

Validación de técnicas con microvolúmenes para el dosaje de biomarcadores útiles en pruebas preclínicas

Santiago GM, Cabaña ER, Stassi AF, Ortega HH, Hein GJ.

Centro de Medicina Comparada, ICiVet-Litoral (UNL-CONICET), Esperanza, Santa Fe, Argentina.
Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional del Litoral, Esperanza, Santa Fe, Argentina.

E-mail: santiago.gm84@gmail.com

El Centro de Medicina Comparada (CMC) perteneciente a la FCV-UNL y al ICiVet-Litoral, tiene como objetivo general el abordaje integral de ensayos realizados con animales de laboratorio bajo normas internacionales de ética y calidad en su uso y cuidado, destinados a la investigación y registro de nuevos productos farmacéuticos. El área Analítica del CMC cuenta con un subárea específica (Bioquímica y Técnicas Generales) donde los profesionales realizan análisis bioquímicos y técnicas inmunológicas complementarias a los ensayos de alta complejidad efectuados. Para la evaluación de nuevos productos farmacéuticos se requieren datos a partir de pruebas preclínicas a fines de garantizar que los beneficios de la nueva droga superen cualquier riesgo potencial. Los biomarcadores son parte del diagnóstico y monitoreo de diferentes enfermedades en modelos experimentales y en pruebas de concepto. También sirven como herramienta fundamental para el monitoreo de toxicidad de nuevos fármacos. En este sentido, un biomarcador se define como una sustancia producida por un tejido específico que puede ser detectada en la circulación o los tejidos. Es importante además que sea liberado en una cantidad proporcional a la evolución del proceso patológico específico y proporcionar información sobre la presencia, la gravedad y el pronóstico de la injuria. Los biomarcadores bioquímicos se han utilizado durante mucho tiempo para dilucidar los cambios fisiológicos, toxicológicos, farmacológicos o para llenar los vacíos de incertidumbre acerca de la patogenia de las enfermedades o la variabilidad en la respuesta a fármacos¹. Sin embargo, los bajos volúmenes de muestras biológicas obtenidos de animales pequeños de laboratorio (por ejemplo ratas, ratones y conejos) limitan la posibilidad de llevar a cabo métodos comerciales. Por lo tanto, uno de los objetivos del subárea, como parte de una tesis doctoral, fue desarrollar y validar una plataforma de análisis de biomarcadores bioquímicos utilizando micro volúmenes (menos de 50 μ L de suero total) para diseñar paquetes de biomarcadores útiles en ensayos preclínicos. Todas las técnicas analíticas se desarrollaron bajo un Sistema de Gestión de Calidad certificado ISO 9001 de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas de Laboratorio ya el CMC cuenta con el reconocimiento de BPL-OECD² otorgado por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Se tomaron muestras de sangre de ratas, ratones y conejos y se cuantificaron las concentraciones séricas de glucosa (Glc), triglicéridos (Tg), colesterol (Col), lipoproteína de alta (HDL) y baja densidad (LDL), proteínas totales (PT), albúmina (Alb), creatinina (Cr) y urea (U). Para estas técnicas se utilizaron los espectrómetros ultrarrápidos UV/Vis SPECTROstar Nano y CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Alemania) y kits bioquímicos comerciales (Wiener Labs, Argentina) diseñados para mayores volúmenes de suero de humanos. Las cifras de mérito analizadas fueron: límite de detección, límite de cuantificación, rango cuantificable, precisión intra e inter-ensayo, exactitud, comparación entre laboratorios, linealidad dilucional y estabilidad a -20 °C y -80 °C durante 60 días. Todas estas variables fueron analizadas y validadas de acuerdo con la norma EMA³ sobre validación de métodos bioanalíticos

VII JORNADA DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN

Noviembre 2019. Esperanza. Santa Fe. Argentina.

Área temática: **SALUD ANIMAL**

y la Guía de la FDA⁴ para la industria: validación de métodos bioanalíticos. Las cifras de mérito obtenidas para cada determinación se resumen en la siguiente tabla:

	Glucosa	Proteínas totales	Albúmina	Úrea	Triglicéridos	Creatinina	Colesterol	HDL Colesterol	LDL Colesterol
LD	4,71 mg/dl	0,13 g/dl	0,05 g/dl	1,25 mg/dl	2,72 mg/dl	0,25 mg/dl	2,72 mg/dl	2,72 mg/dl	2,72 mg/dl
LQ	14,29 mg/dl	0,39 g/dl	0,16 g/dl	3,77 mg/dl	8,25 mg/dl	0,75 mg/ml	8,25 mg/dl	8,25 mg/dl	8,25 mg/dl
Rango (LLOQ-ULOQ)	20-500 mg/dl	0,98-9,60 g/dl	1,55-6,20 g/dl	7-140 mg/dl	80-1040 mg/dl	0,25-4,0 mg/dl	50-600 mg/dl	50-600 mg/dl	50-600 mg/dl
Precisión y exactitud (curva de calibrado)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Precisión intra-ensayo (plasma y suero de conejo, rata y ratón)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Precisión inter-ensayo (plasma y suero de conejo, rata y ratón)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Comparación entre laboratorios (plasma y suero de conejo, rata y ratón)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Linealidad dilucional (1/2)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	-	-	-	-	-
Estabilidad -20°C; 60 días (plasma y suero de conejo, rata y ratón)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple (70 días)	Cumple (20 días)	Cumple (60 días)	Cumple (40 días)	Cumple (40 días)	Cumple (40 días)
Estabilidad -80°C; 60 días (plasma y suero de conejo, rata y ratón)	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple (40 días)	Cumple (20 días)	Cumple (15 días)	Cumple (40 días)	Cumple (40 días)	Cumple (40 días)

El desarrollo y validación de estas técnicas analíticas utilizando micro volúmenes contribuye a la ejecución de ensayos preclínicos en especies pequeñas, reduciendo la cantidad de sustancia de prueba necesaria y agregando complejidad a los estudios realizados. Este desarrollo también establece un marco científico que permite dilucidar los cambios fisiopatológicos en diferentes modelos animales para el estudio de daños subclínicos ocurridos en ciertos órganos, como el hígado, el páncreas, los riñones y el corazón, que no son detectables por otras técnicas como la patología. Además, las reducciones de los volúmenes de muestras y reactivos concuerdan con el principio de las 3R's y la sustentabilidad.

Bibliografía

1. Chau CH, Rixe O, Mcleod H, Figg WD. Validation of Analytical Methods for biomarkers Employed in Drug Development. *Clin Cancer Res.* 2008;14(19):5967-5976. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4535.
2. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. *EMA/CHMP, Comm Med Prod Hum Use Eur Med Agency.* 2011;44(United Kingdom, London):1-23. doi:EMA/CHMP/EWP/192217/2009.
3. OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development -Principles on Good Laboratory Practice. 1998. 1999;(98).
4. FDA F and DA, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.*; 2001. doi:http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf.