



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Desarrollo, optimización y validación de un método bioanalítico para la
determinación de Pioglitazona en plasma”**

TESIS

Que presenta

QFBT. Alejandra Sánchez Solares

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

En la Especialidad de Farmacología

Director de tesis: Dr. Carlos Hoyo Vadillo

Ciudad de México

Diciembre 2019

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la tutoría del Dr. Carlos Hoyo Vadillo en las instalaciones del laboratorio de Farmacogenómica (Laboratorio 10) del departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), en el periodo comprendido de Septiembre 2018 a Diciembre 2019 con el apoyo de la beca CONACyT No. 889599.

Dedicatorias

A mi mamá y a mis titos por su amor incondicional, apoyarme en todos mis sueños y acompañarme en el camino a lograrlos.

Los amo

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo sin la valiosa colaboración de:

El Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la oportunidad de incorporarme a su programa de Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacología.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme otorgado la beca 889599 que me permitió dedicarme exclusivamente a este proyecto.

La Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación del gobierno de la Ciudad de México por el financiamiento del proyecto: Farmacocinética de Metformina y Pioglitazona en Voluntarios Sanos, SECITI 098/2017.

Mi director de tesis, el Dr. Carlos Hoyo Vadillo por su guía e inspiración.

Mi compañera de laboratorio, la QFB Tania Alexandra Smith Márquez, ya que sin su apoyo, su amistad y sus conocimientos el camino hubiera sido más difícil .

Nuestra auxiliar de laboratorio: la Lic. Flor María Galván Rodríguez, por su asistencia técnica, tenacidad, paciencia, compromiso y aptitud para trabajar en equipo.

Mis asesores de tesis: la Dra. Liliana Favari Perozzi y el Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, por todo su apoyo, aportación de conocimiento y generosidad.

Los doctores del Cinvestav:

El Dr. Jaime García Mena, por su disposición a compartir su conocimiento además de su apoyo en menesteres económicos, tecnológicos y administrativos.

El Dr. Pablo Muriel de la Torre, el Dr. Carlos Cerda García-Rojas, el Dr. Gilberto Castañeda Hernández, por su orientación durante el desarrollo de este trabajo.

Los auxiliares de investigación:

La Hidrob. Ma. Teresa García Camacho por su asistencia técnica y su buena disposición para apoyarnos en el manejo de equipo de laboratorio.

El Biol. Alberto Piña Escobedo, por su asistencia técnica durante el desarrollo de este trabajo.

La técnica Lic. Rosa Elena Flores Beltrán, por haber proporcionado la capacitación en el manejo de equipo de laboratorio.

El QFI Gregorio Martínez Serrano, Ingeniero de Servicio de Instrumentación y Servicio en Analítica, por haber resuelto los problemas técnicos a los que nos enfrentamos en el día a día durante el desarrollo de este trabajo.

A mi mamá Ana Solares, por amarme tanto, estar a mi lado a cada momento, por ser mi cómplice incondicional y mi más grande apoyo.

Mis titos por todo su trabajo a lo largo de los años, por su amor que me convirtió en una persona de bien y por nunca dejar de creer en mí.

A Dios, por ayudarme a vencer todos mis miedos y poner a la gente adecuada en mi camino.

Contenido

1. Introducción.....	13
1.1 Diabetes.....	13
1.1.1 ¿Por qué es importante la diabetes?.....	14
1.1.2 Frecuencia	14
1.1.3 Estrategia farmacológica.....	15
1.2 Pioglitazona	19
1.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	19
1.2.2 Propiedades farmacológicas	19
1.2.3 Efectos adversos.....	22
1.2.4 Indicaciones terapéuticas.....	22
1.2.5 Posología y forma de administración	23
1.2.6 Datos preclínicos sobre la seguridad	23
1.2.7 Forma farmacéutica	24
1.2.8 Datos farmacéuticos.....	24
1.3 Cromatografía líquida de alta resolución.....	25
1.4 Validación	27
1.4.1 Selectividad.....	28
1.4.2 Límite inferior de cuantificación	28
1.4.3 Linealidad del método	28
1.4.4 Intervalo de cuantificación.....	28
1.4.5 Recobro absoluto	29
1.4.6 Precisión	29
1.4.7 Exactitud	29
1.4.8 Estabilidad de la muestra	30
1.4.9 Robustez	30
1.5 Justificación	31
1.6 Hipótesis.....	32
1.7 Objetivos.....	32
Objetivo General	32
Objetivos Específicos	32
2. Materiales y Métodos.....	33

2.1	Materiales	33
2.1.1	Material biológico	33
2.1.2	Reactivos y disolventes.....	33
2.2	Desarrollo del método.....	34
2.2.1	Desarrollo del sistema cromatográfico	34
2.2.2	Desarrollo del método de extracción de la muestra	38
2.3	Procedimiento general para el análisis de las muestras.....	39
2.3.1	Condiciones cromatográficas	39
2.3.2	Procedimiento general para el análisis de muestras en plasma	40
2.4	Procedimiento para la preparación de soluciones	41
2.4.1	Preparación de Buffer	41
2.4.2	Preparación de las soluciones Estándar	41
2.4.3	Preparación de solución de Ácido Perclórico 4 M	42
2.4.4	Preparación de solución de Metanol al 5%	42
2.5	Procedimiento para la validación del método	43
2.5.1	Adecuabilidad del sistema.....	43
2.5.2	Selectividad.....	43
2.5.3	Límite inferior de cuantificación	43
2.5.4	Linealidad.....	43
2.5.5	Precisión y exactitud del método.....	45
2.5.6	Recobro absoluto	45
2.5.7	Robustez.....	46
2.5.8	Estabilidad de la muestra	46
3.	Resultados.....	50
3.1	Adecuabilidad del sistema.....	50
3.2	Selectividad	52
3.3	Límite inferior de cuantificación	57
3.4	Linealidad y repetibilidad	58
3.5	Precisión y Exactitud del método.....	65
3.6	Recobro absoluto.....	71
3.7	Robustez.....	73
3.8	Estabilidad	77

4. Discusión.....	78
5. Conclusiones.....	82
6. Perspectivas.....	83
7. Referencias.....	84

Índice de figuras

Figura 1 Evolución de la resistencia a la insulina hasta el desarrollo de diabetes tipo 2	14
Figura 2 Estructura de la pioglitazona.....	19
Figura 3 Desarrollo del método Bioanalítico.....	34
Figura 4 Cromatograma en solución de pioglitazona y rosiglitazona medido a 269 nm	35
Figura 5 Cromatograma en solución de pioglitazona y rosiglitazona medido a 233 nm	36
Figura 6 Cromatograma en plasma de pioglitazona y rosiglitazona medido a 269 nm	36
Figura 7 Cromatograma en plasma de pioglitazona y Rosiglitazona medido a 233 nm	37
Figura 8 Comparación de dos cromatogramas de la misma muestra con FM a diferente pH.....	37
Figura 9 Métodos de extracción de las muestras.....	38
Figura 10 Comparación de los dos métodos de extracción de plasma.....	39
Figura 11 Adecuabilidad del sistema	50
Figura 12 Gráfico de los CV obtenidos durante la validación del método al realizar la Adecuabilidad del sistema	52
Figura 13 Plasma 1 Selectividad.....	53
Figura 14 Plasma 2 Selectividad.....	53
Figura 15 Plasma 3 Selectividad.....	54
Figura 16 Plasma 4 Selectividad.....	54
Figura 17 Plasma 5 Selectividad.....	55
Figura 18 Plasma 6 Selectividad.....	55
Figura 19 Plasma Hemolizado Selectividad	56
Figura 20 Plasma Lipemico Selectividad	56
Figura 21 Plasma con tratamientos concomitantes	57
Figura 22 Linealidad curva A de calibración.....	59
Figura 23 Linealidad curva B de calibración.....	60
Figura 24 Linealidad curva C de calibración	60
Figura 25 Linealidad curva D de calibración	61
Figura 26 Linealidad curva E de calibración.....	61
Figura 27 Promedio de las 5 curvas de calibración realizadas el mismo día.....	62
Figura 28 Comparación de los análisis de residuales con los dos modelos matemáticos de ajuste	64
Figura 29 Análisis de varianza de una sola vía prueba exactitud	70
Figura 30 Recobros de curva de calibración en solución	72
Figura 31 Recobros de curva de calibración en plasma.....	72
Figura 32 Análisis de varianza de dos factores comparando los datos de dos químicos diferentes prueba robustez.	76
Figura 33 Cromatograma, espectro UV e índice de pureza del límite inferior de cuantificación en plasma obtenido durante la validación del método.	78
Figura 34 Comparación de cromatogramas de los métodos reportados para el análisis de pioglitazona en plasma vs el método desarrollado por nosotros.....	79

Índice de tablas

Tabla 1 Preparación de la curva de calibración	41
Tabla 2 Preparación de la solución de pioglitazona.....	42
Tabla 3 Curva de calibración para la prueba de Linealidad	44
Tabla 4 Resultados por cada día de la validación del método de la prueba de Adecuabilidad	51
Tabla 5 Pesada de los estándares para la realización de las soluciones para la prueba de Linealidad.....	58
Tabla 6 Concentraciones reales de la curva de calibración ajustadas al peso de los estándares para la prueba de Linealidad	58
Tabla 7 Resultados de la pendiente, el intercepto, y el R^2 de la prueba de linealidad.....	63
Tabla 8 Resultados de prueba Repetibilidad	65
Tabla 9 Diseño de la prueba de Reproducibilidad	66
Tabla 10 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 1	67
Tabla 11 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 2.....	67
Tabla 12 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 3.....	68
Tabla 13 Coeficientes de Varianza de la prueba de Reproducibilidad.....	68
Tabla 14 Resultados de la prueba de Exactitud	69
Tabla 15 Resultados de la prueba de Precisión y Exactitud	70
Tabla 16 Resultados de la prueba de Recobro Absoluto.....	73
Tabla 17 Diseño de la prueba de Robustez.....	74
Tabla 18 Resultados de la prueba de Robustez	74
Tabla 19 Datos de Exactitud y Precisión de la prueba de Robustez.....	75
Tabla 20 Resultados de la prueba de Estabilidad.....	77
Tabla 21 Comparación de los métodos publicados para la determinación de pioglitazona en plasma	80

Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato cíclico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
cm	Centímetro
C_{máx}	Concentración plasmática máxima
C.V	Coefficiente de Varianza
CYP	Citocromo
D.E	Desviación estándar
d.i	Diámetro interno
DPP4	Dipeptidil peptidasa tipo 4
DT2	Diabetes tipo 2
EE	Error estándar
EMA	European Medicine Agency
ENSANUT	Encuesta nacional de salud y nutrición
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvil
FTO	Fat mass and obesity associated gene
g	Gramos
GLP-1	Glucagon like peptide 1
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance
HPLC-PDA	Cromatografía de líquidos acoplado a detector de arreglo de diodos (por sus siglas en inglés).
K_{ATP}	Canal de potasio sensible a adenosín trifosfato
kg	Kilogramos
l	Litros
log	Logaritmo
M	Molar
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHLW	Ministry of health labour and welfare
min	Minuto
ml	Mililitros
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
N/A	No aplica
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NOM	Norma oficial mexicana
PPARγ	Peroxisome proliferator activated receptor
R²	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
T	Temperatura
T2D	Type 2 diabetes
TZD	Tiazolidinedionas
vs	Versus

Resumen

La Diabetes tipo 2 (DT2) es considerada como la epidemia del siglo XXI. En los últimos años, la cifra de muertes a causa de ella y sus complicaciones ha ido en aumento, no solo en nuestro país sino a nivel mundial.

La pioglitazona, un fármaco de la familia de las tiazolidinedionas es el único fármaco hasta el momento que ha demostrado revertir la resistencia a la insulina en pacientes, por lo cual su prescripción en etapas tempranas puede llevar a la regresión de esta y prevenir que estos pacientes desarrollen diabetes.

La pioglitazona es una molécula de carácter ácido de bajo peso molecular, cuya unión a proteínas plasmáticas es mayor a 99%, lo cual vuelve complicada su cuantificación por técnicas cromatográficas convencionales, por lo que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un método cromatográfico adecuado para su análisis.

Utilizamos la técnica de HPLC-PDA para desarrollar y validar un método para la identificación y cuantificación de pioglitazona en plasma, el cual demostró ser exacto, reproducible, robusto y preciso, según los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA-1-2013 y demás normatividad internacional aplicable.

El método desarrollado y validado es apto para su posterior utilización en estudios farmacocinéticos, asegurando la calidad y veracidad de los datos que se obtengan de él.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is considered the epidemic of the 21st century. In recent years the number of deaths due to T2D and its complications has increased, not only in our country but worldwide.

Pioglitazone, a drug from the family of Thiazolidinediones, is the only drug so far that has proven its capability of restoring insulin resistance in patients, so its prescription in early stages, may lead to the regression of this condition and prevents the development of T2D in these patients.

Pioglitazone is an acid molecule of low molecular weight, with approximately 99% protein binding, these characteristics make its quantification by conventional chromatographic techniques complicated. The aim of the present work was to develop and validate a chromatographic method suitable for analysis of Pioglitazone in human plasma.

We used the HPLC-PDA technique to develop and validate a method for the identification and quantification of Pioglitazone in plasma, which proved to be accurate, reproducible, robust and precise, according to the parameters established in NOM-177-SSA-1-2013 and other applicable international normative.

The developed and validated method is suitable for the later application in pharmacokinetic studies, ensuring the quality and accuracy of the data.

1. Introducción

1.1 Diabetes

La diabetes es un grupo de desórdenes que afectan la habilidad del organismo de producir o responder a la insulina, generando hiperglicemia [1]. Los pacientes diabéticos sufren de complicaciones cardíacas o renales e igualmente pueden derivar en consecuencias como ceguera, dolor neuropático y hasta la muerte [1].

Existen dos tipos de diabetes: en el Tipo 1, los pacientes son dependientes de insulina exógena (5-10% de los casos) y se cree que es de tipo autoinmune por la destrucción de los islotes de Langerhans [2]. En la diabetes tipo 2, se tiene problemas en la secreción de insulina y en su mecanismo de acción [3].

Los pacientes antes de desarrollar diabetes tipo 2, tienen resistencia a la insulina, por lo que su organismo no responde de manera adecuada a la insulina endógena principalmente en órganos metabólicos, como los son el músculo, el hígado y el tejido adiposo [4].

En la figura 1 se muestra la evolución de la resistencia a la insulina hasta el desarrollo de DT2. Se observa que el primer paso para el desarrollo de DT2 es la resistencia a la insulina en el tejido muscular por factores como la obesidad, genes o la edad. Posteriormente se aumenta la lipólisis en tejido graso. Para compensar esta situación las células β del páncreas empiezan a secretar más insulina, con lo que se da un estado de hiperinsulinemia; aunque esta compensación no dura mucho tiempo y las células β empiezan a perder su capacidad secretora, el hígado aumenta la secreción de glucosa y en este punto se puede decir que el paciente es diabético.

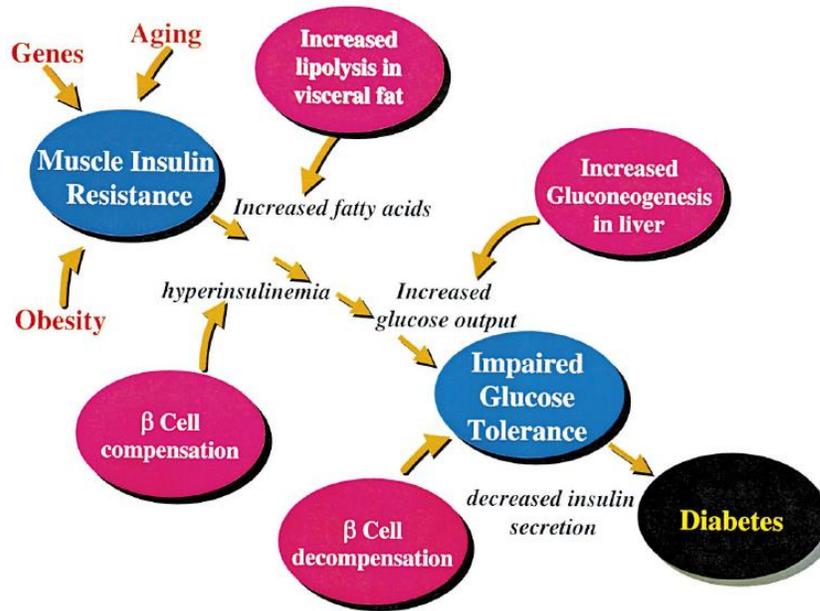


Figura 1 Evolución de la resistencia a la insulina hasta el desarrollo de diabetes tipo 2. Saltiel, A. (2001)

1.1.1 ¿Por qué es importante la diabetes?

La diabetes es una amenaza global. En el mundo hay alrededor de 180 millones de personas con ella y se espera que esta cantidad siga aumentando, ya que alrededor del 13% de la población adulta a nivel mundial tiene obesidad, y esto desencadena desórdenes metabólicos como la diabetes [5].

Se estima que para el 2030 el número de personas con diabetes aumentará un 67% en Latinoamérica [6].

1.1.2 Frecuencia

Esta enfermedad es más frecuente en la población africana, la mexicana y amerindios teniendo de 1.7 a 3 veces más probabilidad de desarrollarla [3].

Los países con más habitantes afectados son los menos desarrollados, ya que en ellos se encuentra alrededor del 80% de las muertes debidas a esta enfermedad, porque no se cuenta con los recursos para tratarla.

Nuestro país no es la excepción, ya que del año 2000 al 2006 la prevalencia ha ido en aumento [7]. La prevalencia actual de diabetes tipo 2 en México es de 9.4% de acuerdo con el estudio de ENSANUT 2016. Esta es mayor en mujeres con un 10.3% comparada con el 8.2% de los hombres y es más predominante en los grupos de edad de 60 a 69 años (27,7 y 32.7%), respectivamente [8].

Parte de la causa de lo antes mencionado, se debe a la presencia de polimorfismos en genes de riesgo en la población mexicana, entre los que se cuenta al FTO [9] y el *SLC16A11* [10,11] cuyos polimorfismos identificados como factores de riesgo para obesidad e incremento en índice de masa corporal, pueden derivar en el desarrollo de DT2.

1.1.3 Estrategia farmacológica

Como tratamiento para la diabetes tipo 2, existen diversos fármacos como lo son las sulfonilureas, las biguanidas, los análogos al GLP-1, los inhibidores de la enzima DPP4, los derivados del ácido benzoico, los inhibidores de las α -glucosidasas intestinales y las tiazolidinedionas [12].

1.1.3.1 Sulfonilureas: Fueron introducidas en 1944, son fármacos derivados de un núcleo sulfonilureico con sustituciones en R1 y R2. Dentro de este grupo se encuentran fármacos como la Tolbutamida, la Clorpropamida, la Tolazamida (Sulfonilureas de primera generación) y la Glibenclamida, la Glipizida, la Glimepirida (Sulfonilureas de segunda generación [13].

Las sulfonilureas inhiben canales de K_{ATP} , los cuales hiperpolarizan la membrana celular [13] y al inhibir estos canales, producen una despolarización que conlleva a la apertura canales de Ca^{2+} , promoviendo la liberación de insulina por las células β del páncreas (no estimulan la síntesis de esta). Esta liberación de insulina es no dependiente de glucosa; por lo que se puede llevar a la crisis de hipoglucemia [13].

No todos los pacientes responden a estos fármacos (del 10-20%) y en los pacientes en los cuales, hay respuesta, esta va disminuyendo después de 5-10 años (del 5-7% de los pacientes) ya que la capacidad secretora de las células β va disminuyendo [13].

Como efectos secundarios se tiene hipoglucemia, aumento de peso y complicaciones cardiovasculares [13].

1.1.3.2 Biguanidas (Metformina): Es un fármaco hipoglicemiante, considerado el tratamiento de primera línea para el manejo de DT2 [14].

Este fármaco es utilizado también para control de peso y pacientes que presentan resistencia a la insulina. Su mecanismo de acción es por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial y activación de AMPK; teniendo efectos en la disminución de la absorción de la glucosa en el intestino delgado, la inhibición de la liberación de glucosa del hígado y el incremento de la respuesta a la insulina a nivel musculoesquelético y del tejido adiposo, ya que se promueve la oxidación de ácidos grasos libres [14].

La metformina no causa crisis de hipoglucemia y evita la hiperinsulinemia. Sus efectos secundarios son en su mayoría gastrointestinales (náuseas, vómito, diarrea). Está contraindicada en pacientes con falla renal, ya que podrían desarrollar acidosis láctica [14].

1.1.3.3 Análogos al GLP1: La hormona GLP-1 juega un papel muy importante en la homeostasis de la glucosa, es secretada por la mucosa intestinal después de la ingestión de los alimentos, la cual disminuye la glicemia por diversas vías [15]:

- Promueve la secreción de insulina por las células β pancreáticas, es un efecto dependiente de glucosa, por lo cual no se producen crisis de hipoglucemia.
- Disminuyen la secreción de glucagón por las células α pancreáticas, disminuyendo la secreción de glucosa por el hígado
- Enlentece el vaciado gástrico, aumentando la sensación de saciedad.

En pacientes con DT2, por una causa que aún no se ha establecido, las concentraciones de GLP-1 disminuyen, por esta razón se han desarrollado agentes análogos al GLP-1 como Liraglutida, Exenatida, Lixisenatida, que mimetizan sus efectos. Son fármacos que se administran por vía subcutánea y al ser nuevos, sus precios son bastante elevados. Como efectos adversos se presentan: disminución del apetito, cefalea, dolor en el sitio de la inyección y reflujo gastroesofágico [15].

1.1.3.4 Inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa tipo 4: el grupo de fármacos Sitagliptina, Vildagliptina, Saxagliptina son cianopirrolidinas, las cuales interaccionan con el complejo catalítico de la enzima DPP4 inhibiéndola competitivamente, con lo cual se inhibe de forma reversible la hidrólisis de incretinas endógenas teniendo como efecto el aumento de los niveles plasmáticos de GLP-1 al igual que su acción. Los pacientes con DT2, tienen menores concentraciones de GLP-1 y se busca que las enzimas no degraden las concentraciones ya de por sí bajas [6].

Estos fármacos aumentan la respuesta y secreción de insulina endógena, disminuyen la secreción de glucagón, igualmente evitan la muerte y previenen el daño de las células β del páncreas preservando su capacidad secretora de insulina [6].

La enzima DPP4 no es específica para GLP-1, por lo que estos fármacos tienen efectos pleiotrópicos tanto positivos como negativos. Como efectos adversos se tienen posible hipoglucemia, edema facial y síndrome de Stevens-Johnson [6].

1.1.3.5 Derivados del ácido benzoico (Repaglinida, Meglitinida)

Son útiles en el control de la glucemia posprandial. Tienen un mecanismo de acción similar a las sulfonilureas ya que cierran los canales de K_{ATP} en las células β del páncreas, despolarizando la célula y abriendo canales Ca^{2+} promoviendo la secreción de insulina, pero tienen unión a receptores diferentes que las sulfonilureas [16].

Tienen una acción insulínica, aumentando la secreción de insulina y de somatostatina, pero inhibiendo la liberación de glucagón [16].

Como efectos adversos se tiene crisis de hipoglucemia, las cuales son menores en comparación con las sulfonilureas ya que estos fármacos solo actúan en la glucemia posprandial, aumento de peso y cefaleas [16].

1.1.3.6 Inhibidores de las α -glucosidasas intestinales: actúan inhibiendo las enzimas de borde en cepillo del enterocito (maltasas, sacarasas, dextrinasas, glucoamilasas) que hidrolizan los oligosacáridos a disacáridos y monosacáridos y posteriormente son absorbidos. Los fármacos (Miglitol, Acarbosa) disminuyen la glucemia posprandial siempre y cuando la dieta sea rica en carbohidratos complejos [17].

Las alteraciones gastrointestinales como flatulencias, diarrea, dolor abdominal, náuseas y vomito [17] son los efectos adversos de estos fármacos.

1.1.3.7 Tiazolidinedionas: fueron sintetizadas en 1997 a partir del α -tocoferol. La primera tiazolidinediona (TZD) fue la Ciglitazona, que además de los efectos antioxidantes que presentaba también produjo hipoglucemia en animales con resistencia a la insulina [18].

Al darse cuenta de que se presentaba el efecto hipoglicemiante sin haber liberación de insulina, se llegó a la conclusión de que las TZD restauran la resistencia a la insulina por lo cual las llamaron “sensibilizadoras a la insulina”. Estas también mejoran la dislipidemia y la hipertensión además de sus efectos antioxidantes [18].

La rosiglitazona y pioglitazona son las TZD disponibles en el mercado mundial. Su mecanismo de acción es por unión y activación del receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR δ) promoviendo transcripción génica que lleva al remodelado del tejido adiposo, mayor absorción de glucosa por parte del músculo, y disminución de la gluconeogénesis hepática [18].

Como efectos adversos se presentan aumento de peso por adipogénesis, edema por retención de líquidos y osteoporosis. El riesgo de que se presenten los efectos adversos aumenta con la duración del tratamiento. En pacientes con DT2 es un tratamiento crónico, pero al darse en pacientes que presentan resistencia a la insulina, el fármaco acompañado de dieta y ejercicio la restauran, se puede retirar el fármaco y el riesgo de que se presenten efectos adversos disminuye [18].

1.2 Pioglitazona

1.2.1 Propiedades fisicoquímicas

La fórmula de la pioglitazona es $C_{19}H_{20}N_2O_3S$, su peso molecular es de 356.44 g/mol y es una molécula de carácter ácido, teniendo un pKa de 5.9 [42].

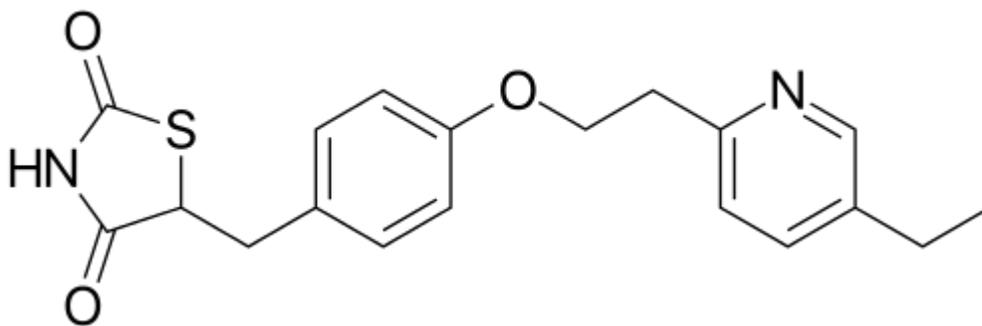


Figura 2 Estructura de la pioglitazona (RS)-5-[[4-(5-etil-2-piridinil)etoxi]fenil]metil]-2,4-tiazolidinediona. Drugbank

1.2.2 Propiedades farmacológicas

1.2.2.1 Farmacocinética

La pioglitazona, después de ser administrada por vía oral, es rápidamente absorbida y su concentración máxima es de 1359 ng/mL y se alcanza en aproximadamente de 1.5 a 2 horas y esta no se ve afectada por la ingesta de alimentos [19].

Su volumen de distribución en humanos es de 0,25 l/kg siendo este tan bajo debido a la unión mayor al 99% a las proteínas plasmáticas [19].

La pioglitazona es metabolizada principalmente en el hígado por hidroxilación de los grupos metileno alifáticos, mediada en su mayoría por el CYP2C8; se conoce que la población mexicana tiene polimorfismos en este citocromo [19], los cuales pueden ser responsables de la toxicidad. De este proceso se identifican 6 metabolitos, 3 de ellos activos (M-II, M-III y M-IV) [20].

La eliminación es mayormente en heces (55%) y en menor medida en orina (45%). La vida media de la pioglitazona va de 5 a 6 horas y de sus metabolitos activos de aproximadamente 23 horas [21].

Como se mencionó previamente, el metabolismo de Pioglitazona está dado por el citocromo 2C8 del cual se conocen 20 variantes alélicas, por lo cual puede existir variación entre poblaciones en el metabolismo del fármaco [43].

Este citocromo metaboliza alrededor del 5% de los medicamentos utilizados en la clínica como algunos antidiabéticos (pioglitazona), antihipertensivos (verapamilo), antimaláricos (cloroquina), anticancerígenos (paclitaxel), AINES (diclofenaco) [44] y compuestos endógenos como el ácido retinoico y el ácido araquidónico [45].

El gen del citocromo CYP2C8 está localizado en el cromosoma 10 y se conocen alrededor de 20 alelos diferentes de este. Los alelos más estudiados ya que derivan en una deficiencia enzimática son *2, *3, *4 y *5.

Existen estudios previos han reportado que las deficiencias en el metabolismo de los sustratos del CYP2C8 están relacionados con los polimorfismos antes mencionados [33].

Sujetos que tienen el genotipo homocigoto *2/*2 o *3/*3 de los polimorfismos, tienen valores de área bajo la curva (concentración del fármaco) más grandes y menor eliminación del fármaco. Estos polimorfismos se han visto en población hindú.

En un estudio realizado en pacientes con cáncer de mama mexicanas cuyo tratamiento es paclitaxel [19], se estudia el polimorfismo del CYP2C8, ya que este fármaco está asociado con gran variabilidad interindividual en la toxicidad representada como neuropatía en las pacientes.

Como resultados se encontró que el 75% de las pacientes son metabolizadoras normales teniendo el genotipo homocigoto *1/*1, el 23.4% fueron metabolizadoras intermedias con los genotipos heterocigotos *1/*2, *1/*3, *1/*4, y por último el 1.3% de las pacientes fueron metabolizadoras pobres con el genotipo homocigoto *3/*3 y heterocigoto *3/*4 las cuales tienen problemas en la farmacocinética teniendo mayor área bajo la curva y menor eliminación del fármaco por lo que estas pacientes requieren un monitoreo importante o de ajuste de dosis de este fármaco [19].

Para pioglitazona no se encuentran publicados estudios de este tipo, pero al ser metabolizados por el mismo citocromo, podría existir un comportamiento similar.

Existen métodos [21,34,36] para la cuantificación de pioglitazona en plasma, los cuales evaluaremos para determinar si se ajustan a los requerimientos de la normatividad [25,32,37,38,39,40,41] o si es necesario diseñar modificaciones y optimizaciones para que cumplan los criterios establecidos. El análisis comparativo de estos métodos se estudiará a fondo en la discusión de la tesis.

1.2.2.2 Farmacodinamia

La pioglitazona es un fármaco de la familia de las tiazolidinedonas. Como se mencionó anteriormente, este grupo de fármacos disminuye la resistencia a la insulina mediante la activación de los receptores PPAR γ , los cuales son receptores nucleares que activan la transcripción de diversos genes que promueven el anabolismo de lípidos [5].

El receptor PPAR γ está involucrado en el metabolismo de la glucosa, sensibilización a la insulina y respuesta antiinflamatoria [22].

Se conoce que además de sus efectos antiglicemiantes, la pioglitazona tiene otros efectos farmacológicos de interés, como el síndrome de ovario poliquístico, la aterosclerosis, y la enfermedad coronaria [4].

1.2.3 Efectos adversos

La pioglitazona tiene efectos adversos como el aumento de peso, el edema, las complicaciones cardiovasculares y la osteoporosis [23]. El consumo de pioglitazona a largo plazo puede derivar en cáncer de vejiga [24].

1.2.4 Indicaciones terapéuticas

La pioglitazona está indicada para el tratamiento de segunda o tercera elección de la DT2 , como se describe a continuación [25]:

En monoterapia

- En pacientes adultos (particularmente aquéllos con sobrepeso), en los que no se logra un control adecuado con dieta y ejercicio y que no pueden recibir metformina por contraindicaciones o intolerancia.

En doble terapia oral en combinación con:

- Metformina, en pacientes adultos (particularmente aquéllos con sobrepeso) con un control glucémico inadecuado independientemente de la dosis máxima tolerada de metformina en monoterapia.
- Una sulfonilurea, sólo en pacientes adultos que presentan intolerancia a la metformina o en los que la metformina esté contraindicada, y en los que no se logra un control glucémico adecuado independientemente de la dosis máxima tolerada de sulfonilurea en monoterapia.

En triple terapia oral en combinación con:

- Metformina y una sulfonilurea, en pacientes adultos (particularmente aquéllos con sobrepeso), con un control glucémico inadecuado, a pesar de la doble terapia oral.

La pioglitazona también está indicada en combinación con insulina para el tratamiento de pacientes adultos con DT2 en los que el tratamiento con insulina no permite un control glucémico adecuado, y en los que no es apropiado el uso de metformina debido a contraindicaciones o intolerancia [25].

Una vez iniciado el tratamiento con pioglitazona, se debe controlar a los pacientes entre 3 y 6 meses después para evaluar la respuesta al tratamiento. En los pacientes que no muestren una respuesta adecuada, se debe interrumpir el tratamiento con pioglitazona [25].

Considerando los riesgos potenciales del tratamiento prolongado, los médicos deben confirmar en las subsiguientes revisiones rutinarias que se mantiene el beneficio de la pioglitazona [25].

1.2.5 Posología y forma de administración

El tratamiento con pioglitazona puede iniciarse con 15 mg o 30 mg una vez al día. La dosis puede incrementarse hasta 45 mg/día [25].

En pacientes de edad avanzada y con falla renal, no es necesario ajustar la dosis.

Está contraindicada en pacientes con insuficiencia hepática [25].

Los comprimidos de pioglitazona se toman, por vía oral, una vez al día, con o sin comida [25].

1.2.6 Datos preclínicos sobre la seguridad

En estudios toxicológicos, tras repetidas dosis administradas a ratones, ratas, perros y monos, se observó edema. Además, se observó aumento en los depósitos e infiltrados en grasa. Estos datos se observaron en todas estas especies [25].

La restricción del crecimiento fetal se hizo evidente en estudios con pioglitazona en animales. Esto es atribuible a la acción de la pioglitazona sobre

la disminución de la hiperinsulinemia materna y al aumento de la resistencia insulínica que se produce durante el embarazo, reduciendo por tanto la disponibilidad de sustratos metabólicos para el crecimiento fetal [25].

La pioglitazona demostró carecer de potencial genotóxico en estudios in vivo e in vitro. Se hizo evidente un aumento de la incidencia de hiperplasia (en machos y hembras) y tumores (en machos) del epitelio de la vejiga urinaria, en ratas tratadas con pioglitazona hasta dos años. No se observó hiperplasia de la vejiga urinaria ni en perros ni en monos tratados con pioglitazona hasta 12 meses [25].

1.2.7 Forma farmacéutica

Los comprimidos de pioglitazona Actos de 30 mg son redondos, planos, de color blanco y tienen grabado '30' en una cara y 'ACTOS' en la otra [25].

1.2.8 Datos farmacéuticos

1.2.8.1 Lista de Excipientes

- Carmelosa de calcio
- Hiprolosa
- Lactosa monohidrato
- Estearato de magnesio [25].

1.2.8.2 Incompatibilidades

No se conocen [25].

1.2.8.3 Periodo de validez

Su caducidad es de 3 años [25].

1.2.8.4 Precauciones especiales de conservación

La pioglitazona no requiere condiciones especiales de conservación [25].

1.2.8.5 Naturaleza y contenido del recipiente

Pioglitazona se comercializa en envases con 14, 28, 30, 50, 56, 84, 90, 98, 112 y 196 comprimidos, en blíster de aluminio/aluminio [25].

1.2.8.6 Instrucciones de uso/manipulación

Medicamento sujeto a prescripción médica [25].

1.3 Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía de líquidos es una técnica para separar los compuestos químicos que están presentes en una muestra, además de identificarlos y cuantificarlos [26].

Existen diferentes tipos de cromatografía de líquidos: Cromatografía en capa fina, Cromatografía en papel, Extracción en fase sólida, Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia (UPLC) [26].

En nuestro laboratorio contamos con un equipo HPLC-PDA, que es un tipo de cromatografía en donde se cuenta con:

- Una columna empacada con la fase estacionaria
- Una fase móvil líquida que pasa a un flujo determinado por la fase estacionaria
- Una bomba cuaternaria
- Un detector de arreglo de diodos (PDA)
- Una muestra que es inyectada al cromatógrafo para su análisis
- Computadora y software donde se obtienen los cromatogramas

El detector de arreglo de diodos, a diferencia de un detector UV, introduce una tercera dimensión a los análisis cromatográficos, permitiendo obtener más información y sobre todo confirmar la identidad de los analitos ya que está dada por su tiempo de retención y su espectro UV.

Gracias a este detector se puede:

- Obtener cromatogramas en todas las longitudes de onda del espectro visible
- Seleccionar la longitud de onda óptima para cada analito
- Calcular la pureza de los picos [27]

La separación de los diferentes analitos presentes en la muestra se da en base a las interacciones que tienen con la fase estacionaria y la fase móvil. Si el analito eluye muy rápido (tiempo de retención pequeño) quiere decir que tiene más interacción con la fase móvil, por el contrario, si tiene un tiempo de retención grande, el analito interacciona más con la fase estacionaria [26].

La cuantificación del analito se puede dar por la altura del pico o por el área bajo la curva.

Dentro de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia existen 4 tipos diferentes. Depende de las características de la muestra qué tipo de cromatografía es la adecuada para su análisis.

➤ Fase normal

La fase estacionaria o la columna es polar (sílica, amino diol, ciano), mientras que la fase móvil es no polar (hexano, acetato de etilo). Esta cromatografía es para moléculas hidrofóbicas [28].

➤ Cromatografía de intercambio iónico

La fase estacionaria o columna contiene grupos iónicos como tetralquilamonio y la fase móvil es acuosa. Es muy parecida a la cromatografía de par iónico. Gracias a esta cromatografía se separan aniones y cationes presentes en una solución acuosa [28].

➤ Cromatografía de exclusión molecular

En esta cromatografía de líquidos, la fase estacionaria es un material poroso que permite la elución de los solutos en función de sus tamaños moleculares,

además de que no hay interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria.

Es más utilizada para la caracterización de polímeros y para análisis de proteínas[28].

➤ Fase reversa

La fase estacionaria o columna es no polar (C18, C8, Fenilo, C3) y la fase móvil es polar (agua, metanol, acetonitrilo). Se puede utilizar tanto en moléculas no polares, polares, iónicas y ionizables. Los analitos polares se retienen menos y los hidrofóbicos se retienen más [28].

La pioglitazona al ser un ácido débil con un pKa de 5.9 soluble en agua, vuelve sencillo su análisis por esta técnica cromatográfica.

1.4 Validación

Es conocido a nivel internacional que los laboratorios deben tomar las medidas necesarias para proveer datos confiables. Validar un método es un proceso necesario para demostrar que un método analítico es apto para cumplir el motivo por el cual se desarrolló y que es capaz de ser exacto, preciso y reproducible [29].

El objetivo de validar un método no es solo obtener las estimaciones de veracidad o precisión, sino es poner a prueba la aptitud del método e identificar parámetros críticos de este [30].

¿Por qué es necesario validar?

- Para asegurar calidad
- Es un componente esencial que un laboratorio debe establecer para producir datos confiables.
- Obtener acreditación de agencias internacionales
- Registro de una molécula nueva

Si no se tiene evidencia de que el método desarrollado es de calidad, las decisiones críticas que se tomen en base a él no serán confiables, llevando a la posibilidad de cometer errores, los cuales pueden ser críticos a la hora de tener la vida de un paciente en nuestras manos.

Es por eso por lo que muchos países cuentan con documentos mandatorios para la validación de métodos bioanalíticos como la FDA, la EMA, las guías ICH, ANVISA de Brasil, MHLW de Japón y la NOM-177-SSA1-2013 de nuestro país [31].

En toda la normativa tanto internacional como nacional antes mencionada, los parámetros necesarios para la validación de un método bioanalítico son los siguientes:

1.4.1 Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar al compuesto de interés, en presencia de otros compuestos dentro de la muestra [32].

1.4.2 Límite inferior de cuantificación

La concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio [26].

1.4.3 Linealidad del método

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra [32].

1.4.4 Intervalo de cuantificación

Establece el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. Se puede caracterizar por uno o más intervalos

constituidos al menos por 5 concentraciones distintas, cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del intervalo [32].

1.4.5 Recobro absoluto

Análisis de por lo menos 3 concentraciones conocidas (baja, media y alta) del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, dentro del intervalo. Se comparan estos resultados con las respuestas de las soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta (s) razón (es) no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del intervalo [32].

1.4.6 Precisión

El grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad [32].

1.4.6.1 Repetibilidad

La precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo [32].

1.4.6.2 Reproducibilidad

En el caso de que participen dos o más analistas, evaluar su efecto en la precisión del método. Se mide la capacidad del método de ser reproducido o replicado por otros [32].

1.4.7 Exactitud

La concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia [32].

1.4.8 Estabilidad de la muestra

La estabilidad de la muestra es la propiedad del compuesto por analizar en una matriz biológica, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta el análisis de todas las muestras, así como el reanálisis (en caso de realizarse este último) [32].

1.4.9 Robustez

Capacidad de un método para no verse afectado por pequeñas variaciones en los parámetros del método como posiblemente podría ocurrir durante el uso normal del método (pH, composición de fase móvil, etc.) [32].

1.5 Justificación

La pioglitazona es metabolizada por el CYP2C8 [33] que es el mismo citocromo responsable del metabolismo del paclitaxel [19]. Los pacientes que expresan polimorfismos diferentes al salvaje presentan también modificaciones en la farmacocinética del paclitaxel [19] que han sido correlacionadas con falla terapéutica por toxicidad. Esta toxicidad se explica por una disminución en la constante catalítica del CYP2C8 lo que reduce el metabolismo y eliminación de paclitaxel y su consecuente acumulación del fármaco [19]. La evidencia que encontramos se relaciona con el metabolismo del paclitaxel, no con su unión al receptor. México es un país en desarrollo donde el uso de la farmacogenómica no es rutinario, y no encontramos datos reportados para el metabolismo de la pioglitazona.

Dado que la pioglitazona y el paclitaxel son metabolizados por el mismo citocromo y que existen datos de toxicidad que pueden deberse a la acumulación de la concentración de pioglitazona [3], creemos que vale la pena buscar la correlación entre la expresión de los diferentes polimorfismos y los parámetros farmacocinéticos de la pioglitazona.

El primer paso para la determinación de la posible correlación es contar con un método bioanalítico validado que nos permita confiar en los resultados analíticos que serán la base del cálculo de estos parámetros farmacocinéticos.

Con el método que desarrollaremos y validaremos podremos:

1. Monitorear las concentraciones en estado estacionario de pioglitazona en plasma.
2. Conocer la farmacocinética del fármaco en la población mexicana.

1.6 Hipótesis

Se puede desarrollar un método cromatográfico bioanalítico útil, de calidad, seguro, reproducible, confiable y robusto para la cuantificación de pioglitazona y su posterior aplicación en investigación clínica.

1.7 Objetivos

Objetivo General

- Desarrollar y validar una técnica de HPLC-PDA para la determinación de la pioglitazona en plasma.

Objetivos Específicos

- Encontrar las condiciones experimentales adecuadas en nuestro equipo.
- Desarrollar los métodos cromatográficos y de extracción del plasma para la cuantificación de pioglitazona en plasma.
- Validar el método por HPLC-PDA según los parámetros reportados en la normativa.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Material biológico

El plasma fue donado por la Unidad de Medicina transfusional del Hospital Civil de Guadalajara, además de 5 voluntarios independientes para la prueba de selectividad. Teniendo como criterios de inclusión 8 horas de ayuno y no haber tomado medicamentos 7 días antes de la donación.

2.1.2 Reactivos y disolventes

- La pioglitazona provista por Sigma-Aldrich con un número de lote: LRAB3624
- La rosiglitazona provista por USP con un número de lote: F0J407
- Fosfato monobásico de potasio provisto por J.T Baker con número de lote: M02C08
- Fosfato dibásico de potasio provisto por J.T Baker con número de lote: E29454
- Metanol provisto por J.T. Baker con número de lote: Y28C33
- Acetonitrilo provisto por J.T. Baker con número de lote: V49C57
- Agua MiliQ
- Ácido perclórico provisto por Sigma-Aldrich con un número de lote: SHBJ0892

2.2 Desarrollo del método

2.2.1 Desarrollo del sistema cromatográfico

En la figura 3 se muestran los criterios que se tomaron a consideración y los pasos necesarios para el óptimo desarrollo del método analítico de interés.

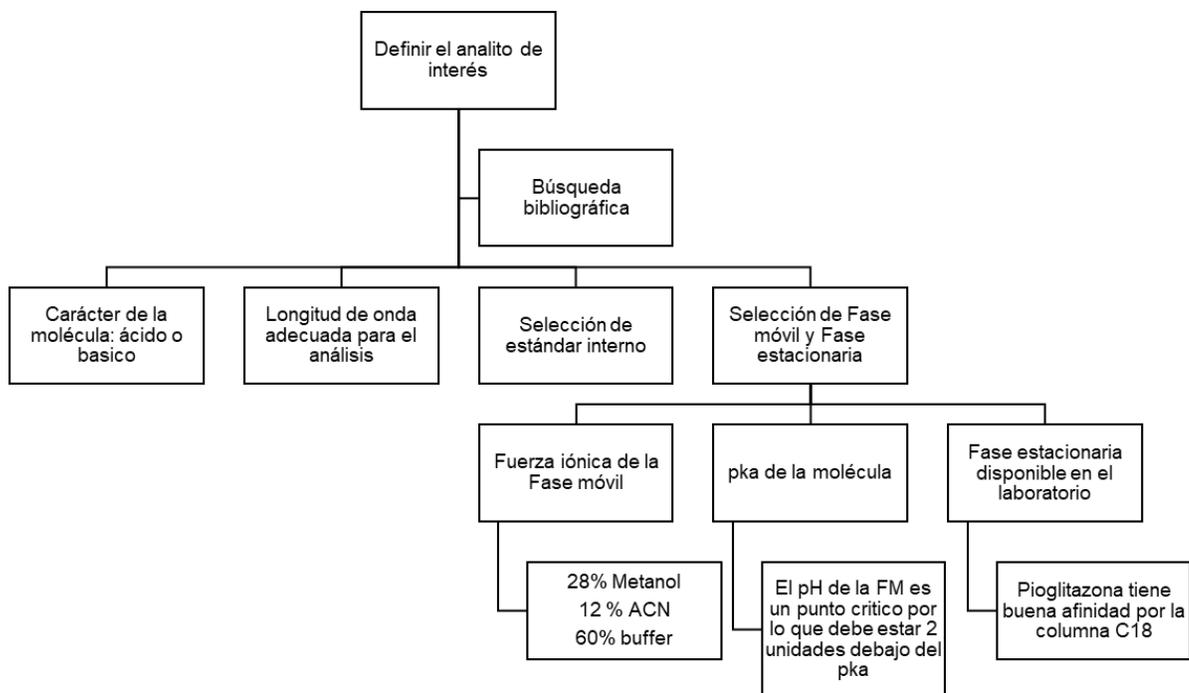


Figura 3 Desarrollo del método Bioanalítico

Para el desarrollo del método nos basamos en el artículo de *Sripalakit* [34].

A las condiciones cromatográficas solo se les tuvo que hacer un pequeño ajuste en las proporciones de los componentes, para que, de esta manera, obtener el pico de los analitos de interés, en un tiempo de retención adecuado, pero el flujo y la temperatura fueron los mismos que los reportados en el artículo antes citado.

- Propuesta del artículo

Flujo de columna 1.2 ml/min	✓
T columna 27° C	✓
pH 2.5	✓
Metanol 40%	28%
ACN 12%	12%
Buffer 48%	60%

Fase móvil por utilizar

Resultados del desarrollo del método bioanalítico

Con este método que desarrollamos, se obtuvieron los siguientes resultados previos que son los siguientes cromatogramas (fig 4, 5, 6, 7).

Pioglitazona y Rosiglitazona en solución

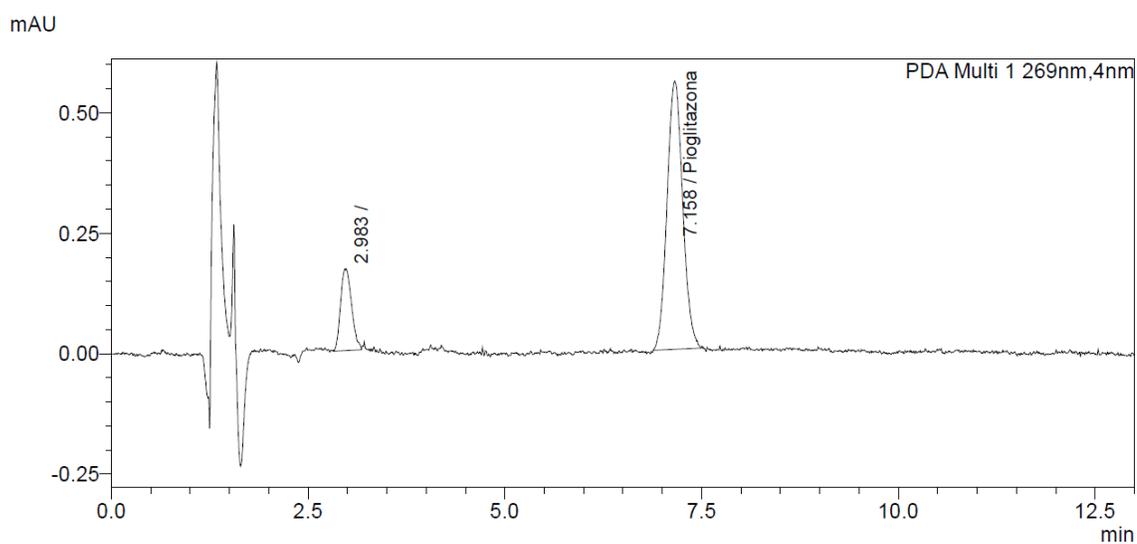


Figura 4 Cromatograma en solución de pioglitazona y rosiglitazona medido a 269 nm

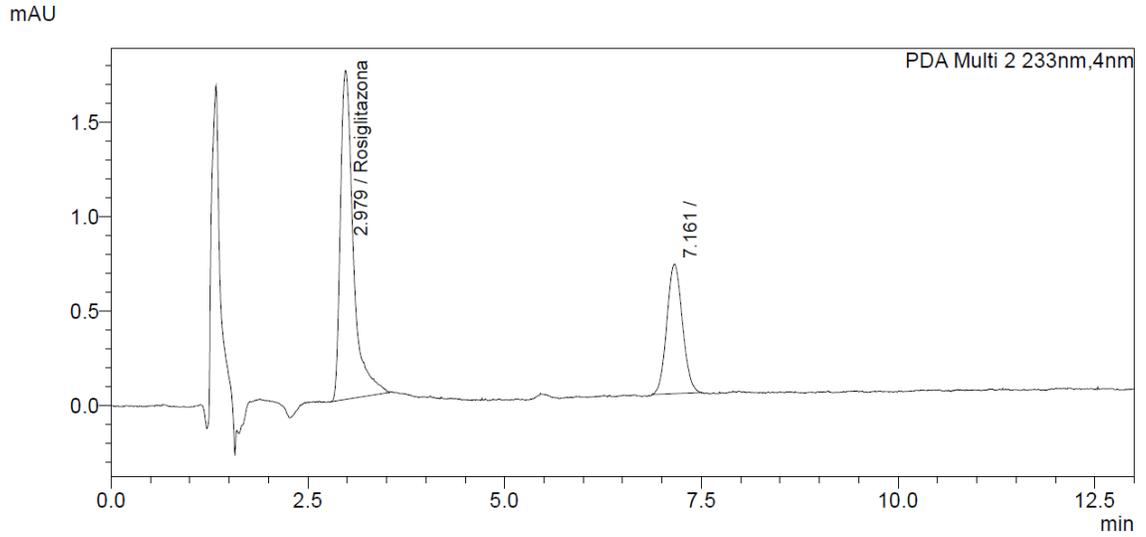


Figura 5 Cromatograma en solución de pioglitazona y rosiglitazona medido a 233 nm

Pioglitazona y Rosiglitazona en plasma

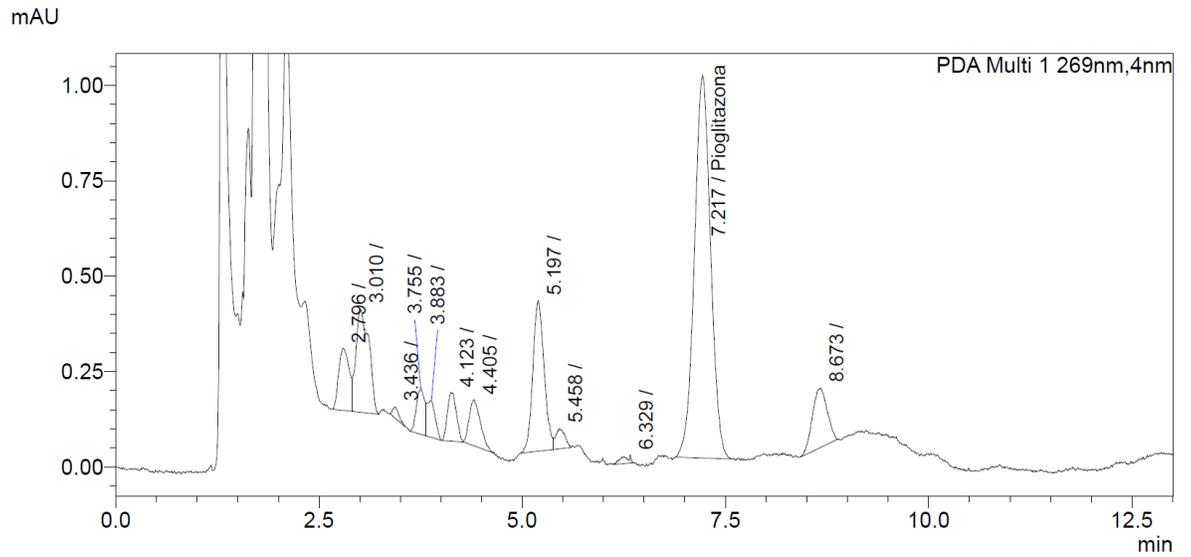


Figura 6 Cromatograma en plasma de pioglitazona y rosiglitazona medido a 269 nm

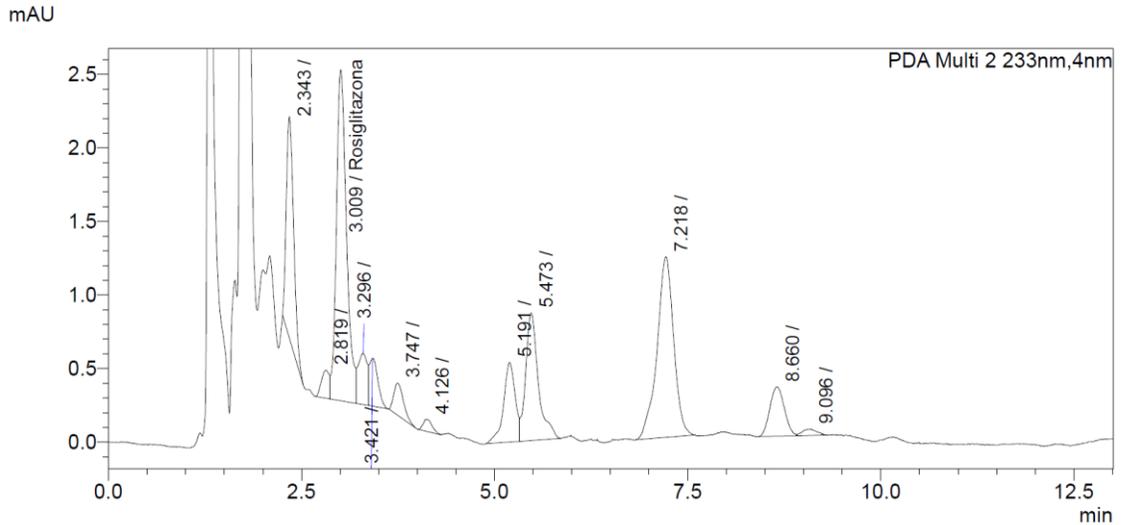


Figura 7 Cromatograma en plasma de pioglitazona y Rosiglitazona medido a 233 nm

Tanto en la figura 4 como en la 6, se observa que la pioglitazona absorbe mejor a una longitud de onda de 269 nm, mientras que en la imagen 5 y 7 se ve que la absorción de rosiglitazona es mejor a 233 nm.

Al estar desarrollando el método, nos dimos cuenta de que el pH de la fase móvil era crítico, ya que una pequeña variación provocaba grandes cambios en los tiempos de retención de los analitos.

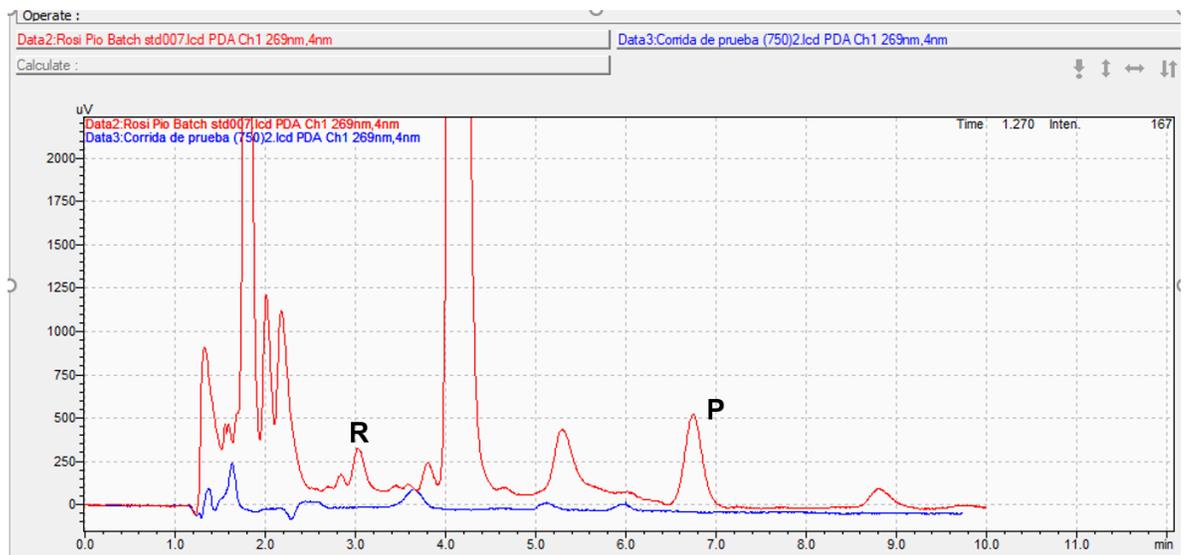


Figura 8 Comparación de dos cromatogramas de la misma muestra con FM a diferente pH

En el cromatograma azul, se ve la corrida de una muestra de plasma cargada con pioglitazona y rosiglitazona con la Fase Móvil a un pH de 3.5, mientras que en el rojo se ve el cromatograma de la misma muestra después de haber ajustado la FM a un pH de 2.5.

2.2.2 Desarrollo del método de extracción de la muestra

Una vez establecidas las condiciones del equipo, se procedió a probar los métodos de extracción del plasma, teniendo dos opciones; precipitación de proteínas con ácido perclórico y extracción en fase sólida, eligiendo esta última ya que se obtiene mejor sensibilidad, como se muestra en la figura 10.



Figura 9 Métodos de extracción de las muestras.

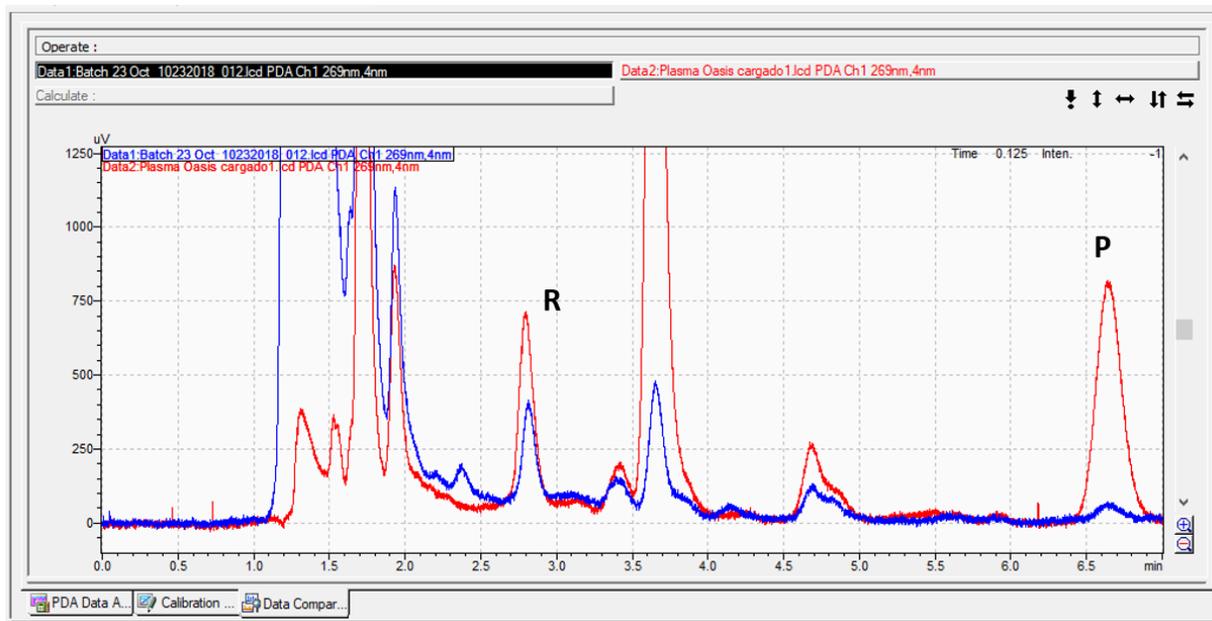


Figura 10 Comparación de los dos métodos de extracción de plasma

En el cromatograma azul se observa el método de extracción con ácido perclórico, mientras que en el cromatograma rojo se observa la extracción en fase sólida. Cabe mencionar que ambas muestras estaban cargadas con la misma concentración de pioglitazona y rosiglitazona.

2.3 Procedimiento general para el análisis de las muestras

2.3.1 Condiciones cromatográficas

Instrumento: HPLC-PDA Shimadzu Prominence-i LC-2030C 3D Plus

Parámetro de cuantificación: altura

Determinación: PDA (pioglitazona 269 nm, rosiglitazona 231 nm)

Temperatura: 27°C

Flujo: 1,2 mL/min

Columna: Zorbax Eclipse Plus C18, 15 cm, 4,6 mm d.i., 5 micrometros

Fase móvil: Metanol: ACN: buffer pH 2,5 (28:12:60)

Volumen de inyección:10µL

Estándar interno: rosiglitazona

2.3.2 Procedimiento general para el análisis de muestras en plasma

2.3.2.1 Método de extracción de la muestra

1. Se tomaron 600 µl de plasma y se cargó con 50 µl de las soluciones como se indica en la tabla 1.
2. Se agregó 700 µl de ácido perclórico al 60%.
3. Se agitó en el vortex por 10 segundos.
4. Se centrifugó a 10,000 rpm, 4 °C por 10 min.
5. Activamos el cartucho HLB con 1 mL de MeOH al 100% y se aplicó vacío.
6. Se agregó 1 mL de agua bidestilada y se aplicó vacío.
7. Se cargó la muestra y se aplicó vacío.
8. Se lavó con 1 mL de MeOH al 5% y se aplicó vacío.
9. Se eluyó con 500 µl de MeOH 100% y se aplicó vacío.
10. Se filtró con un filtro de nylon de 0.22 µm previamente acondicionado con MeOH al 100%.
11. La muestra quedó lista para ser inyectada al cromatógrafo

2.3.2.2 Curva de calibración en plasma

Tabla 1 Preparación de la curva de calibración

Pioglitazona	Solución 3 Rosiglitazona	Plasma	Concentración Pioglitazona	Concentración Rosiglitazona
50 µl de solución a	50 µl	600 µl	58 ng	714 ng
50 µl de solución b	50 µl	600 µl	107 ng	714 ng
50 µl de solución c	50 µl	600 µl	357 ng	714 ng
50 µl de solución d	50 µl	600 µl	750 ng	714 ng
50 µl de solución e	50 µl	600 µl	1000 ng	714 ng
50 µl de solución f	50 µl	600 µl	1500 ng	714 ng

2.4 Procedimiento para la preparación de soluciones

2.4.1 Preparación del Buffer

Se pesó 1.36 g de fosfato monobásico de potasio y 1.74 g de fosfato dibásico de potasio, y se disolvieron en aproximadamente 800 ml de agua miliQ, se ajustó el pH de la solución a $2,5 \pm 0,05$ con ácido fosfórico diluido. Posteriormente, se aforó con agua hasta 1000 ml. Se filtró por membrana de 0,22 µm y se desgasificó.

2.4.2 Preparación de las soluciones Estándar

Preparación de las soluciones de pioglitazona (problema). Se pesaron 10 mg de pioglitazona, y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregaron 5 mL de metanol, se disolvió y se aforó con metanol, esta solución tiene una concentración final de 1 mg/mL (**Solución 1**). De esta solución se volvió a tomar 1 mL y se llevó a 10 mL con metanol (**Solución 2**).

De la solución 2 se tomaron los siguientes volúmenes para llegar a estas concentraciones. (Tabla 2)

Tabla 2 Preparación de la solución de pioglitazona

Solución 2	Metanol	Concentración final
14 µl	1984 µl	806 ng (a)
15 µl	985 µl	1,500 ng (b)
50 µl	950 µl	5,000 ng (c)
105 µl	895 µl	10,500 ng (d)
140 µl	860 µl	14,000 ng (e)
210 µl	790 µl	21,000 ng (f)

Preparación de la solución de rosiglitazona (estándar interno). Se pesaron 10 mg de rosiglitazona, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregaron 5 mL de metanol, se disolvieron y se aforó con metanol, esta solución tiene una concentración final de 1 mg/mL (**Solución 1**). De esta solución se volvió a tomar 1 mL y se llevó a 10 mL con metanol (**Solución 2**). Y por último de la solución 2 se tomó 1 mL y se llevó a 10 mL con metanol (**Solución 3**).

2.4.3 Preparación de la solución de Ácido Perclórico 4 M

En un matraz volumétrico de 100 ml se colocaron 60 ml de Ácido Perclórico y se aforó con agua.

2.4.4 Preparación de la solución de Metanol al 5%

En un matraz volumétrico de 100 ml se colocaron 5 ml de Metanol y se aforó con agua.

2.5 Procedimiento para la validación del método

La validación del método cromatográfico se hizo conforme a los lineamientos establecidos por la NOM-177-SSA1-2013 y los reportados en el artículo de Robert Causon (1997) [35].

2.5.1 Adecuabilidad del sistema

Se inyectó por sextuplicado una solución preparada con 50 µl de solución e (Tabla 2) de pioglitazona , 50 µl de solución 3 de rosiglitazona y 600 µl de MeOH.

De las respuestas producidas se obtuvo:

Coefficiente de variación entre las respuestas producidas por pioglitazona /rosiglitazona.

Criterios de aceptación:

Coefficiente de variación menor o igual a 3.

2.5.2 Selectividad

Esta prueba se realizó con 6 plasmas diferentes, además de un plasma hemolizado, uno lipémico y otro con medicamentos concomitantes, en los cuales se esperó que no existan interferencias en nuestro analito de interés.

2.5.3 Límite inferior de cuantificación

Se determinó con base en el 5% del $C_{máx}$ reportado para el analito de interés.

2.5.4 Linealidad

Se evaluó la linealidad inyectando por duplicado la curva de calibración incluida en la tabla 3. Esta curva se preparó por quintuplicado.

Tabla 3 Curva de calibración para la prueba de Linealidad

Nivel de la curva	Solución Pioglitazona	Solución Rosiglitazona	Plasma	Concentración Pioglitazona	Concentración Rosiglitazona
Blanco matriz	50 µl MeOH	50 µl MeOH	600 µl	-----	----
Blanco 0	50 µl MeOH	50 µl	600 µl	-----	714 ng
1	50 µl solución a	50 µl	600 µl	58 ng	714 ng
2	50 µl solución b	50 µl	600 µl	107 ng	714 ng
3	50 µl solución c	50 µl	600 µl	357 ng	714 ng
4	50 µl solución d	50 µl	600 µl	750 ng	714 ng
5	50 µl solución e	50 µl	600 µl	1000 ng	714 ng
6	50 µl solución f	50 µl	600 µl	1500 ng	714 ng

*Muestra blanco y 0 no se incluyen en los cálculos.

De las respuestas producidas por pioglitazona / rosiglitazona, se obtuvo:

- La gráfica de concentración vs respuesta.
- La ecuación de la recta.
- Coeficiente de correlación.
- Análisis de residuales. Se analizó la diferencia entre los valores observados de **y** y los valores de **y ajustados o residuales** utilizando los datos de las 5 curvas de calibración preparadas. Se construyó una gráfica de residuales estudentizados (residual crudo/error estándar) vs log de la concentración para evaluar la bondad de ajuste del modelo.

Criterios de aceptación para linealidad:

$$R^2 \geq 0.98$$

La variación debe ser $\pm 15\%$ de la concentración, exceptuando el primer punto que debe ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal. El 75% de los puntos de la curva deben cumplir ese criterio en cada corrida de validación.

Si se observa heterocedasticidad conforme aumenta la concentración, se busca un modelo de regresión ponderado.

2.5.5 Precisión y exactitud del método

Se preparó por triplicado la curva incluida en la tabla 3 en 3 días diferentes.

De las respuestas producidas por pioglitazona / rosiglitazona, se obtuvo:

La concentración de pioglitazona en los niveles 1,3,4 y 5 interpolando en la curva de calibración.

Se realizó un análisis de varianza de una sola vía, en el cual no debió existir diferencia significativa.

Se calculó el porcentaje de sesgo ($\% \text{Sesgo} = ((\text{concentración experimental} - \text{concentración real}) / \text{concentración real}) * 100$).

Criterios de aceptación para precisión:

La variación debe ser $\pm 15\%$ de la concentración, exceptuando el primer punto que debe ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal.

Criterios de precisión para exactitud:

El porcentaje de sesgo debe ser $\pm 15\%$ en todas las concentraciones, exceptuando el primer punto que debe ser de $\pm 20\%$.

2.5.6 Recobro absoluto

Se compararon las respuestas de la curva de calibración en plasma, vs curva de calibración en solución.

De las respuestas producidas por pioglitazona / rosiglitazona, se obtuvo:

El recobro absoluto.

$\% \text{ Recobro absoluto} = (\text{Recobro Plasma} / \text{Recobro solución}) \times 100$

Criterios de aceptación para recobro:

El recobro absoluto de la muestra tratada debe ser de al menos el 50%.

2.5.7 Robustez

Reproducibilidad internalista. Se utilizaron los datos obtenidos en los dos últimos días de la prueba de precisión. Otro analista analizó 4 concentraciones de la curva, 3 réplicas en 2 días.

De las respuestas producidas por pioglitazona / rosiglitazona, se obtuvo:

La concentración de pioglitazona en cada nivel interpolando en la curva de calibración.

Un análisis de varianza de dos factores, en el cual no debió existir diferencia significativa.

Se calculó el porcentaje de desviación.

Criterios de aceptación para precisión:

La variación debe ser $\pm 15\%$ de la concentración, exceptuando el primer punto que debe ser $\pm 20\%$ de la concentración nominal.

2.5.8 Estabilidad de la muestra

Para cada caso, se prepararon los niveles de la curva 2 y 5 de acuerdo con la tabla 3 por duplicado.

Estabilidad a corto plazo:

1. Estabilidad de las soluciones.

Solución de comparación. Se prepararon las soluciones de pioglitazona y rosiglitazona como se indica en el punto 4.2.4 (preparación de soluciones). Las soluciones de comparación debieron estar recién preparadas.

- a. Solución de referencia. Se tomaron 50 μ l de solución de pioglitazona e (Tabla 2) recién preparada, 50 μ l de solución 3 de rosiglitazona y 600 μ l de MeOH. Se filtró con membrana de nylon 0.22 μ m y se inyectaron por triplicado.

Solución de prueba.

- a. Solución de prueba. Se tomaron 50 µl de solución de la pioglitazona e (Tabla 2) recién preparada de una solución madre almacenada (en Revco a -70° C), 50 µl de solución 3 de rosiglitazona y 600 µl de MeOH. Se filtró con membrana de nylon 0.22 µm y se inyectó por triplicado.

De las respuestas producidas por pioglitazona y rosiglitazona, se obtuvo:

La respuesta de pioglitazona y rosiglitazona. El valor promedio de la respuesta analítica del o las soluciones en estudio se compararon con respecto al valor promedio obtenido por el análisis por triplicado de una solución recién preparada.

Criterios de aceptación:

Las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no es mayor que 15%.

2. Estabilidad de muestras en el automuestreador.
 - a. Solución de comparación (baja y alta). Se prepararon por duplicado el nivel 2 y 5 de la curva de calibración incluida en la tabla 3. Se inyectó cada solución por triplicado. Esta solución se utilizó recién preparada.
 - b. Solución de prueba (baja y alta). Se preparó por duplicado el nivel 2 y 5 de la curva de calibración incluida en la tabla 3. Se inyectó cada solución por triplicado a intervalos de 5 inyecciones por 24. Se conservaron las muestras en el automuestreador durante toda la prueba.

Estabilidad a largo plazo:

1. Ciclos de congelación/descongelación.
 - a. Se preparó una curva de calibración como se indica en la tabla 3.
 - b. Solución de prueba (baja y alta). Se preparó por duplicado el nivel 2 y 5 de la curva de calibración incluida en la tabla 3. Se evaluó la estabilidad del(os) analito(s) en la matriz biológica, almacenadas a la temperatura de

congelación en que estarán las muestras reales por al menos 12 h, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación debe ser al menos de 3 ciclos.

2. Muestras procesadas.

- a. Se preparó una curva de calibración como se indica en la tabla 3.
- b. Solución de prueba (baja y alta). Se analizó por duplicado el nivel 2 y 5 de la curva de calibración incluida en la tabla 3 previamente procesados y almacenados en el REVCO. Se analizaron periódicamente inyectando cada una por triplicado hasta completar tres meses.

De las respuestas producidas por pioglitazona y rosiglitazona, se obtuvo:

La interpolación de las soluciones de prueba en una curva de calibración recién preparada.

Criterios de aceptación:

La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

3. Muestras sin procesar.

- a. Se preparó una curva de calibración como se indica en la tabla 3.
- b. Muestra control baja. Se cargaron 14 muestras de 600 µl plasma blanco con 50 µl de solución de pioglitazona b (Tabla 2) y 50 µl de solución de rosiglitazona 3. Se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio.
- c. Muestra control alta. Se cargaron 14 muestras de 600 µl plasma blanco con 50 µl solución de pioglitazona e y 50 µl de solución de rosiglitazona 3. Se almacenaron en las mismas condiciones que las muestras de estudio.

Se conservaron las muestras en congelación hasta su análisis. Se analizaron periódicamente hasta completar tres meses, como se indica en el tratamiento de extracción:

- a. Dos muestras control baja inyectando cada una por triplicado.
- b. Dos muestras control alta inyectando cada una por triplicado.

De las respuestas producidas por pioglitazona y rosiglitazona, se obtuvo:

La interpolación de las soluciones de prueba en una curva de calibración recién preparada.

Criterios de aceptación:

La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

3. Resultados

3.1 Adecuabilidad del sistema

Se realiza cada vez que se van a inyectar muestras para comprobar que el sistema cromatográfico está estable.

