



---

---

## **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos”**

**TESIS**

Para obtener el título de  
Maestría en Ciencias Farmacobiológicas

**PRESENTA**

**QFB. HERRERA PÉREZ IVETTE GUADALUPE**

San Luis Potosí, S.L.P., México.  
29 de agosto de 2022.

El programa de **Maestría Ciencias Farmacobiológicas** de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de calidad (SNP) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), registro 000588, en el Nivel “En desarrollo”.

**Proyecto realizado en:**

Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

**Con financiamiento de:**

Beca-Tesis del CONACyT: 781907 (CVU 1079380).



Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos por Herrera Pérez Ivette Guadalupe se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.

La versión completa del presente trabajo fue sometida al análisis de similitud en la plataforma “turnitin” (<https://www.turnitin.com/es>). El informe de originalidad reporta un 12% de similitud.

Estandarización y Validación de una técnica de micromuestreo para...

---

INFORME DE ORIGINALIDAD

---

12%

ÍNDICE DE SIMILITUD

## **Integrantes del jurado.**

---

**Presidente:** Dra. Silvia Romano Moreno.  
Facultad de Ciencias Químicas.

---

**Secretaría:** Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia.  
Facultad de Ciencias Químicas.

---

**Vocal:** Dra. Susanna Edith Medellín Garibay.  
Facultad de Ciencias Químicas.

## **Comité tutorial:**

### **Directora de tesis.**

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay.

Adscripción: Facultad de Ciencias Químicas.

### **Co-directora:**

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia.

Adscripción: Facultad de Ciencias Químicas.

### **Asesora interna del PCFB:**

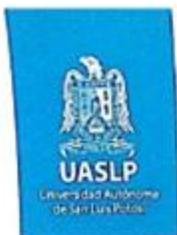
Dra. Silvia Romano Moreno.

Adscripción: Facultad de Ciencias Químicas.

### **Asesor clínico:**

Dr. Arturo Ortiz Álvarez.

Adscripción: Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto.



POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS  
Tel: 826-23-00 ext. 6541 y 6540

San Luis Potosí, S.L.P., a 22 de agosto de 2022

RESERVA

**Comité Académico del Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas  
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP  
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría QFB. **Ivette Guadalupe Herrera Pérez** titulada "Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos", ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el día **29 de agosto del 2022** a las **17:00 hrs.** en el **Auditorio Chico (G203)**, de la Facultad.

**ATENTAMENTE**

Dra. Susanna Edith Medellín Garibay  
Directora de Tesis

Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia  
Co-Directora de Tesis

Dra. Silvia Romano Moreno  
Asesora interna del PCFB



ANIVERSARIO DE LA  
**AUTONOMÍA**  
**UASLP 2023**

[www.uaslp.mx](http://www.uaslp.mx)

Av. Dr. Manuel Novo Núm. 6  
Zona Universitaria • CP 26210  
San Luis Potosí, SLP  
tel. (444) 826 24 40 al 46  
fax (444) 826 2172

## **Dedicatoria.**

*A mis padres, que gracias a todo el amor y apoyo que me han dado sé que puedo llegar tan lejos como yo me lo proponga, a mi hermano por su apoyo incondicional y al amor de mi vida, por ser mi lugar seguro y mi rayito de sol en un día lluvioso.*

## Agradecimientos.

*Estoy agradecida por noches que se hicieron mañanas, amigos que se volvieron familia, por sueños que se hicieron realidad y por mi familia, un apoyo incondicional.*

Quiero agradecer a la **Dra. Susy** por su infinita paciencia y por siempre estar disponible ante cualquier duda que se me presentara. A la **Dra. Rosy** y **Dra. Silvia** por su dedicación y orientación durante el desarrollo del proyecto. A la maestra **Cris** por todo el apoyo y asesoría.

A **coco**, porque me tuvo la paciencia necesaria para enseñarme gran parte de lo que ahora se. Estoy muy agradecida porque su ayuda fue una gran motivación.

A **Frida**, por todos esos momentos divertidos que pasamos en el laboratorio, acompañado de grandes risas y por siempre estar en la disposición de aclararme cualquier duda.

Estoy inmensamente agradecida con mi **madre**, por su apoyo incondicional en todas las decisiones que tomo, sin duda alguna tuve la mejor de las suertes en ser su hija, a mi **padre** por todo el apoyo y por ser mi ejemplo a seguir, ellos son mi soporte, los amo demasiado y un gracias nunca será suficiente por todo lo que me han dado ni por la paciencia infinita que me han tenido.

A mi **novio**, por todo el apoyo que siempre me ha brindado, por acompañarme en el laboratorio ya sea en las mañanas de un sábado, en las tardes de días calurosos y en las noches de desvelo. Sin duda alguna tuvimos mucha suerte.

A mi **hermano**, por siempre estar a mi lado en todos mis planes, apoyándome incondicionalmente y consintiéndome como la pequeña hermana que soy. A **Benny**, mi cuñada, gracias por tu apoyo.

A mis primas, **Nena** y **Lupita**, que siempre me han dicho que llegue tan lejos como yo lo desee, además de toda la ayuda que me han brindado. A **Manuel**, mi primo, que sigue pareciendo un adolescente con todas las ocurrencias que tiene y eso asegura pasar un agradable momento. A **Miguel**, por confiar en que tengo la

capacidad de salir adelante por mis propios medios. Mi **tía Adela** y mi **tío Cirilo**, por todas sus palabras de motivación, por siempre estar al pendiente y por contribuir a la persona que hoy en día soy.

A mi **abuelita Maca**, por ser mi segunda madre, demostrándome su cariño y preocupación a lo largo de mi vida. A mis **abuelitos Amado y Juanita**, por esos hermosos momentos que hemos compartido como familia.

A **Vane, Paco, Omar y Rodrigo** por todos esos momentos que vivimos desde que iniciamos la maestría, sin duda alguna con su amistad todo este camino fue mas fácil.

A **Diana, Fer y Karen**, por brindarme su amistad sincera, porque no importa que casi no nos veamos, sabes que siempre estaremos ahí cuando lo necesitemos.

A mi amigo **Bernardo**, por esos años de amistad que se han ido acumulando, sin duda alguna han estado llenos de anécdotas, por escucharme y apoyarme siempre que lo he necesitado.

A mi amigo **Osmar**, que siempre ha celebrado mis logros, no se le escapa ninguno, demostrándome que siempre hay tiempo para las personas que nos importan, porque un mensaje enviado por mí siempre es contestado por una llamada por parte de él.

A **Nancy y Dulce**, por su carisma, porque me han hecho salir de mi zona de confort, porque su aparición añadió tantito más brillo en mi vida.

A todo el grupo de amigos que se ha ido formando últimamente integrado por **Oscar, Richi, Gus, Bate, Jos, Dulce, Nancy, Bernardo y Osmar**, indudablemente estoy muy feliz de que nuestra convivencia se haya incrementado en los últimos años, viviendo nuevas experiencias y como dice “papi berni” porque somos familia.

**Porque sin duda alguna, ellos son parte importante en vida y así como yo celebro sus logros, ellos celebran los míos, estoy tan agradecida de tenerlos en mi vida.**

## **Resumen en español.**

La tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial; para su tratamiento se incluyen fármacos de primera línea como A, B, C y D. El método estándar de muestreo para el control terapéutico es la venopunción y como alternativa de micromuestreo se proponen las gotas de sangre seca. En este estudio se desarrollaron métodos por UPLC-MS/MS para la cuantificación de estos fármacos en muestras plasmáticas y en gotas de sangre seca. Se llevó a cabo la validación de los métodos analíticos en ambas matrices y se aplicaron en la cuantificación de los fármacos en pacientes con diagnóstico de tuberculosis. Se determinó la concordancia y correlación entre las concentraciones de ambas muestras ( $P < 0.05$ ) para los cuatro fármacos, lo que indica que es conveniente utilizar la metodología de micromuestreo desarrollada para cuantificar y monitorizar los fármacos en el tratamiento de la tuberculosis.

**Palabras clave:** Tuberculosis, fármacos antituberculosos, gotas de sangre seca, Monitorización terapéutica de fármacos, espectrometría de masas.

## **Abstract.**

Tuberculosis is a worldwide health problem; First-line drugs such as rifampin, ethambutol, isoniazid, and pyrazinamide are included for its treatment. The standard sampling method for therapeutic control is venipuncture, and dry blood spots are proposed as an alternative to microsampling. In this study, UPLC-MS/MS methods were developed for the quantification of these drugs in plasma samples and dried blood spots. The validation of the analytical methods was carried out in both matrices, and they were applied in the quantification of the drugs in patients diagnosed with tuberculosis. The concordance and correlation between the concentrations of both samples were determined ( $P < 0.05$ ) for the four drugs, which indicates that it is convenient to use the microsampling methodology developed to quantify and monitor the drugs in the treatment of tuberculosis.

**Key words:** Tuberculosis, antituberculosis drugs, dried blood spots, Therapeutic drug monitoring, mass spectrometry.

## Índice general.

1.0 Introducción.....	1
2.0 Antecedentes.....	4
2.1 Fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.....	4
2.1.1 C. ....	4
2.1.2 A. ....	6
2.1.3 D. ....	7
2.1.4 B. ....	7
2.2 Monitorización terapéutica de fármacos de primera línea. ....	8
2.3 Métodos de cuantificación para fármacos antituberculosos de primera línea. .....	9
2.4 Estimación bayesiana.....	9
2.5 Muestreo convencional y en DBS. ....	10
3.0 Justificación .....	11
4.0 Hipótesis.....	13
5.0 Objetivos.....	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos particulares.....	13
6.0 Material y métodos.....	14
6.1.1 Equipos y reactivos. ....	14
6.1 Condiciones de espectrometría de masas. ....	15
6.2 Estandarización de las condiciones cromatográficas.....	15
6.2.1 Preparación de las soluciones patrón.....	15
6.2.2 Método cromatográfico para plasma. ....	15

<b>6.2.3 Pruebas para la extracción de los analitos en plasma.</b> .....	15
<b>6.2.4 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.</b> .....	16
<b>6.2.5 Método cromatográfico inicial para DBS.</b> .....	16
<b>6.2.6 Estandarización del hematocrito.</b> .....	16
<b>6.2.7 Estandarización del método de extracción en DBS.</b> .....	16
<b>6.2.8 Preparación de curva de calibración y controles de calidad en DBS.</b> .....	17
<b>6.3 Validación del método analítico en plasma y DBS.</b> .....	17
<b>6.3.1 Selectividad.</b> .....	17
<b>6.3.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.</b> .....	17
<b>6.3.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.</b> .....	18
<b>6.3.4 Límite de detección.</b> .....	18
<b>6.3.5 Linealidad.</b> .....	18
<b>6.3.6 Precisión y exactitud.</b> .....	19
<b>6.3.7 Estabilidad de la muestra.</b> .....	20
<b>6.3.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.</b> .....	20
<b>6.4 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.</b> .....	21
<b>6.4.1 Diseño del estudio.</b> .....	21
<b>6.4.2 Tipo de muestreo.</b> .....	21
<b>6.4.3 Universo de estudio.</b> .....	21
<b>6.5 Administración de medicamentos y toma de muestras.</b> .....	22
<b>6.7 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.</b> .....	22
<b>6.6 Genotipificación.</b> .....	23
<b>6.6.1 Extracción de ADN.</b> .....	23

<b>6.6.2 PCR en tiempo real.</b> .....	23
<b>6.8 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.</b> .....	23
<b>6.9 Análisis estadístico.</b> .....	24
<b>7.0 Resultados.</b> .....	25
<b>7.1 Validación de los métodos analíticos.</b> .....	25
<b>7.1.1 Selectividad.</b> .....	25
<b>7.1.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.</b> .....	25
<b>7.1.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.</b> .....	25
<b>7.1.4 Límite de detección.</b> .....	25
<b>7.1.5 Linealidad.</b> .....	25
<b>7.1.6 Precisión y exactitud.</b> .....	25
<b>7.1.7 Estabilidad de las muestras en plasma y DBS.</b> .....	26
<b>7.1.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.</b> .....	26
<b>7.2 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.</b> .....	27
<b>7.3 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.</b> .....	27
<b>7.4 Correlación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.</b> .....	27
<b>8.0 Discusión.</b> .....	28
<b>9.0 Conclusión.</b> .....	32
<b>10 Referencias.</b> .....	33
<b>Glosario.</b> .....	42

## 1.0 Introducción.

La tuberculosis (TB) es un importante problema de salud a nivel mundial y se caracteriza por ser una enfermedad causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. A pesar del progreso que ha existido en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, aún existe un elevado índice de mortalidad asociado a ésta (1). A nivel mundial, en el año 2020, 9.9 millones de personas desarrollaron TB y 1.3 millones murieron por esta causa; sin embargo, a partir de este mismo año se observó una disminución en la detección y notificación de los casos por TB, a causa de la pandemia por COVID-19 (2). Para el año 2022 a nivel nacional se han reportado 14671 casos nuevos de TB. Particularmente, en el estado de San Luis Potosí, se registraron 221 casos nuevos de TB pulmonar y 112 casos de TB extrapulmonar (3).

El espectro de la TB incluye una infección latente (estados asintomáticos y no infecciosos, anomalía radiológica o falta de evidencia microbiológica), enfermedad subclínica temprana (en la cual los síntomas no son prominentes, pero la transmisión puede ocurrir) y la enfermedad activa (la cual es sintomática e infecciosa) (4). La exposición a TB es impulsada por lugares congregados, el estado de salud y lugares caracterizados por la pobreza (5).

Existen factores que aumentan el riesgo de desarrollar TB activa, entre los cuales se incluyen: el estado inmunocomprometido del paciente, como VIH, desnutrición, diabetes, tabaquismo, uso excesivo del alcohol, enfermedad renal terminal, entre otros. La TB activa puede causar la muerte en aproximadamente un 50% en individuos no tratados, por ello la importancia del diagnóstico temprano y el inicio del tratamiento más adecuado (5).

En función de la etapa del diagnóstico, se distinguen distintas formas de terapia contra TB: el tratamiento primario, retratamiento con fármacos de primera línea, retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para TB multirresistente

(TB – MFR) y retratamiento individualizado con fármacos de segunda línea para TB – MFR (6).

El tratamiento primario acortado estrictamente supervisado (TAES), es la terapia estándar para la TB, cuya duración es de por lo menos 6 meses y se divide en dos fases: una intensiva seguida de la fase en sostén durante cuatro meses (6). El régimen de tratamiento para la TB susceptible es altamente efectivo, pero el uso de diversos medicamentos durante largos periodos de tiempo puede llegar a causar frecuentes reacciones adversas, las cuales pueden dar lugar a una interrupción o suspensión del tratamiento y como consiguiente el riesgo de fracaso del tratamiento o una resistencia bacteriana (7).

La metodología de monitorización terapéutica de fármacos (Therapeutic Drug Monitoring, por sus siglas en inglés TDM) tiene como objetivo medir las concentraciones plasmáticas (Cp) de los fármacos, realizar el ajuste de dosis para optimizar la exposición al fármaco y mejorar la respuesta al tratamiento. En el caso de los pacientes con TB, se deben de tomar dos muestras (a las 2 y 4 horas) después de haber sido administrada la dosis, posteriormente se lleva a cabo la cuantificación de los fármacos, principalmente de A y C, la interpretación de dichas concentraciones y el respectivo ajuste de dosis en caso de ser necesario (8). Esta metodología podría reducir la incidencia de reacciones adversas a los medicamentos y aumentar la probabilidad de los resultados exitosos del tratamiento (7). Las indicaciones para llevar a cabo TDM en pacientes con TB se priorizan en pacientes que presentan reacciones adversas a medicamentos, factores de riesgo como infecciones en VIH, concomitancia con diabetes mellitus tipo 2, problemas gastrointestinales y otros estados de malabsorción. En estos casos, en los que existe una exposición inadecuada a los medicamentos antituberculosos y una posible respuesta subóptima al tratamiento, aumenta el riesgo de fracaso al tratamiento y de toxicidad. Por lo tanto, la TDM llega a ser útil para acortar el tiempo necesario para lograr la respuesta y finalización del tratamiento, proporcionando a los pacientes dosis seguras y adecuadas de los fármacos (7).

La estrategia de muestreo utilizada de manera convencional para poder llevar a cabo TDM es venopunción, dicha estrategia es considerada menos invasiva, los pacientes ambulatorios están obligados a frecuentar una clínica o consultorio para las extracciones de sangre y además, requieren de una cadena de frío durante su transportación; por ello, se plantea la necesidad de implementar alternativas de muestreo, tales como las gotas de sangre seca (dried blood spot, DBS por sus siglas en inglés) que recientemente han demostrado su utilidad y aplicación en TDM. Cabe destacar que los muestreos mínimamente invasivos pueden facilitar su empleo desde casa, simplificar la TDM en poblaciones específicas y promover programas en entornos remotos y países en desarrollo. Además, estas estrategias de muestreo facilitan los estudios de farmacocinética en poblaciones especiales, creando una mejor comprensión de la farmacocinética, lo cual permite optimizar aún más los regímenes de dosificación, por lo tanto, se incluyen las siguientes ventajas en comparación con el muestreo convencional(9):

- Es relativamente sencillo, ya que solo requiere volúmenes de muestra pequeños (5 – 35  $\mu\text{L}$ ).
- Facilita el automuestreo por parte del paciente desde su propio hogar con el posterior transporte de las muestras secas al laboratorio (para los pacientes ambulatorios este enfoque podrá reducir la frecuencia de las visitas a la clínica).
- La conveniencia de la TDM en el hogar ofrece la oportunidad de un seguimiento más frecuente del paciente, lo que a su vez puede conducir a una mejor adherencia a la terapia y, por lo tanto, a una reducción de los costos de atención médica.
- Esta alternativa facilita el muestreo en pacientes para estudios farmacocinéticos en poblaciones especiales.

Por otra parte, debido al pequeño volumen de muestra que se puede obtener a través de un DBS, se requerirá de técnicas analíticas de alta sensibilidad, como métodos basados en cromatografía, como la cromatografía líquida de alta resolución

(HPLC) y la cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC – MS/MS) (10). La técnica de UPLC-MS/MS es especialmente útil como método de bioanálisis para la determinación cuantitativa de fármacos antituberculosos de forma simultánea, tanto en muestras de plasma como en muestras de DBS, con la finalidad de evaluar la concordancia en los resultados obtenidos y validar los márgenes terapéuticos ya estandarizados para plasma, pero que aún no han sido establecidos para DBS (7).

## **2.0 Antecedentes.**

La TB es tratada con una combinación de medicamentos antimicrobianos para prevenir la resistencia adquirida y el fracaso al tratamiento; éste consiste en un tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) que se caracteriza por una fase intensiva (con efecto bactericida) con duración de dos meses con los cuatro fármacos A, B, C y D y una fase de sostén (con efecto esterilizante) de cuatro meses con los fármacos A y C (11).

### **2.1 Fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.**

#### **2.1.1 C.**

El fármaco C es un profármaco, que es convertido por la enzima micobacteriana catalasa-peroxidasa (codificada por el gen KatG) con efecto bactericida, el cual se basa en la inhibición de la síntesis del ácido micólico, alterando la pared celular. Las mutaciones en el gen KatG son de los principales mecanismos de resistencia a C (12).

Se administra por vía oral a una dosis estándar de 5 mg/kg de peso corporal total. Tiene una unión a proteínas aproximadamente de 10%, un volumen de distribución (Vd) de 0.5 a 0.76 L/kg y una vida media ( $t_{1/2}$ ) de 0.5 a 2 horas. La concentración máxima (C<sub>max</sub>) esperada es de 3 a 6 µg/mL (intervalo terapéutico) después de una administración por vía oral de 300 mg, la cual se alcanza entre 1 a 2 horas postdosis. Si la C<sub>max</sub> es inferior 3 µg/mL se recomienda un aumento de dosis (13,14). Es metabolizado en el hígado por la N-acetiltransferasa (NAT2) y después se hidroliza,

lo que genera compuestos hepatotóxicos por el citocromo P4502E1; su principal vía de eliminación es la vía renal (15).

Hay diferentes factores que pueden afectar la variabilidad en las concentraciones de C, tales como las formulaciones utilizadas, el Índice de masa corporal (IMC), la desnutrición y la presencia de polimorfismos asociados con la actividad de NAT2 (16).

Existe evidencia de que las diferencias en la biodisponibilidad se pueden deber a las diferencias entre los productos farmacéuticos. La baja exposición se relaciona con un fracaso al tratamiento y TB - MFR (17,18).

El IMC, explica la variabilidad en la distribución del fármaco; los pacientes con mayor proporción de masa magra en relación con su IMC tienen menor exposición a C (18,19).

Las condiciones fisiopatológicas que se generan de un estado de desnutrición afectan la farmacocinética de C; estos cambios incluyen el tiempo de vaciado gástrico, ya que esta condición disminuye las Cp de C, lo que puede aumentar el riesgo de falla terapéutica e incluso el desarrollo de cepas farmacorresistentes (20,21).

Por otro lado, la presencia de polimorfismos asociados a la actividad de NAT2, implican variaciones en las Cp de C, ya que la tasa de acetilación y metabolismo de este fármaco cambia en función de la actividad de la enzima y permite distinguir entre acetiladores lentos, intermedios o rápidos. Los acetiladores lentos de C pueden ser más susceptibles a la hepatotoxicidad debido a las Cp más altas del fármaco y viceversa, acetiladores rápidos pueden presentar concentraciones por debajo del intervalo terapéutico (22).

Existen técnicas moleculares como la PCR (reacción en cadena de la ADN polimerasa) que permiten la identificación de los tres fenotipos, es decir, acetiladores rápidos, intermedios y lentos. Los siguientes polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en sitios diferentes del gen que codifica para la NAT2 tienen un efecto

fenotípico considerable sobre la actividad de N-acetilación: 282 C>T, 341 T>C, 481 C>T, 590 G>A, 803 A>G y 857 G>A (7).

