-84.
 46. Fontanet HL, Trask RV, Haas RC, Strauss AW, Abendschein DR, Billadello JJ. Regulation of expression of M, B, and mitochondrial creatine kinase mRNAs in the left ventricle after pressure overload in rats. *Circ Res* 1991; 68: 1007-12.
 47. Hironaka E, Hongo M, Azegami M, Yanagisawa S, Owa M, Hayama M. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on changes in left ventricular myocardial creatine kinase system after myocardial infarction: Their relation to ventricular remodeling and function. *Jpn Heart J* 2003; 44: 537-46.
 48. Chow CK, Cross CE, Kaneko JJ. Lactate dehydrogenase activity and isoenzyme pattern in lungs, erythrocytes, and plasma of ozone-exposed rats and monkeys. *J Toxicol Environ Health* 1977; 3: 877-84.
 49. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 2005; 41: 380-2.
 50. Simpson JA, Labugger R, Hesketh GG, et al. Differential detection of skeletal troponin I isoforms in serum of a patient with rhabdomyolysis: Markers of muscle injury? *Clin Chem* 2002; 48: 1112-4.
 51. Tonomura Y, Matsushima S, Kashiwagi E, et al. Biomarker panel of cardiac and skeletal muscle troponins, fatty acid binding protein 3 and myosin light chain 3 for the accurate diagnosis of cardiotoxicity and musculoskeletal toxicity in rats. *Toxicol* 2012; 302: 179-89.
 52. ICH Int. Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures : text and methodology. *Int Conf Harmon* 2005; 1994: 17.
 53. Kaza M, Karaźniewicz-Łada M, Kosicka K, Siemiątkowska A, Rudzki P.J. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J Pharm Biomed Anal*. 2019; 165: 381-5.
 54. Olivieri AC. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Anal Chim Acta* 2015; 868: 10-22.
 55. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl Chem* 1995; 1699-723.
 56. Olivieri AC. Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. *Chem Rev*. 2014; 114: 5358-78.
 57. Directive, Implementing Council. 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities* 2002; 8-36.
 58. Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative Bioanalytical Methods Validation and Implementation : Best practices for chromatographic and ligand binding assays. *Pharm Res* 2007; 24: 1962-73.
 59. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A* 2007; 1158: 111-25.
 60. Van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Anal Chem* 2008; 27: 924-33.
 61. Shah VP, Midha KK, Dighe S, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991;16: 249-55.