		System Suitability Report	
System Suitability Report			
PC Name	DESKTOP-7J6OVQ9	1	0.620365
Method File Name	C:\LabSolutions\Data\Project1\Pioglitazona\PIO 01OCT.lcm	2	0.602682
Processed by	System Administrator	3	0.613827
Date Reported	1/17/2019 9:21:47 AM (-0600)	4	0.617874
Summary Result	Pass	5	0.617612
		6	0.588300
		Average	0.610110
		%RSD	2.029

<Criteria>					
ID#	Name	Parameter	Lower Limit	Upper Limit	%RSD
PDA-2	Pioglitazona	Height Ratio	-	-	3.000
<Height Ratio>					
Result	Pass				
Data#	PDA-2				

Figura 11 Adecuabilidad del sistema

Para que la prueba sea satisfactoria se debe obtener un coeficiente de variación menor o igual a 3, si no se obtiene, se hace un análisis sistemático de fallas. No se puede llevar a cabo la corrida hasta que no se cumplan los criterios de adecuabilidad. En la figura 11 se muestra un resultado óptimo de la prueba de Adecuabilidad, obteniendo un CV de 2.029, igualmente se muestra que el equipo tiene de limite aceptar un 3% de variación.

En la siguiente tabla se observan todos los valores obtenidos en los diferentes días en los que se analizó pioglitazona para la validación del método con sus respectivos CV obtenidos al hacer la Adecuabilidad del sistema (tabla 4).

Como es de notarse hay un periodo de días en que el Coeficiente de Varianza de la Adecuabilidad del sistema es mayor a lo permitido, por lo que los análisis

de esos días no están considerados. Esto se debió a que la vida útil de la fase estacionaria había terminado, y esto se solucionó al cambiarla y poner una nueva.

En la figura 12 se muestra el grafico de los valores de la tabla 4, donde se observan los días en los que la prueba de Adecuabilidad no fue satisfactoria ya que el CV fue mayor a 3.

Tabla 4 Resultados por cada día de la validación del método de la prueba de Adecuabilidad

Día	CV Height Ratio
10-ene	1.776
14-ene	2.057
15-ene	1.228
16-ene	0.94
24-ene	0.649
28-ene	2.049
30-ene	3.733
31-ene	1.384
07-feb	3.878
08-feb	3.089
13-feb	2.276
14-feb	3.484
27-feb	1.528
10-abr	1.178
24-abr	1.226
07-may	2.5
08-may	0.735
09-may	1.107
22-may	1.439
23-may	0.979

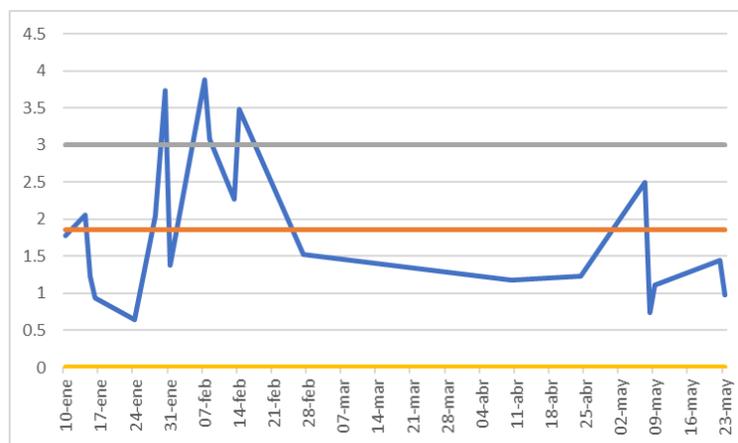


Figura 12 Gráfico de los CV obtenidos durante la validación del método al realizar la Adecuabilidad del sistema. Aceptando los datos que estén en el intervalo de 0 a 3.

3.2 Selectividad

Esta prueba se realizó con 6 plasmas de fuentes diferentes, un plasma hemolizado, un plasma lipémico y un plasma con medicamentos concomitantes (metformina), en los cuales se espera que no existan interferencias en nuestros picos de interés.

Primero se inyectó un plasma blanco, en el cual se observó que no existieran interferencias en el tiempo que se esperaba el pico de rosiglitazona y pioglitazona. Posteriormente, se inyectaron los plasmas ya cargados, dando el resultado esperado.

Se esperaba el pico de rosiglitazona (R) en un tiempo de 3 minutos, aproximadamente, mientras que el de pioglitazona (P), a los 7.5 minutos. En el caso del plasma lipémico y con tratamiento concomitante, el tiempo de retención de pioglitazona cambió a 5.5 minutos cuando se cambió a una columna nueva.

Los cromatogramas de la prueba de selectividad se muestran en las figuras 13-21.

Plasma 1

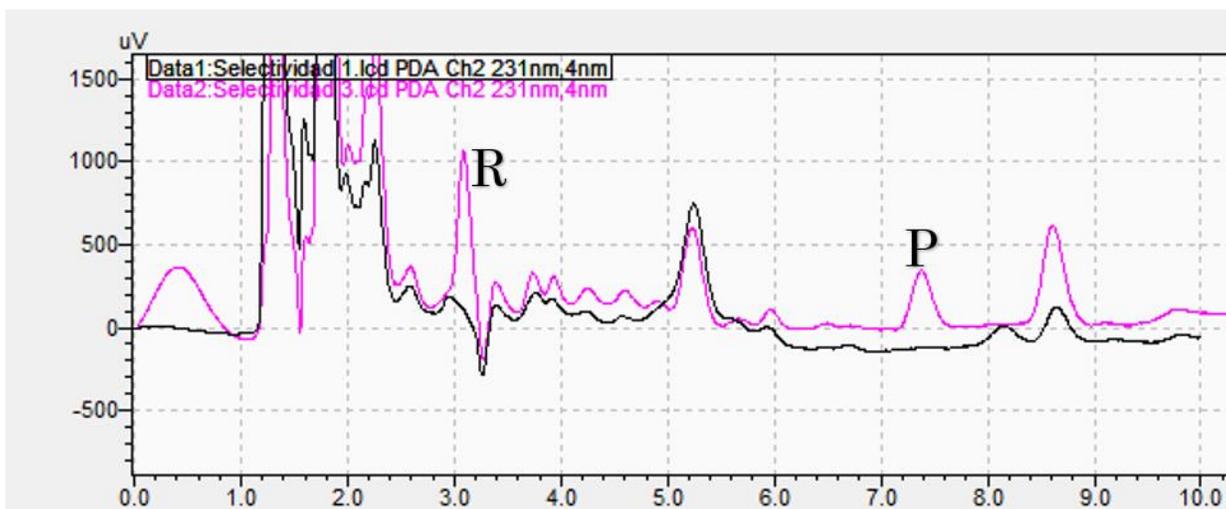


Figura 13 Se observa en color negro el plasma blanco y en rosa el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Plasma 2

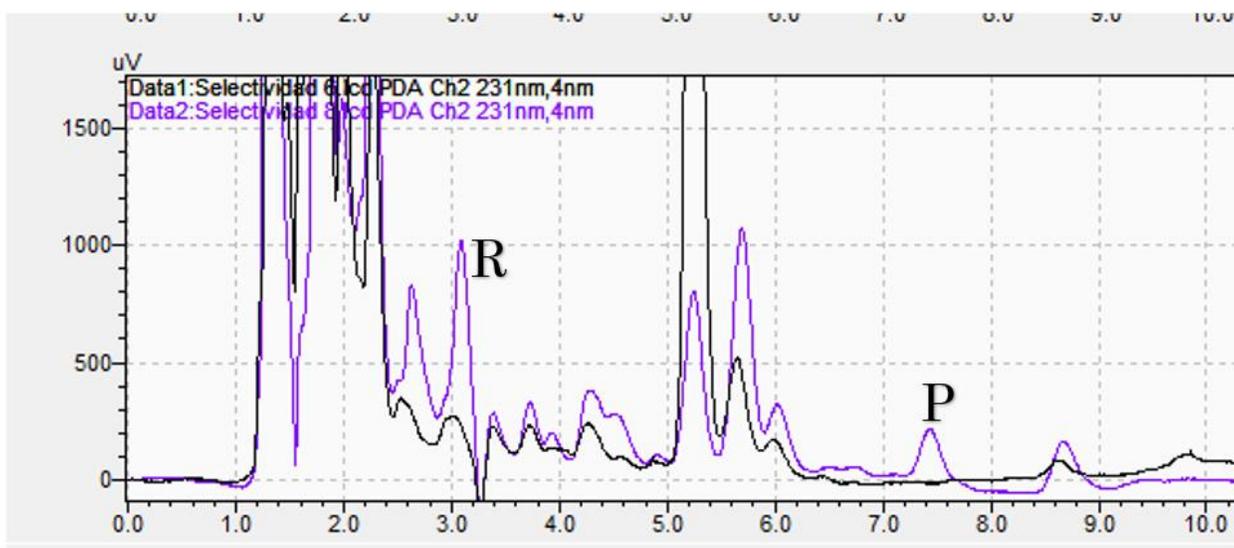


Figura 14 Se observa en color negro el plasma blanco y en morado el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Plasma 3

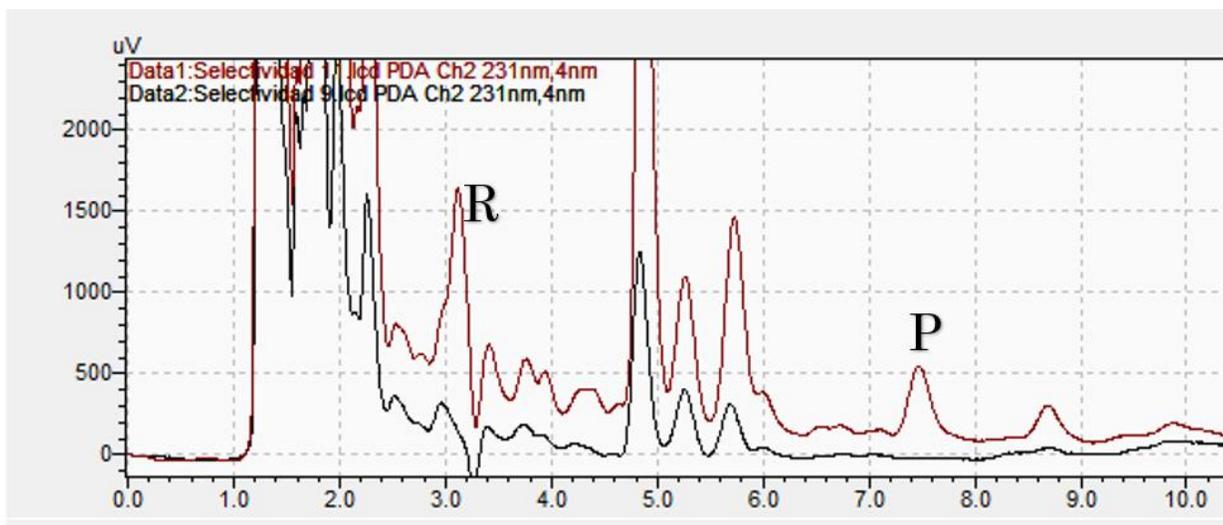


Figura 15 Se observa en color negro el plasma blanco y en café el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia

Plasma 4

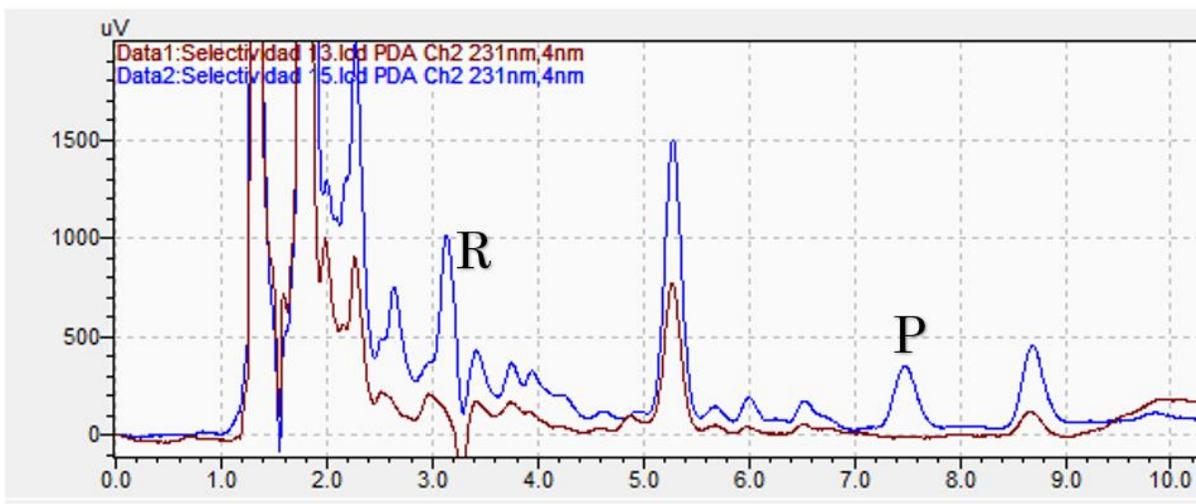


Figura 16 Se observa en color café el plasma blanco y en azul el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Plasma 5

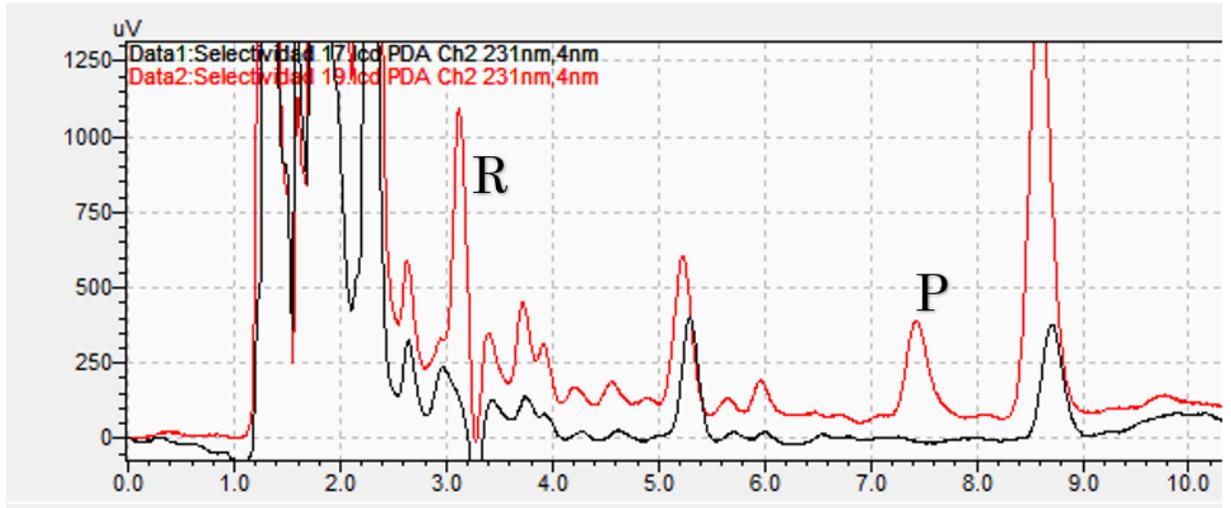


Figura 17 Se observa en color negro el plasma blanco y en rojo el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Plasma 6

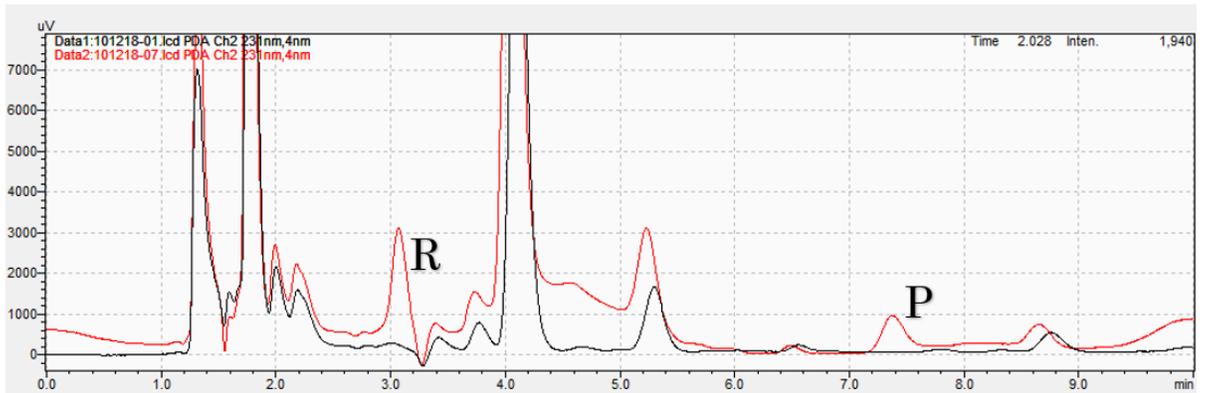


Figura 18 Se observa en color negro el plasma blanco y en rojo el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Hemolizado

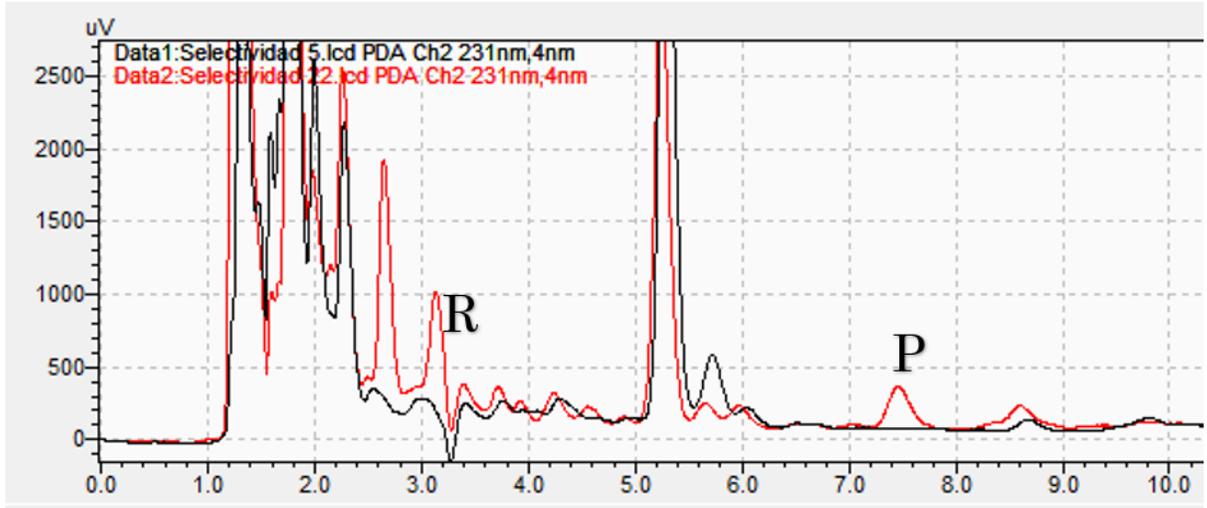


Figura 19 Se observa en color negro el plasma blanco y en rojo el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia

Lipémico

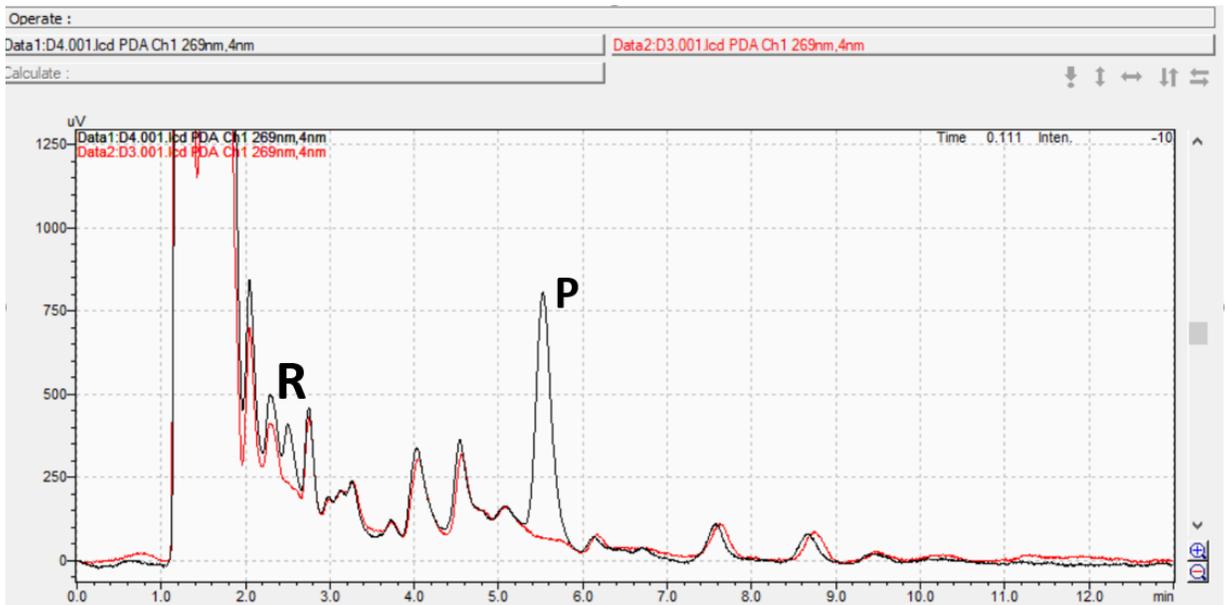


Figura 20 Se observa en color rojo el plasma blanco y en negro el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Tratamiento concomitante (Metformina)

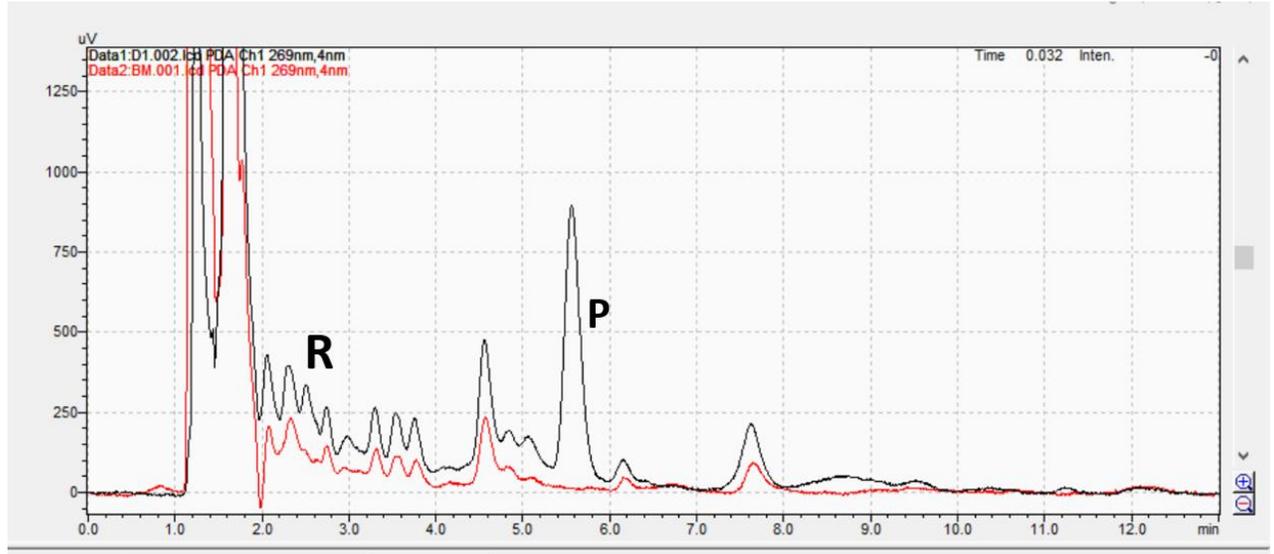


Figura 21 Se observa en color rojo el plasma blanco y en negro el plasma cargado. Se ve claramente que en ambos picos de interés (rosiglitazona y pioglitazona), en el plasma blanco no hay ninguna interferencia.

Los resultados obtenidos en el plasma hemolizado son de gran importancia, ya que demuestran que se pueden obtener buenos resultados aun cuando existan problemas con el manejo de la muestra, al igual con la muestra lipémica, ya que, si al realizar el estudio farmacocinético no se respetan las horas de ayuno, esto no interfiere con la detección y cuantificación de pioglitazona y rosiglitazona.

También es muy positivo que el tratamiento concomitante no interfiera con los picos de interés, ya que en el caso de los pacientes con DT2 casi siempre la pioglitazona es administrada con metformina.

3.3 Límite inferior de cuantificación

Se determina con base en el 5% del $C_{máx}$ reportado para el analito de interés. Según lo reportado por Sripalakit (2006), la $C_{máx}$ para pioglitazona es de 1598 ng/ml.

5% de 1598= 79.9 ng/ml

Gracias a nuestro método de extracción de muestra se logró un límite inferior de cuantificación de **58 ng/ml**. Por lo que se cumple y excede el requerimiento normativo.

3.4 Linealidad y repetibilidad

Para demostrar la linealidad del método se utilizaron 5 curvas de calibración realizadas el mismo día e inyectadas por duplicado. Los resultados de las curvas se observan en las figuras 22 a 27:

Tabla 5 Pesada de los estándares para la realización de las soluciones para la prueba de Linealidad

Dia 1 (10 Enero 2019)	
Pesada Pioglitazona (mg)	Pesada Rosiglitazona (mg)
10	11.2

Tabla 6 Concentraciones reales de la curva de calibración ajustadas al peso de los estándares para la prueba de Linealidad

Curva de Calibración	
Concentración Pioglitazona (ng/ml)	Concentración Rosiglitazona (ng/ml)
50	800
107	800
357	800
750	800
1000	800
1500	800

En las tablas 5 y 6 se observan las pesadas del día para la prueba de linealidad y las concentraciones reales obtenidas de los pesos del día.

Curva A		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
A1.001	44	88
A1.002	44	
A2.001	107	100
A2.002	107	
A3.001	314	86
A3.002	302	
A4.001	667	89
A4.002	667	
A5.001	997	98
A5.002	972	
A6.001	1583	107
A6.002	1618	

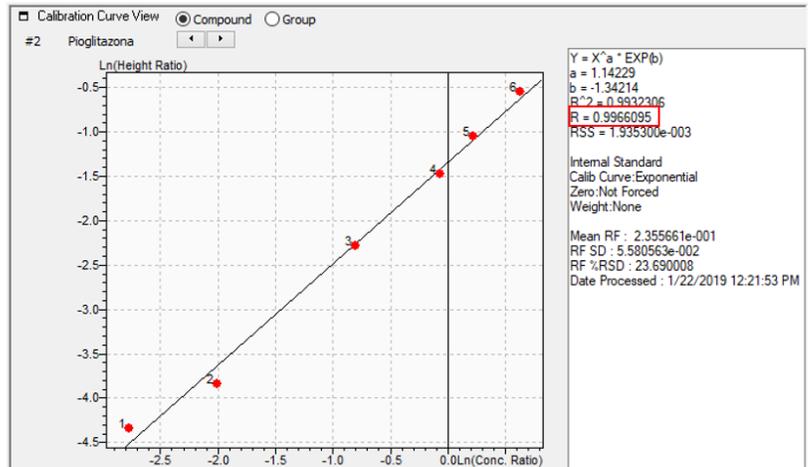


Figura 22 Se muestran los resultados obtenidos en la curva A de calibración, del lado izquierdo se observan las concentraciones y los recobros obtenidos en cada nivel, mientras que del lado derecho se observa la linealidad de la curva de calibración con una R2 de 0.99

Curva B		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
B1.001	51	106
B1.002	55	
B2.001	107	98
B2.002	104	
B3.001	308	95
B3.002	372	
B4.001	740	98
A4.002	732	
B5.001	1059	106
B5.002	1064	
B6.001	1602	111
B6.002	1739	

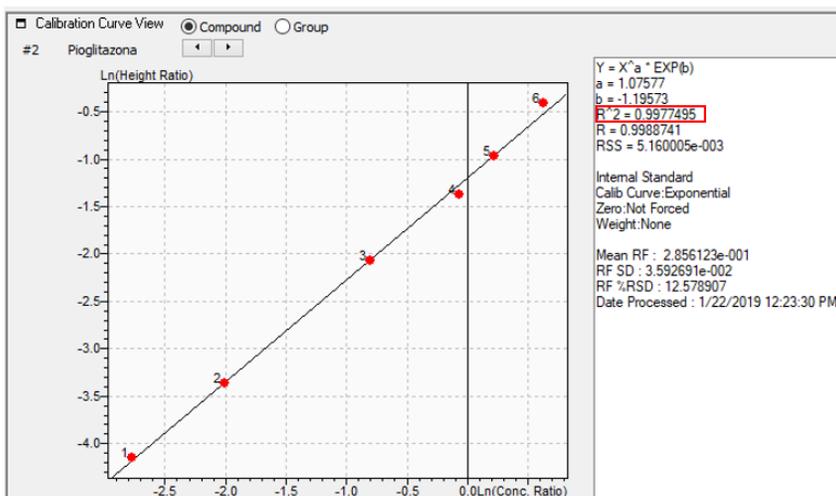


Figura 23 Se muestran los resultados obtenidos en la curva B de calibración, del lado izquierdo se observan las concentraciones y los recobros obtenidos en cada nivel, mientras que del lado derecho se observa la linealidad de la curva de calibración con una R2 de 0.99

Curva C		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
C1.001	58	113
C1.002	55	
C2.001	109	101
C2.002	107	
C3.001	376	98
C3.002	324	
C4.001	676	90
C4.002	678	
C5.001	990	101
C5.002	1026	
C6.001	1600	107
C6.002	1603	

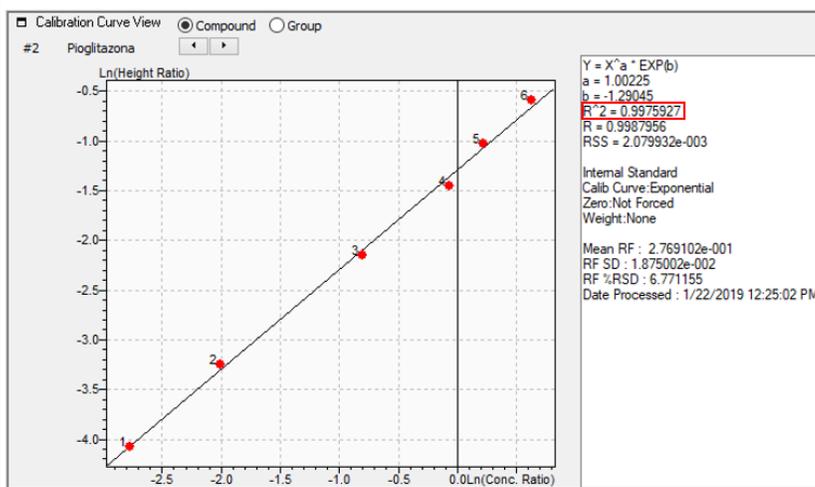


Figura 24 Se muestran los resultados obtenidos en la curva C de calibración, del lado izquierdo se observan las concentraciones y los recobros obtenidos en cada nivel, mientras que del lado derecho se observa la linealidad de la curva de calibración con una R2 de 0.99

Curva D		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
D1.001	55	111
D1.002	56	
D2.001	106	99
D2.002	107	
D3.001	401	111
D3.002	394	
D4.001	723	96
D4.002	722	
D5.001	1054	108
D5.002	1109	
D6.001	1640	110
D6.002	1670	

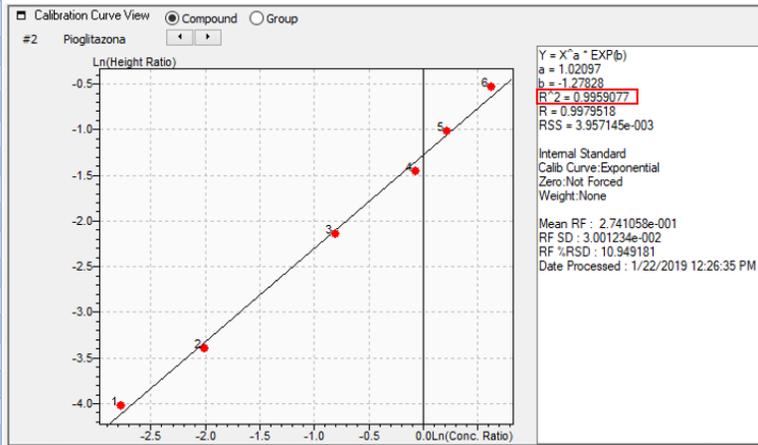


Figura 25 Se muestran los resultados obtenidos en la curva D de calibración, del lado izquierdo se observan las concentraciones y los recobros obtenidos en cada nivel, mientras que del lado derecho se observa la linealidad de la curva de calibración con una R2 de 0.99

Curva E		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
E1.001	51	116
E1.002	65	
E2.001	107	103
E2.002	114	
E3.001	373	102
E3.002	356	
E4.001	732	95
E4.002	686	
E5.001	1027	102
E5.002	1020	
E6.001	1658	113
E6.002	1724	

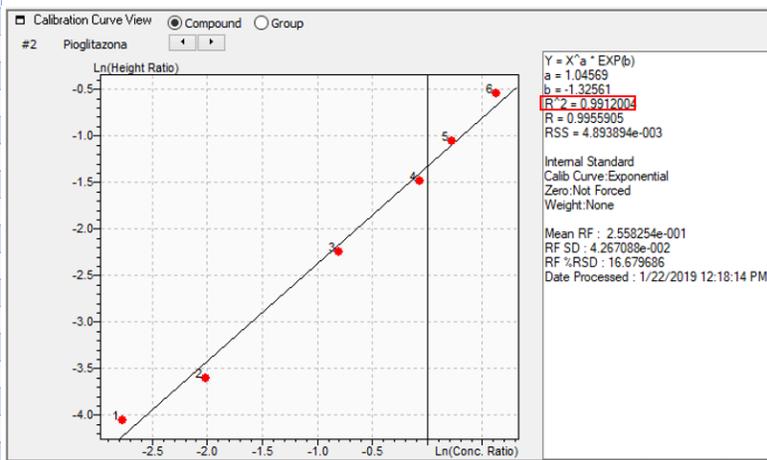


Figura 26 Se muestran los resultados obtenidos en la curva E de calibración, del lado izquierdo se observan las concentraciones y los recobros obtenidos en cada nivel, mientras que del lado derecho se observa la linealidad de la curva de calibración con una R2 de 0.99

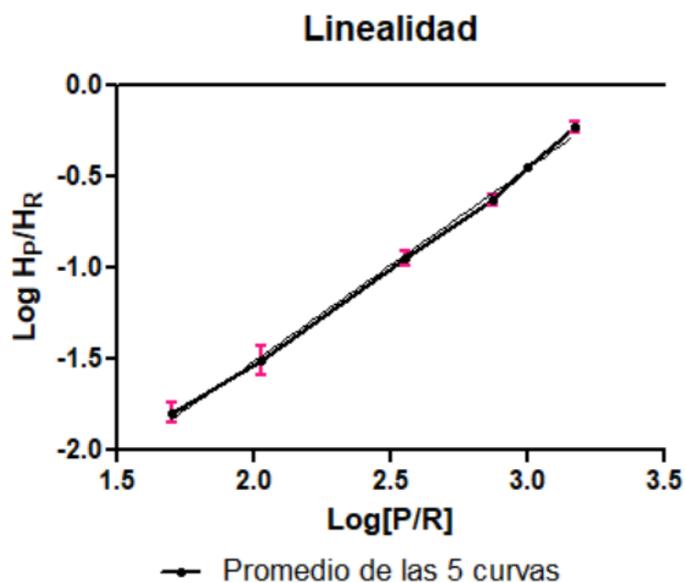


Figura 27 Se muestra el promedio de las 5 curvas de calibración realizadas el mismo día

Donde:

- ❖ H_P es la Altura de pioglitazona
- ❖ H_R es la Altura de rosiglitazona

Se presentan los datos de la pendiente, el intercepto y el coeficiente de determinación de cada una de las 5 curvas de calibración preparadas, además de los datos de la desviación estándar, error estándar y coeficiente de varianza en la tabla 7.

Tabla 7 Resultados de la pendiente, el intercepto, y el R2 de la prueba de linealidad

Número de curva	Pendiente	Intercepto	R ²
A	1.14229	-1.34214	0.993231
B	1.07577	-1.19573	0.99775
C	1.00225	-1.29045	0.997593
D	1.02097	-1.27828	0.995908
E	1.04569	-1.32561	0.9912
Promedio	1.057394	-1.286442	0.995136
DE	0.0548852	0.05689409	0.002854
EE	0.0224068	0.02322691	0.001165
C.V	0.0519061	-0.0442259	0.002868

Para estudiar la bondad de ajuste del modelo matemático, se realizó un análisis de residuales estudentizados, con el cual podemos determinar valores atípicos. El 95% de los valores deben caer en el intervalo de -2 a 2 desviaciones estándar.

Como se observa en la figura 28, con ambos modelos tanto el lineal como el exponencial se tienen el 100% de los valores dentro del intervalo de -2 a 2 desviaciones, por lo cual ambos podrían funcionar, pero con el modelo exponencial se tienen mejores recobros y coeficiente de determinación por eso fue el que se eligió.