Por lo anterior, es importante considerar el fenotipo acetilador con la finalidad de complementar la TDM de C basada en la medición de las Cp y la determinación del genotipo de NAT2 en cada paciente para facilitar la interpretación de los resultados y optimizar el ajuste de dosis.

### **2.1.2 A.**

El fármaco A es un antimicrobiano con actividad bactericida, el cual bloquea la transcripción inhibiendo la ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano. La resistencia al fármaco A se explica por las mutaciones en el gen *rpoB*, el cual codifica a la subunidad beta del ARN polimerasa (23).

Se administra por vía oral de 8 a 12 mg/kg de peso corporal total. Tiene una unión a proteínas del 75 al 85%, aproximadamente. El Vd es de 1.6 L/kg y la  $t_{1/2}$  de 1.5 a 5 horas. La Cmax esperada es de 8 a 24 µg/mL (intervalo terapéutico) y el tiempo para alcanzarla puede variar de 2 hasta 6 horas después de una administración oral de 600 mg; cuando la Cmax es menor a 8 µg/mL se recomienda administrar una dosis mayor. Es metabolizada por una esterasa hepática y tiene una excreción fecal y renal (24,25).

Dentro de los factores que modifican su farmacocinética se encuentran la biodisponibilidad, las interacciones, principalmente con alimentos, el peso, la autoinducción presentada por A y el tiempo en tratamiento (18).

Al igual que en C, las variaciones en la biodisponibilidad se pueden deber a las diferencias entre los productos farmacéuticos, principalmente por la presencia de C y por el uso de ciertos excipientes que disminuyen su absorción (18).

Por otro lado, la presencia de alimentos antes de la ingesta del medicamento provoca una disminución en la Cmax alcanzada, aumentando el riesgo de generar resistencia bacteriana (26). Si el paciente se encuentra en un estado de desnutrición,

la farmacocinética de A se verá afectada, ya que dentro de los cambios fisiopatológicos, el tiempo de vaciado gástrico se retrasa provocando la disminución de las Cp (20,21).

Para la dosificación optimizada en A se considera el peso corporal total (27); sin embargo, hay estudios en los que, pacientes con pesos extremos, tanto bajos como altos, presentan una menor exposición, por ello, las personas en esta condición necesitan una mayor dosis de mantenimiento (18).

Además, se ha documentado que la exposición crónica a A genera un estado de autoinducción metabólica, dando lugar a la disminución en la exposición de A con el tiempo; dicha autoinducción se ve completada a las dos semanas después de haber iniciado el tratamiento (28).

### **2.1.3 D.**

El fármaco D es un antimicrobiano con actividad bactericida y un profármaco. Su mecanismo de acción no se encuentra bien definido, pero la hipótesis es que acidifica el citoplasma celular de la bacteria (29).

Se recomienda una dosis de 25 mg/kg diariamente por vía oral. Se une aproximadamente un 10% a proteínas; su Vd es de 0.75 a 1.65 L/kg y la  $t_{1/2}$  de 9 a 10 horas. La  $C_{max} > 35 \mu\text{g/mL}$  se alcanza de 1 a 2 horas después de una dosis de 1600 mg; el intervalo terapéutico en plasma es de 20 a 50  $\mu\text{g/mL}$  (30). Sufre metabolismo hepático por la enzima aldehído oxidasa y se excreta por orina (31).

Como parte de los factores que afectan la farmacocinética de D, se encuentra la desnutrición que pueden presentar los pacientes con TB, ya que el tiempo de vaciado gástrico se verá retrasado, provocando la disminución en las Cp (20,21).

### **2.1.4 B.**

El fármaco B es un antimicrobiano con propiedades bactericidas, el cual actúa inhibiendo la enzima arabinosil transferasa, lo que a su vez inhibe la síntesis de arabinogalactano, compuesto que forma parte de la pared bacteriana. Las

mutaciones en el gen *embB* que codifica a la enzima arabinosil transferasa están relacionadas con la resistencia a B (32).

Por vía oral, se administra a una dosis diaria de 15 a 25 mg por kilogramo de peso, con la cual se espera una  $C_{max}$  entre 2 a 6  $\mu\text{g/mL}$  (intervalo terapéutico) de 2 a 4 horas después de la administración de 1200 mg. Se recomienda un ajuste de dosis cuando la  $C_{max}$  es menor a 2  $\mu\text{g/mL}$ . Se une de 10 a 30% a proteínas, su  $V_d$  es de 1.6 a 3.89 L/kg y la  $t_{1/2}$  es de 2.5 a 4 horas; sufre metabolismo hepático y se excreta por orina (33,34).

Los factores que pueden modificar la farmacocinética de B son el estado de malnutrición que el paciente puede llegar a presentar por el padecimiento de TB, causando un retraso en el vaciado gástrico, lo que provoca la disminución en las  $C_p$  (20,21).

## **2.2 Monitorización terapéutica de fármacos de primera línea.**

La tasa de éxito al tratamiento para pacientes con TB tratados con fármacos de primera línea es del 74% (2); sin embargo, se ha comprobado que el establecimiento de un programa permanente de monitorización y seguimiento farmacoterapéutico permitirá alcanzar tasas de curación hasta de 95% (8). Existen problemas como la alta variabilidad en la respuesta al tratamiento, lo cual puede derivar en desenlaces clínicos adversos como el fallo terapéutico, mayor duración de la fase intensiva, recaídas, desarrollo de cepas farmacorresistentes e incluso el fallecimiento del paciente. Una de las técnicas para medir la exposición a los fármacos, ajustar la dosis y mejorar la respuesta al tratamiento en pacientes con TB de manera individualizada es la TDM, la cual se puede definir como la determinación de las  $C_p$  para poder adaptar la dosis y lograr los objetivos, los cuales hacen referencia a maximizar la eficacia y minimizar la toxicidad (16).