Análisis de Residuales en X

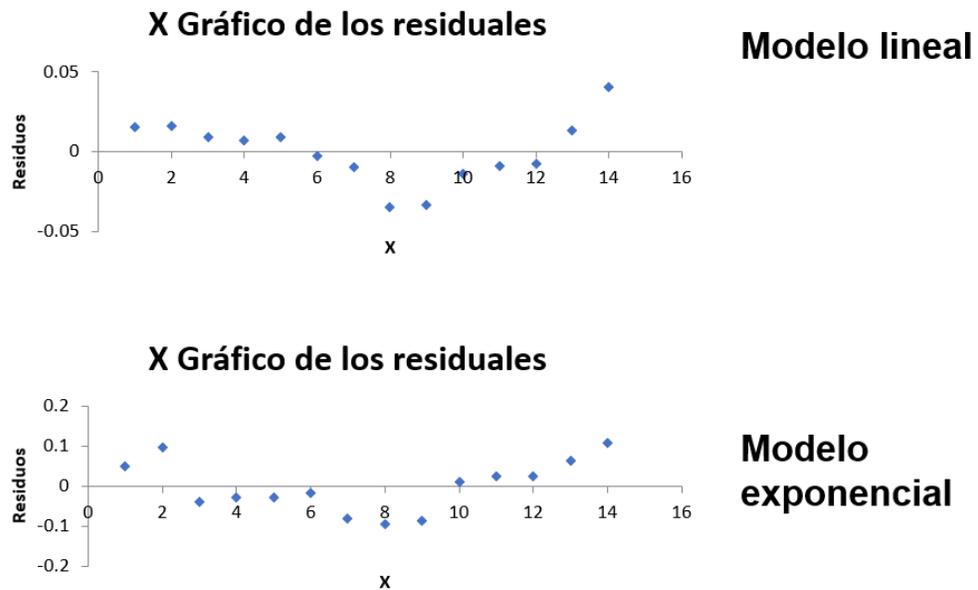


Figura 28 Comparación de los análisis de residuales con los dos modelos matemáticos de ajuste

Los resultados que se obtuvieron para la linealidad son los siguientes:

- ❖ La variación de la concentración en el límite bajo de cuantificación obtenido a partir de las curvas de calibración es menor al 20% del valor nominal.
- ❖ Los valores de las concentraciones de los controles medio y alto obtenidos de las curvas de calibración tienen una variación de menos del 15% del valor nominal.
- ❖ Los coeficientes de determinación obtenidos en las 5 curvas de calibración son los siguientes: **0.9932, 0.9977, 0.9975, 0.9959 y 0.9912**, respectivamente, siendo estos valores superiores a los exigidos por las normas nacionales e internacionales.
- ❖ El modelo que se ajusta a los datos de mejor manera es el exponencial, ya que se obtiene un mejor coeficiente de correlación y recobros con este que con el ajuste lineal.

Repetibilidad

Se realizó el promedio de las 5 curvas realizadas para la prueba de linealidad, por cada nivel, obteniendo los siguientes resultados reportados en la tabla 8:

Tabla 8 Resultados de prueba Repetibilidad

Concentración (ng/ml)	Coefficiente de Varianza (%)
Promedio nivel 1	12
Promedio nivel 2	3
Promedio nivel 3	10
Promedio nivel 4	4
Promedio nivel 5	4
Promedio nivel 6	3

Los resultados que se obtuvieron para la repetibilidad son los siguientes:

- ❖ El coeficiente de varianza debe ser menor o igual a 20% en el primer punto de la curva (límite bajo de cuantificación), nuestro método obtuvo un 12%.
- ❖ El coeficiente de varianza para los niveles 2,3,4,5 y 6 es menor de 15% obteniendo en todos los niveles de la curva coeficientes de varianza menores al establecido.

3.5 Precisión y Exactitud del método

Para determinar estos parámetros se deben realizar estudios intradía e interdía; para determinar la precisión se utilizaron los estudios intradía e interdía, y para determinar la exactitud se utilizó el estudio intradía.

Reproducibilidad (prueba interdía)

La prueba de reproducibilidad se hizo en 3 días diferentes, con 4 concentraciones, como lo muestra la tabla 9.

Tabla 9 Diseño de la prueba de Reproducibilidad

Día 1			Día 2			Día 3		
A1	B1	C1	A1	B1	C1	A1	B1	C1
A3	B3	C3	A3	B3	C3	A3	B3	C3
A4	B4	C4	A4	B4	C4	A4	B4	C4
A5	B5	C5	A5	B5	C5	A5	B5	C5

Se calculó el C.V respecto a los recobros obtenidos en los niveles

Día 1 (10 de Enero 2019)

Se utilizaron los datos obtenidos en la prueba de linealidad como día 1 de la prueba de Reproducibilidad.

Se presentan los recobros obtenidos en cada nivel de la curva en la tabla 10.

Tabla 10 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 1

Día 1 (10 de Enero)					
Curva A		Curva B		Curva C	
Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)
A1.001	88	B1.001	106	C1.001	113
A1.002		B1.002		C1.002	
A3.001	86	B3.001	105	C3.001	98
A3.002		B3.002		C3.002	
A4.001	89	B4.001	98	C4.001	90
A4.002		A4.002		C4.002	
A5.001	98	B5.001	106	C5.001	101
A5.002		B5.002		C5.002	

Día 2 (15 de Enero 2019)

Se presentan los recobros obtenidos en cada nivel de la curva en la tabla 11.

Tabla 11 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 2

Día 2 (15 de Enero)					
Curva A		Curva B		Curva C	
Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)
A1.001	112	B1.001	85	C1.001	102
A1.002		B1.002		C1.002	
A3.001	94	B3.001	86	C3.001	88
A3.002		B3.002		C3.002	
A4.001	89	B4.001	90	C4.001	89
A4.002		A4.002		C4.002	
A5.001	102	B5.001	106	C5.001	99
A5.002		B5.002		C5.002	

Día 3 (28 de Enero 2019)

Se presentan los recobros obtenidos en cada nivel de la curva en la tabla 12.

Tabla 12 Resultados de la prueba de Reproducibilidad día 3

Día 3 (28 de Enero)					
Curva A		Curva B		Curva C	
Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)	Muestra	Recobro (%)
A1.001	113	B1.001	115	C1.001	106
A1.002		B1.002		C1.002	
A3.001	97	B3.001	100	C3.001	97
A3.002		B3.002		C3.002	
A4.001	86	B4.001	95	C4.001	95
A4.002		A4.002		C4.002	
A5.001	112	B5.001	106	C5.001	107
A5.002		B5.002		C5.002	

Al tener los datos de la prueba, se calculó el coeficiente de varianza del promedio de los 3 días por cada nivel, mostrando los resultados en la tabla 13.

Tabla 13 Coeficientes de Varianza de la prueba de Reproducibilidad

Recobros (%)	Coeficiente de varianza (%)
Promedio nivel 1	11
Promedio nivel 3	7
Promedio nivel 4	4
Promedio nivel 5	4

Resultados de la exactitud

En la tabla 14 se muestran los resultados de la exactitud que es una prueba interdía, se calculó el porcentaje del sesgo del promedio de los 3 días en cada nivel de concentración.

Tabla 14 Resultados de la prueba de Exactitud

Dia 1		Dia 2		Dia 3		% de Sesgo
Promedio nivel 1	Concentración real	Promedio nivel 1	Concentración real	Promedio nivel 1	Concentración real	
51	50	53	54	59	53	5
Promedio nivel 3		Promedio nivel 3		Promedio nivel 3 (Dia 3)		5
345	357	342	382	372	379	
Promedio nivel 4		Promedio nivel 4		nivel 4 (Dia 3)		9
693	750	715	803	733	795	
Promedio nivel 5		Promedio nivel 5		nivel 5 (Dia 3)		4
1018	1000	1095	1070	1151	1060	

Se hizo un análisis de varianza de un factor que se observa en la figura 29, con el cual se puede ver que no existe diferencia significativa en nuestros datos, esto conduce a concluir que el método es reproducible.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	4	361.623333	90.4058333	30.0063583
Columna 2	4	415.703333	103.925833	15.0115583
Columna 3	4	402.066667	100.516667	89.1033333
Columna 4	4	397.087227	99.2718069	105.10531
Columna 5	4	367.174455	91.7936137	91.3119268
Columna 6	4	377.040498	94.2601246	52.1270659
Columna 7	4	407.544025	101.886006	165.995414
Columna 8	4	416.603774	104.150943	70.5351845
Columna 9	4	405.106918	101.27673	35.7820498

$\alpha = 0.05$

ANÁLISIS DE VARIANZA

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8	106.785028	13.3481285	1.46732402	0.215236518	2.305313177
Dentro de los grupos	27	72.7753557	2.69538354			
Total	35	2819.21483	80.5489823			

Figura 29 Análisis de varianza de una sola vía

El resumen de los resultados de las pruebas de precisión y exactitud se muestran en la tabla 15.

Tabla 15 Resultados de la prueba de Precisión y Exactitud

Concentración Conocida (ng/mL)	Concentración Encontrada (ng/mL)	Exactitud (%)	Precisión (% CV)
Intradía			
50	53±6.31	107	12
107	107 ± 2.74	103	3
357	352 ± 36.91	102	10
750	702 ± 29.89	95	4
1000	1032 ± 40.76	102	4
1500	1643 ± 53.84	110	3
Interdía			
50	55 ± 7.16	101	12
357	353 ± 37.46	93	8
750	714 ± 34.66	91	4
1000	1084 ± 67.95	102	3

Resultados obtenidos al realizar el análisis de los datos:

- ❖ El valor del coeficiente de variación obtenido para los niveles 3, 4 y 5 (bajo, medio y alto) no excedió del 15% del coeficiente de variación, lo que cumple con el criterio marcado por la regulación.
- ❖ Para la concentración del nivel 1 (límite bajo de cuantificación) el valor del coeficiente de variación fue menos del 20%.
- ❖ Para la prueba de exactitud, el límite bajo de cuantificación de los 3 días se observa que el porcentaje de sesgo es menor al 20%, por lo que es adecuado.
- ❖ Igualmente, para los niveles bajo, medio y alto (3,4 y 5); se obtuvieron valores de sesgo dentro del 15% permitido por la normativa.
- ❖ El análisis de varianza de una sola vía indica que no existe diferencia significativa en nuestros datos.

3.6 Recobro absoluto

Curva de calibración en solución

En la figura 30, se observa que todos los recobros de la curva de calibración preparada en metanol cumplen los criterios establecidos.

Curva Solución		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
S1.001	58	100
S1.002	58	
S2.001	109	89
S2.002	85	
S3.001	360	98
S3.002	355	
S4.001	803	105
S4.002	809	
S5.001	1042	100
S5.002	1001	
S6.001	1500	98
S6.002	1491	

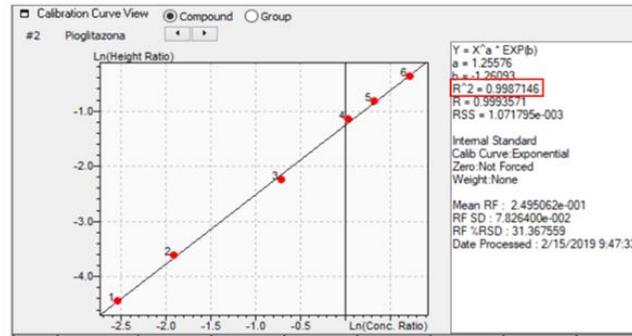


Figura 30 Curva de calibración en solución, se observa en la parte izquierda tanto las concentraciones obtenidas como el porcentaje de recobros, del lado derecho se observa la linealidad de esta curva en solución con una R^2 de 0.99

Curva de calibración en plasma

En la figura 31, se observa que todos los recobros de la curva de calibración en plasma, cumplen los criterios establecidos.

Curva Plasma		
Muestra	Concentración (ng/ml)	Recobro (%)
A1.001	58	94
A1.002	51	
A2.001	109	97
A2.002	103	
A3.001	363	103
A3.002	385	
A4.001	857	108
A4.002	793	
A5.001	1096	110
A5.002	1151	
A6.001	1496	97
A6.002	1457	

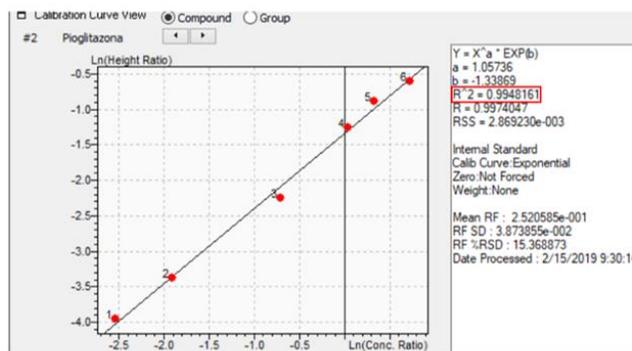


Figura 31 Curva de calibración en plasma, en la parte izquierda se observa tanto las concentraciones obtenidas como el porcentaje de recobros, del lado derecho se observa la linealidad de esta curva en plasma con una R^2 de 0.99

$$\% \text{ Recobro absoluto} = (\text{Recobro Plasma} / \text{Recobro solución}) \times 100$$

Los resultados de los recobros se muestran en la tabla 16.

Tabla 16 Resultados de la prueba de Recobro Absoluto

Nivel de la curva	Recobro promedio (Plasma/Solución)
1	94
2	109
3	105
4	102
5	110
6	99

Al obtener porcentajes de recobro absoluto dentro de las especificaciones establecidas en el protocolo, se puede concluir que el tratamiento de la muestra no afecta las concentraciones de pioglitazona y rosiglitazona.

3.7 Robustez

Para esta prueba se realizaron pruebas interanalista, para probar que el método sirve bajo diferentes situaciones como diferentes días y analistas. En la tabla 17 se muestra el diseño de la prueba.

Tabla 17 Diseño de la prueba de Robustez

	Día 1			Día 2		
Químico 1	A1	B1	C1	A1	B1	C1
	A3	B3	C3	A3	B3	C3
	A4	B4	C4	A4	B4	C4
	A5	B5	C5	A5	B5	C5
Químico 2	A1	B1	C1	A1	B1	C1
	A3	B3	C3	A3	B3	C3
	A4	B4	C4	A4	B4	C4
	A5	B5	C5	A5	B5	C5

En la tabla 18 se muestran los porcentajes de recobro obtenidos tanto por el químico 1 como por el químico 2 en los dos días de análisis.

Tabla 18 Resultados de la prueba de Robustez

	Día 1						Día 2					
	Curva A		Curva B		Curva C		Curva A		Curva B		Curva C	
	Muestra	Recobro (%)										
Químico 1	A1.001	88	B1.001	106	C1.001	113	A1.001	112	B1.001	85	C1.001	102
	A1.002		B1.002		C1.002		A1.002		B1.002		C1.002	
	A3.001	86	B3.001	105	C3.001	98	A3.001	94	B3.001	86	C3.001	88
	A3.002		B3.002		C3.002		A3.002		B3.002		C3.002	
	A4.001	89	B4.001	98	C4.001	90	A4.001	89	B4.001	90	C4.001	89
	A4.002		B4.002		C4.002		A4.002		B4.002		C4.002	
	A5.001	98	B5.001	106	C5.001	101	A5.001	102	B5.001	106	C5.001	99
	A5.002		B5.002		C5.002		A5.002		B5.002		C5.002	
Químico 2	A1.001	92	B1.001	108	C1.001	99	A1.001	111	B1.001	118	C1.001	116
	A1.002		B1.002		C1.002		A1.002		B1.002		C1.002	
	A3.001	88	B3.001	93	C3.001	90	A3.001	87	B3.001	89	C3.001	90
	A3.002		B3.002		C3.002		A3.002		B3.002		C3.002	
	A4.001	100	B4.001	107	C4.001	107	A4.001	105	B4.001	92	C4.001	102
	A4.002		B4.002		C4.002		A4.002		B4.002		C4.002	
	A5.001	104	B5.001	104	C5.001	100	A5.001	111	B5.001	104	C5.001	101
	A5.002		B5.002		C5.002		A5.002		B5.002		C5.002	

En la tabla 19 se muestran los promedios de las concentraciones encontradas en cada nivel, al igual que la precisión y la exactitud de esta prueba en particular.

Tabla 19 Datos de Exactitud y Precisión de la prueba de Robustez

Concentración Conocida (ng/mL)	Concentración Encontrada (ng/mL)	Exactitud (%)	Precisión (% CV)
Quimico 1			
50	55 ± 7.16	101	12
357	353 ± 37.46	93	8
750	714 ± 34.66	91	4
1000	1084 ± 67.95	102	3
Quimico 2			
53	59 ± 9.90	107	17
357	351 ± 27.16	91	8
795	783 ± 69.76	100	9
1060	1106 ± 79.00	106	7

Para la robustez, se hizo un análisis de varianza de dos factores que se muestra en la figura 32, esperando que no existiera diferencia significativa entre los datos obtenidos por los dos químicos (Alejandra Sánchez Solares y Tania Alexandra Smith Márquez), siendo ese el resultado obtenido.

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo

RESUMEN	DIA 1		DIA 2			Total	
<i>Q1</i>							
Cuenta	4	4	4	4	4	4	24
Suma	361	415	402	397	367	378	2320
Promedio	90.25	103.75	100.5	99.25	91.75	94.5	96.6666667
Varianza	28.25	14.9166667	91	100.916667	94.9166667	49.6666667	74.1449275
<i>Q2</i>							
Cuenta	4	4	4	4	4	4	24
Suma	384	412	396	414	403	414	2423
Promedio	96	103	99	103.5	100.75	103.5	100.958333
Varianza	53.3333333	47.3333333	48.6666667	129	174.25	115.666667	82.0416667
<i>Total</i>							
Cuenta	8	8	8	8	8	8	
Suma	745	827	798	811	770	792	
Promedio	93.125	103.375	99.75	101.375	96.25	99	
Varianza	44.4107143	26.8392857	60.5	103.696429	138.5	94	

ANÁLISIS DE VARIANZA

	Suma de los cuadrados de libertad de los cuadrados		F	Probabilidad crítica para F		
Muestra	221.020833	1	221.0208333	2.79797802	0.10305333	4.11316528
Columnas	537.6875	5	107.5375	1.36135385	0.26172608	2.47716867
Interacción	210.854167	5	42.17083333	0.53385495	0.7491861	2.47716867
Dentro del gr	2843.75	36	78.99305556			
Total	3813.3125	47				

Figura 32 Análisis de varianza de dos factores comparando los datos de dos químicos diferentes (Alejandra Sánchez Solares y Tania Alexandra Smith Márquez).

Resultados obtenidos al realizar el análisis de los datos:

- ❖ El valor del coeficiente de variación obtenido para los niveles 3, 4 y 5 (bajo, medio y alto) no excedió el 15% de variación, lo que cumple con el criterio marcado por la regulación.
- ❖ Para la concentración del nivel 1 (límite bajo de cuantificación), el valor del coeficiente de variación fue menos del 20%.
- ❖ El análisis de varianza de dos factores indica que no existe diferencia significativa en nuestros datos al ser realizado el método por personas distintas.

3.8 Estabilidad

Se evaluaron 3 ciclos de congelación-descongelación del plasma, la estabilidad a largo plazo, estabilidad en el automuestreador tanto del plasma como de la solución, la estabilidad de la muestra preparada y la estabilidad de la solución madre.

Los resultados se muestran en la tabla 20

Tabla 20 Resultados de la prueba de Estabilidad

Estabilidad	Concentración (ng/mL)	
	114	1060
Congelación- Descongelación		
Inicial	101	1101
Medida después de 3 ciclos	113 ± 17.87	1139 ± 92.30
Desviación (%)	15.77	8.1
Plasma a largo plazo		
Inicial	126	1209
Medida después de 22 semanas	111 ± 15.89	1184 ± 96.55
Desviación (%)	14.31	8.15
Plasma en el automuestreador		
Inicial	N/A	985
Después de 24 hrs	N/A	937 ± 63.59
Desviación (%)	N/A	6.79
Solución en el automuestreador		
Inicial	N/A	958
Después de 24 hrs	N/A	863 ± 87.92
Desviación (%)	N/A	10.18
Muestra preparada		
Inicial	112	1079
Después de 14 días	117 ± 12.46	1068 ± 97.82
Desviación (%)	11.64	9.15
Solución madre		
Inicial	N/A	1032
Después de 10 semanas	N/A	1002 ± 42.62
Desviación (%)	N/A	4.25

Estos resultados indican que la muestra procesada es estable 14 días y sin procesar 22 semanas. La solución 1 es estable por 10 semanas.