## **2.3 Métodos de cuantificación para fármacos antituberculosos de primera línea.**

Entre los métodos analíticos disponibles para la cuantificación de los fármacos antituberculosos de primera línea se encuentran las técnicas por cromatografía líquida. Por muchos años, los métodos por HPLC acoplado a un detector UV (HPLC – UV) fue la técnica principal para la cuantificación de estos fármacos en muestras biológicas, sin embargo, en los últimos años se ha observado un aumento en el uso de las técnicas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, debido a una mayor sensibilidad y selectividad en comparación con los métodos por HPLC – UV. Las diferencias de los métodos cromatográficos difieren en la fase móvil empleada, la columna utilizada, el sistema de bombeo y el volumen de inyección necesario para poder llevar a cabo la separación cromatográfica y cuantificación simultánea de los fármacos (12).

## **2.4 Estimación bayesiana.**

El ajuste Bayesiano tiene como ventaja emplear una o dos  $C_p$  de fármaco en el paciente para estimar los parámetros farmacocinéticos individuales; con esta metodología es posible predecir con un alto grado de confiabilidad, el perfil farmacocinético completo en el paciente al estimar parámetros tales como  $C_{max}$ , tiempo máximo ( $T_{max}$ ),  $CL$ ,  $V_d$ , constante de absorción ( $K_a$ ) y  $t_{1/2}$  en etapas posteriores del tratamiento (8,36,37).

El modelo estadístico Bayesiano requiere de información previa, procedente de modelos farmacocinéticos poblacionales que hayan sido construidos, de preferencia con datos de la población a la que pertenece el paciente, o en su defecto, de una población con la que comparta características demográficas y clínicas, entre otras. Los parámetros farmacocinéticos poblacionales ya conocidos, aunados con la nueva información de las  $C_p$  obtenidas en la monitorización del fármaco de interés, se integran en un software farmacoestadístico con la finalidad de estimar los parámetros farmacocinéticos correspondientes a cada paciente. Finalmente, los parámetros

estimados se emplean para realizar el ajuste de las dosis que deriven en  $C_p$  dentro de intervalo terapéutico (36).

## **2.5 Muestreo convencional y en DBS.**

De manera convencional, las concentraciones de los fármacos antituberculosos se miden en plasma o suero a partir de la toma de muestra de sangre venosa periférica y la posterior separación de dichos componentes. En últimas fechas, han surgido procedimientos que permiten la cuantificación de fármacos mediante estrategias menos invasivas y de fácil manejo, tales como el muestreo por DBS, la cual, puede ser una alternativa en el muestreo convencional, ya que, a comparación de la muestra de sangre venosa, solo se requiere un pinchazo en el dedo para obtener las DBS, las cuales son colocadas en un papel filtro especial y se mantienen secas hasta su posterior análisis (38). Actualmente se utiliza la metodología por DBS por los beneficios que ofrece dado el bajo volumen de sangre requerida ( $<50 \mu\text{L}$ ), en algunas ocasiones el analito es más estable y existe un riesgo biológico menor, además de incluir una mayor disponibilidad de monitorización terapéutica en área rurales, lo que permite disminución de costos de almacenamiento y transporte (39).

En DBS, los componentes endógenos de la sangre pueden provocar interferencias o efectos de matriz durante el análisis, lo que podría afectar negativamente los resultados analíticos obtenidos. Para evitar que los fármacos formen complejos quelatos, se emplea EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) cuya función radica en la precipitación de componentes endógenos. Por otro lado, se debe considerar la evaluación del hematocrito y el volumen del DBS, ya que estos parámetros podrían influir en los resultados (40).

El método de DBS se ha aplicado con éxito en los 4 fármacos de primera línea por separado, lo que respalda su uso como una alternativa de muestreo en pacientes con TB (38,40–42).

### 3.0 Justificación

La TB es una de las principales causas de muerte por un solo microorganismo, siendo una de las enfermedades de prioridad en salud pública en nuestro Estado y que demanda mayor vigilancia y control epidemiológico por parte de las autoridades sanitarias. El esquema de tratamiento de primera línea demanda el empleo intensivo de A, B, C y D en la etapa inicial del tratamiento. A pesar de que la estrategia TAES reporta tasas de curación de 74%, esta cifra es considerada como subóptima debido a la incrementada morbilidad y farmacorresistencia de esta enfermedad infecciosa. A lo anterior se suma el metabolismo de C afectado por los polimorfismos presentes en los genes que codifican a la enzima NAT2, modificando las Cp del paciente, por lo tanto, es requerido realizar genotipificación de los SNPs y visualizar cómo el fenotipo presente influirá en las concentraciones de C (22).

La optimización en el tratamiento puede disminuir la mortalidad, reducir el fracaso y abandono al tratamiento (11). La TDM es una metodología para optimizar los tratamientos individuales en pacientes con TB ya que se requiere un tratamiento a largo plazo. La implementación requiere de diferentes enfoques de acuerdo con las necesidades específicas. Uno de estos enfoques es la utilización de métodos distintos a las extracciones de sangre venosa con grandes volúmenes, además puede ser utilizado para evitar concentraciones tóxicas y reacciones adversas a medicamentos (39).