4. Discusión

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método sensible y reproducible de HPLC acoplado a PDA para la detección y cuantificación de pioglitazona que pudiera ser utilizado para el análisis de un gran número de muestras de plasma obtenidas en un estudio farmacocinético.

Existen pocos métodos por HPLC con detector UV para el análisis de pioglitazona [21, 34, 36]. Nuestro método excede los parámetros establecidos en la normatividad, en la que se especifica un límite de cuantificación del 5% del CMax [32]. En el caso que nos ocupa, el límite de cuantificación requerido es de 85 ng/ml, y nuestro método tiene un límite de cuantificación de 50 ng/ml.

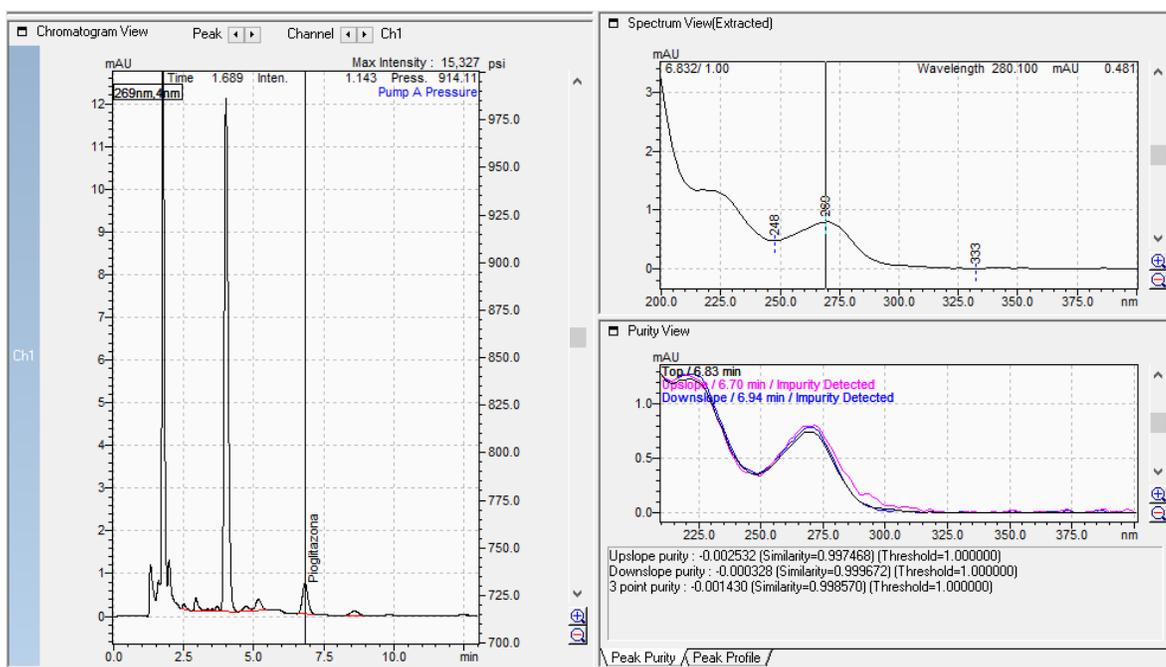


Figura 33 Cromatograma, espectro UV e índice de pureza del límite inferior de cuantificación en plasma (50 ng/ml) obtenido durante la validación del método.

En la figura 33 se observa en el cromatograma que el pico que corresponde al nivel más bajo de la curva de calibración está bien resuelto, es simétrico y fácilmente identificable. El espectro UV que se muestra en la imagen confirma la identidad de nuestro analito y el análisis de pureza corrobora la resolución de este.

En la figura 34 y la tabla 21 se muestra la comparación de los métodos publicados para el análisis de pioglitazona en plasma contra el método desarrollado en este laboratorio.

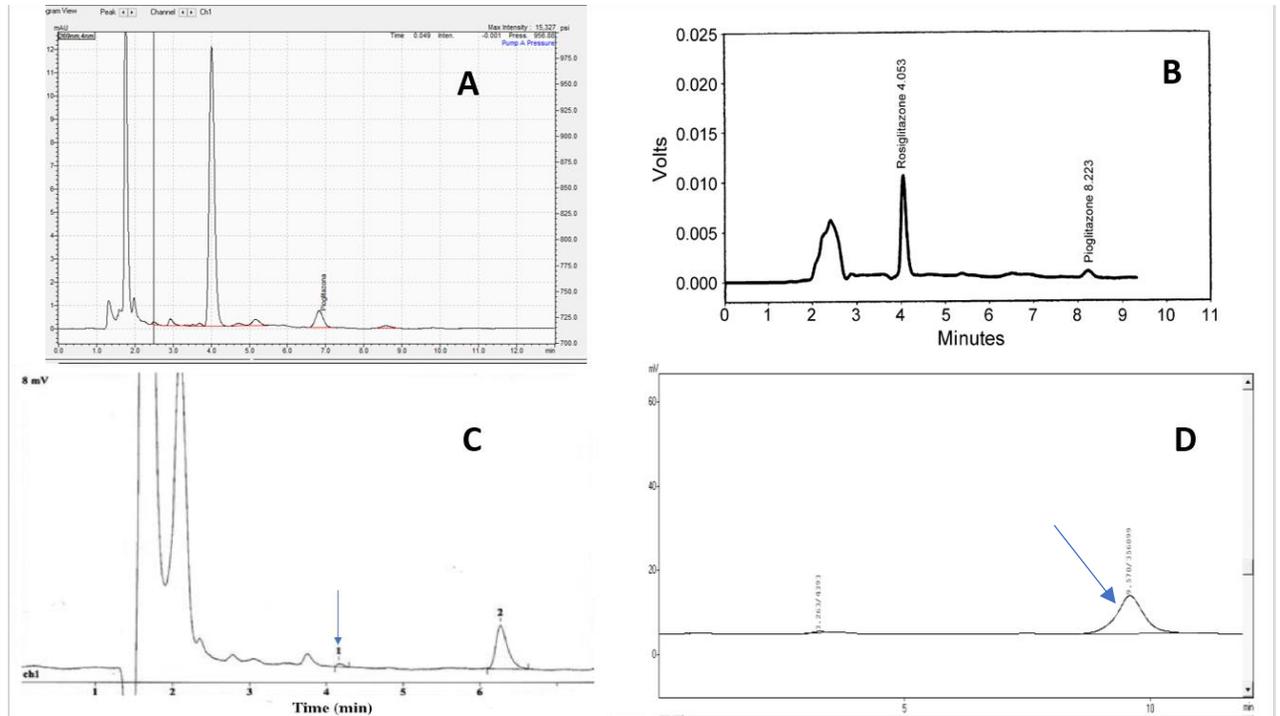


Figura 34 Comparación de los cromatogramas de los métodos reportados para el análisis de pioglitazona en plasma vs el método desarrollado por nosotros. A) Sánchez Solares, B) Sripalakit [34], C) Sourí [36], D) Syed [21].

En el cromatograma A, se observa el límite inferior de cuantificación del método desarrollado en este laboratorio, el cual es de 50 ng/ml, el cromatograma B es el límite inferior de cuantificación del método propuesto por Sripalakit que igualmente es de 50 ng/ml, en el C se observa el método propuesto por Sourí, el cual muestra un cromatograma del límite de detección de 10 ng/ml y por último el cromatograma D muestra una pioglitazona de concentración de 750 ng/ml del método de Syed.

El método propuesto por Sripalakit y el método desarrollado en nuestro laboratorio tienen el mismo límite inferior de cuantificación, sin embargo, de los cromatogramas puede observarse que tanto el tamaño como la forma del pico obtenido por nuestro equipo de trabajo, facilitan tanto la detección y cuantificación de la pioglitazona, como la reproducibilidad del análisis.

La comparación del cromatograma reportado por Souri contra el de nuestro laboratorio es más complicada, porque Souri publica su límite de detección en lugar del límite de cuantificación, que es lo más común, sin embargo, la señal en el cromatograma de Souri es apenas perceptible contra la señal que mostramos nosotros que, como hemos dicho antes, está muy bien definida.

Finalmente, el cromatograma de Syed demuestra la baja resolución y sensibilidad de su método, ya que es una concentración de 750 ng/ml, siendo 15 veces mayor a la concentración del cromatograma del método desarrollado en este laboratorio.

Al comparar la bibliografía analizada de los métodos publicados para la determinación de pioglitazona en plasma, con el método desarrollado en este laboratorio, se encontraron algunas diferencias que se enlistan en la tabla 21.

Tabla 21 Comparación de los métodos publicados para la determinación de pioglitazona en plasma

Parámetro	Syed [21]	Sripalakit [34]	Souri [36]	Sánchez-Solares
Límite inferior de cuantificación	100 ng/ml	50 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml
Volumen de inyección	50 µl	100 µl	50 µl	10 µl
Referencias normativas	FDA	FDA	No especificado	NOM-177-SSA1-2013, FDA, EMA, DGHS, MHLW, ANVISA
Selectividad	Interferencias endógenas	Interferencias endógenas	Interferencias endógenas	Interferencias endógenas y tratamiento concomitante
Estabilidad de la muestra	4 semanas	8 semanas	8 semanas	22 semanas

En la tabla 21 se puede observar que el límite inferior de cuantificación de Syed [21] es 2 veces más alto que el del método desarrollado en este laboratorio. El de Sripalakit [34] y el nuestro tienen el mismo valor, sin embargo, en los cromatogramas de la figura 34 podemos percatarnos que con las condiciones propuestas por este laboratorio se obtiene una mejor señal, que se traduce en

una mayor sensibilidad y reproducibilidad. Finalmente, Sourí [36] reporta un límite inferior de cuantificación de 25 ng/ml, pero no muestra ningún cromatograma que lo respalde, por lo que no se puede hacer una comparación precisa.

En lo que se refiere al volumen de inyección, se obtiene el mismo límite inferior de cuantificación que Sripalakít [34] que inyecta 5 veces más que nosotros. La calidad de nuestros cromatogramas puede explicarse por el bajo volumen de inyección que usamos. A mayor volumen de inyección, menor calidad de pico.

La validación se hizo en base a una exhaustiva revisión bibliográfica [25, 29, 30, 31, 32, 35,37, 38, 39, 40, 41], lo cual vuelve nuestro método más robusto en comparación con los otros métodos publicados que solo se basan en la guía de la FDA. Se incluyeron más parámetros que los indispensables como: Análisis de Residuales, ANOVA (de uno y de dos factores), selectividad incluyendo tratamientos concomitantes y una estabilidad de muestra mayor que ninguna de las reportadas.

El método de HPLC-PDA desarrollado en nuestro laboratorio para el análisis de pioglitazona en plasma, demostró ser lineal, exacto, preciso, reproducible, sensible, selectivo, robusto y estable.

Al realizar la validación se encontraron dos puntos críticos a considerar:

- ❖ Se debe cuidar el pH de la fase móvil, ya que si se sube a más de 2.6, se pierde totalmente la retención de los analitos, en este caso rosiglitazona y pioglitazona.
- ❖ Al momento de hacer la extracción en fase sólida, se debe cuidar el tiempo de vacío entre lavados. Si no se elimina el solvente utilizado para lavar los cartuchos, la muestra puede contaminarse.

5. Conclusiones

Se desarrolló y validó un método de cromatografía de líquidos acoplado a un detector de arreglo de diodos, aprovechando una técnica de extracción en fase sólida, lo que nos permitió aumentar la sensibilidad para la identificación y cuantificación de pioglitazona en plasma humano. El método antes descrito demostró ser exacto, reproducible, robusto y preciso; siendo apto para ser utilizado en estudios farmacocinéticos.

6. Perspectivas

Este método fue desarrollado y validado para la posterior realización de un estudio farmacocinético en voluntarios sanos, para comparar el perfil farmacocinético contra las deficiencias en el metabolismo derivadas de posibles mutaciones en el CYP2C8.

7. Referencias

1. Sawant, R. (2018). Targeting PPAR- γ to design and synthesize antidiabetic thiazolidines. *Experimental And Clinical Sciences Journal*, 17, 598-607. doi: 10.17179/excli2018-1325
2. Hamed, M. (2019). Study of the difficult glycemic control in relation to the presence of diabetes-autoantibodies in a sample of Egyptians with type 1 diabetes. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 152, 53-57. doi: 10.1016/j.diabres.2019.04.026
3. Saltiel, A. (2001). New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, 104(4), 517-529. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00239-2
4. Sohn, J. (2018). Effects of Three Thiazolidinediones on Metabolic Regulation and Cold-Induced Thermogenesis. *Molecules And Cells*, 41(10), 900-908. doi: 10.14348/molcells.2018.0294
5. Gross, B. (2016). PPARs in obesity-induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. *Nature Reviews Endocrinology*, 13(1), 36-49. doi: 10.1038/nrendo.2016.135
6. Figueredo, E. (2016). Inhibitors of dipeptidil peptidase 4 new pharmacologic strategic in the diabetes mellitus type 2. *Revista Cubana De Medicina*, 55(3), 239-256
7. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-015-SSA2-2010, PARA LA PREVENCIÓN, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA DIABETES MELLITUS
8. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016) Informe final de resultados. Instituto Nacional de Salud Pública. Secretaría de Salud. México, Oct 2016
9. García-Chapa, E. (2017). Genetic Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexican Mestizos. *Biomed Research International*, 2017, 1-10. doi: 10.1155/2017/3937893

10. SIGMA Type 2 Diabetes Consortium. (2013). Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*, 506(7486), 97-101. doi: 10.1038/nature12828
11. Rusu, V. (2017). Type 2 Diabetes Variants Disrupt Function of SLC16A11 through Two Distinct Mechanisms. *Cell*, 170(1), 199-212. doi: 10.1016/j.cell.2017.06.011
12. Bakhteyari, A. (2019). Impact of Metformin and Pioglitazone on Serum Level of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Lipid Profiles during Implantation Window in Diabetic Rats. *International Journal of Fertility And Sterility*, 13(2), 148-153. doi: 10.22074/ijfs.2019.5636
13. Pallardo Sánchez, L. (2008). Sulfonilureas en el tratamiento del paciente con diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinología Y Nutrición*, 55, 17-25. doi: 10.1016/s1575-0922(08)76259-4
14. Foretz, M. (2014). Metformin: From Mechanisms of Action to Therapies. *Cell Metabolism*, 20(6), 953-966. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.018
15. Charbonnel, B. (2010). Pharmacological management of type 2 diabetes: the potential of incretin-based therapies. *Diabetes, Obesity And Metabolism*, 13(2), 99-117. doi: 10.1111/j.1463-1326.2010.01317.x
16. Calvo Romero, J. (2001). Repaglinida, un nuevo antidiabético oral. *Medifam*, 11(6). doi: 10.4321/s1131-57682001000600002
17. Standl, E. (2012). Alpha-glucosidase inhibitors 2012 – cardiovascular considerations and trial evaluation. *Diabetes And Vascular Disease Research*, 9(3), 163-169. doi: 10.1177/1479164112441524
18. Stumvoll, M. (2002). Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Annals Of Medicine*, 34(3), 217-224. doi: 10.1080/713782132
19. Alcázar-González, G. (2013). Comparative study of polymorphism frequencies of the CYP2D6, CYP3A5, CYP2C8 and IL-10 genes in Mexican and Spanish women with breast cancer. *Pharmacogenomics*, 14(13), 1583-1592. doi: 10.2217/pgs.13.83

20. Jaakkola, T. (2006). Pioglitazone is Metabolised by CYP2C8 and CYP3A4 *in vitro*: Potential for Interactions with CYP2C8 Inhibitors. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology*, 99(1), 44–51. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_437.x
21. Syed, A. (2018). Development and validation of HPLC method for the determination of pioglitazone in human plasma. *Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 31(4), 1489-1494
22. Ahmadian, M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature Medicine*, 19(5), 557-566. doi: 10.1038/nm.3159
23. Gim, H. (2018). Identification of a Novel PPAR- γ Agonist through a Scaffold Tuning Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10), 3032. doi: 10.3390/ijms19103032
24. Yang, S. (2018). Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer: an In Vitro Study. *International Journal of Medical Sciences*, 15(3), 228-237. doi: 10.7150/ijms.22408
25. Ema.europa.eu. (2019). [online] Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/actos-epar-product-information_es.pdf [Accessed 5 Aug. 2019]
26. Debets, H. (1985). Optimization Methods For Hplc. *Journal Of Liquid Chromatography*, 8(15), 2725-2780. doi: 10.1080/01483918508076603
27. García de Marina Bayo, A. (2016). HPLC instrumental (109-117). Valencia: Editorial Universitat Politècnica de València.
28. Ahuja, S. (1987). High Resolution Liquid Chromatography. *Journal Of Liquid Chromatography*, 10(8-9), 1841-1845. doi: 10.1080/01483918708066801
29. González, O. (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A*, 1353, 10-27. doi: 10.1016/j.chroma.2014.03.077

30. Rambla-Alegre, M. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101-109. doi: 10.1016/j.chroma.2011.10.050
31. Rozet, E. (2011). Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 55(4), 848-858. doi: 10.1016/j.jpba.2010.12.018
32. 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
33. Padmanabhan, S. (2017). *Handbook of pharmacogenomics and stratified medicine*. ELSEVIER ACADEMIC Press
34. Sripalakit, P. (2006). High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 843(2), 164-169. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.05.032
35. Causon, R. (1997). Validation of chromatographic methods in biomedical analysis viewpoint and discussion. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences And Applications*, 689(1), 175-180. doi: 10.1016/s0378-4347(96)00297-6
36. Souri, E. (2008). Development and Validation of a Simple and Rapid HPLC Method for Determination of Pioglitazone in Human Plasma and its Application to a Pharmacokinetic Study. *Journal of Chromatographic Science*, 46(9), 809-812. doi: 10.1093/chromsci/46.9.809
37. *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*, FDA, Estados Unidos de América, 2018

38. Bioequivalencia y Biodisponibilidad, Anvisa, Brasil, 2016
39. Bioanalytical Method Validation. ICH M10 Guideline 2019
40. Japanese Guidance on Bioavailability and Bioequivalence, MHLW, Japón, 2000
41. Guidelines for Bioavailability & Bioequivalence Studies. Central Drug Standard Control Organization, Directorate General of Health Services, Ministry of Health & Family Welfare, Gobierno de la India, Nueva Delhi, Marzo 2005
42. Pioglitazone - DrugBank. (2019). Retrieved 15 October 2019, from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01132>
43. Martínez, C. (2006). Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria*, 30(4), 240-248. doi: 10.1016/s1130-6343(06)73982-4
44. Zhou, S. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews*, 41(2), 89-295. doi: 10.1080/03602530902843483
45. Fava, C. (2018). Eicosanoids via CYP450 and cardiovascular disease: Hints from genetic and nutrition studies. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 139, 41-47. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2018.10.001