La mayoría de los programas de monitorización emplean el método convencional por el cual analizan uno o varios fármacos de primera línea mediante punción venosa, para después llevar a cabo una extracción a partir del plasma obtenido y así analizarlo posteriormente. Este tipo de toma de muestra puede causar molestias en los pacientes. Actualmente, con los avances en la disponibilidad de instrumentación analítica sensible, se ha tenido gran interés el uso de micromuestras (muestras < 50  $\mu$ L) (43). Entre estos métodos se encuentra la técnica de DBS, la cual ofrece diferentes beneficios como el ser un método mínimamente invasivo, una recolección

de muestra simplificada, un volumen sanguíneo bajo, almacenamiento y transferencia convenientes y un riesgo biológico reducido (44).

Las DBS aplican el uso de una gota de sangre obtenida por pinchazo en un dedo de la mano, mediante el uso de una lanceta. La sangre se deja secar a temperatura ambiente. Normalmente, se perforan discos de aproximadamente 3 mm de diámetro y se lleva a cabo la extracción y mediante técnicas de UPLC – MS/MS, se pretende analizar simultáneamente estos fármacos reproduciendo y optimizando técnicas ya publicadas (45).

## **4.0 Hipótesis.**

La aplicación de un proceso de micromuestreo por DBS permitirá la cuantificación de las concentraciones de A, B, C y D mediante UPLC-MS/MS, como alternativa de la toma de muestra sanguínea convencional en pacientes con TB.

## **5.0 Objetivos.**

### **5.1 Objetivo general.**

Desarrollar y validar un método por UPLC-MS/MS para cuantificar simultáneamente A, B, C y D en DBS, como alternativa de muestreo del método convencional, para demostrar su aplicación en la monitorización farmacocinética de pacientes con TB.

### **5.2 Objetivos particulares.**

- Desarrollar y validar un método por UPLC-MS/MS para cuantificar simultáneamente concentraciones plasmáticas de A, B, C y D.
- Desarrollar y validar un método por UPLC-MS/MS para cuantificar simultáneamente los fármacos de A, B, C y D a partir de DBS.
- Cuantificar A, B, C y D en muestras plasmáticas obtenidas por venopunción y por DBS de manera simultánea en pacientes bajo tratamiento anti-TB a las 2 y 4 horas postdosis.
- Interpretar las concentraciones plasmáticas obtenidas de manera individual mediante la estimación bayesiana de los parámetros farmacocinéticos de A y C con el programa NONMEM v7.4.
- Determinar la correlación y concordancia entre las concentraciones obtenidas de A, B, C y D en muestras de plasma y en DBS de pacientes con TB.

## 6.0 Material y métodos.

### 6.1.1 Equipos y reactivos.

#### Equipo.

- Se utilizó el Cromatógrafo de Líquidos ACQUITY UPLC clase H acoplado a un espectrómetro de masas en tándem XEVO TQD (Waters®).
- Vortex mixer.
- Centrifuga.
- Sonicador.
- Ultracongelador.

#### Reactivos.

- Estándares de referencia:  
C, pureza del 99.8%; A, pureza del 96.1%; B, pureza del 100% y D, pureza del 99.96%.
- Agua HPLC.
- Acetonitrilo.
- Ácido fórmico.
- Metanol.
- Kit de extracción de DNA.
- Sondas TaqMan™:
- PCR TaqMan™ Master mix.
- Agua libre de DNAsas.
- Isopropanol grado biología molecular.
- Alcohol etílico grado biología molecular.

## **6.1 Condiciones de espectrometría de masas.**

Para establecer las condiciones de espectrometría de masas, se realizaron infusiones directas de estándares en solución acuosa de cada uno de los analitos y se establecieron y optimizaron los parámetros generales y específicas para llevar a cabo la identificación y cuantificación de A, B, C y D.

## **6.2 Estandarización de las condiciones cromatográficas.**

### **6.2.1 Preparación de las soluciones patrón.**

Las soluciones patrón de B y C se prepararon en concentración de 2 mg/mL. A partir de éstos se preparó una mezcla a un 1 mL de volumen final, para obtener las concentraciones de 1 mg/mL; para A y D la concentración final fue de 1 mg/mL y 5 mg/mL.

### **6.2.2 Método cromatográfico para plasma.**

Para la estandarización de la técnica cromatográfica se realizaron pruebas preliminares para determinar las condiciones que garanticen la correcta elución de los fármacos antituberculosos.

Se evaluaron dos tipos de columnas y se seleccionó de de estas por la mejor obtención en la forma de los picos de los cuatro fármacos antituberculosos. Se utilizó un sistema de bombeo en gradiente y se determinó el volumen de inyección adecuado con base a la señal analítica.

### **6.2.3 Pruebas para la extracción de los analitos en plasma.**

Para llevar a cabo la estandarización del método de extracción se realizaron diferentes pruebas.

Inicialmente, para el pretratamiento de las muestras en plasma se ensayó con extracciones líquido – líquido. El método de extracción requirió un volumen del estándar o control a los cuales se les adicionó un solvente orgánico, se agitó y se realizaron una serie de centrifugaciones para obtener el sobrenadante.

Para estas pruebas se decidió ocupar un estándar de baja concentración para evaluar el índice señal/ruido a bajas concentraciones.

#### **6.2.4 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.**

Se prepararon las curvas de calibración y muestras control de calidad: muestra control baja, media, alta y diluida (MCB, MCM, MCA y MCD).

#### **6.2.5 Método cromatográfico inicial para DBS.**

Como condiciones iniciales para llevar a cabo la separación cromatográfica de los cuatro antituberculosos en DBS, se ocuparon las condiciones finales establecidas en plasma, realizando ajustes con base en la forma del pico y al índice señal/ruido.

#### **6.2.6 Estandarización del hematocrito.**

La sangre completa ocupada para la preparación de curvas de calibración y muestras de control de calidad se ajustó a un nivel de hematocrito. Para este propósito, se midió el hematocrito inicial de la sangre completa a utilizar; de forma empírica se añadió o eliminó el plasma necesario para obtener el hematocrito.

#### **6.2.7 Estandarización del método de extracción en DBS.**

Se probaron diferentes métodos de extracción, los cuales consistieron en extracciones líquido – líquido. Se prepararon los estándares a una concentración establecida en sangre completa, se mezclaron y posteriormente, se tomó un volumen específico y se colocó en tarjetas especiales. Las tarjetas impregnadas con la sangre completa se dejaron secar, posterior a esto se perforaron las tarjetas. Se probaron dos solventes de extracción para extraer a los cuatro antituberculosos, así como una mezcla de solventes. Se agitó el contenido dentro del tubo eppendorf y posteriormente se centrifugó. Finalmente se tomó el sobrenadante y se colocó en un vial para su posterior análisis.

### **6.2.8 Preparación de curva de calibración y controles de calidad en DBS.**

La curva de calibración y muestras control de calidad se prepararon por dilución.

### **6.3 Validación del método analítico en plasma y DBS.**

Para realizar la validación del método analítico para plasma, se siguieron los lineamientos establecidos en el apartado 9 de la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable (46) y en la guía internacional de validación de métodos de bioanálisis de la Food and Drug Administration (47). Adicionalmente para DBS se siguió la guía de desarrollo y validación de métodos basados en DBS para la TDM, 2019 (48). Los métodos se evaluaron en términos de selectividad, efecto de matriz y efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas, linealidad, precisión y exactitud, repetibilidad y reproducibilidad y estabilidad de la muestra, además se evaluó el efecto del hematocrito para DBS.

#### **6.3.1 Selectividad.**

Se analizaron 6 unidades individuales de muestras blanco de matriz (plasma y DBS). La respuesta analítica (expresadas como ABC: Área bajo la curva) próximas al tiempo de retención de cada analito deben ser menores al 20% del ABC con respecto al límite inferior de cuantificación. Adicionalmente, para plasma se utilizaron muestras blanco lipémica, hemolizada, con anticoagulante de heparina y EDTA.

#### **6.3.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.**

Se extrajeron 6 muestras individuales de matriz blanco (plasma y DBS) y posteriormente se les adicionó el analito, para poder obtener la respuesta analítica correspondiente. Además, se analizaron individualmente 6 unidades del analito en solución (agua) y posteriormente se calculó el factor de matriz normalizado (FMN). Se utilizaron MCB y MCA en matriz y en solución para el cálculo del FMN.

$$FMN = \frac{\text{Respuesta del analito matriz (ABC)}}{\text{Respuesta del analito en solución (ABC)}}$$

El porcentaje de CV del FMN calculado en las 6 unidades de cada control no debe ser mayor al 15%.

### **6.3.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.**

Se realizaron 3 inyecciones de la misma muestra blanco (plasma y DBS), siendo una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación de la curva de calibración. El ABC próxima al tiempo de retención de cada analito debe ser menor al 20% ABC con respecto al LIC.

### **6.3.4 Límite de detección.**

Mediante el uso de la desviación estándar (DE) de la respuesta de 6 unidades de muestras blanco de matriz biológica y la pendiente obtenida a partir de la curva de calibración (m), se obtuvo el límite de detección (LD) para AB, B, C y D con la siguiente fórmula (49):

$$LD = \frac{3.3 DE}{m}$$

### **6.3.5 Linealidad.**

Se caracterizaron al menos 6 concentraciones para la curva de calibración de cada fármaco. Cada curva de calibración incluyó una muestra blanco de matriz biológica (sin la adición del analito). Fueron evaluadas tres curvas de calibración en cada día de trabajo.

Se determinó el modelo matemático adecuado a la relación entre la concentración y la respuesta, la cual fue una regresión lineal; por ello, se reporta la pendiente (m), la intersección con el eje Y (b), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ).

Los resultados de la concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 80 - 120%.

### **6.3.6 Precisión y exactitud.**

#### **Repetibilidad.**

En un mismo día se analizaron por quintuplicado las siguientes muestras: límite inferior de cuantificación (LIC), MCB, MCA y MCD. Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El valor de porcentaje de coeficiente de variación (CV) no debe ser mayor que el 15%, excepto para el LIC, el cual debe ser menor o igual al 20%.

De los datos de repetibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Desviación (\%)} = \frac{\text{Concentración adicionada} - \text{concentración obtenida}}{\text{Concentración adicionada}} * 100$$

El valor medio del porcentaje de desviación debe encontrarse entre  $\pm 15\%$ , excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser  $\pm 20\%$ .

#### **Reproducibilidad.**

Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes, las muestras control: LIC, MCB, MCM y MCA. Para cada muestra control se calculó la concentración obtenida interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. El valor de porcentaje de CV no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual al 20%.

De los datos de reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida con respecto al valor nominal, el valor medio del porcentaje de desviación debe encontrarse entre  $\pm 15\%$ , excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser  $\pm 20\%$ .

### **6.3.7 Estabilidad de la muestra.**

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que los fármacos permanecen estables en la matriz biológica. Se analizaron por triplicado las MCB, MCM y MCA, las concentraciones obtenidas fueron comparadas con las concentraciones nominales. El porcentaje de desviación debe cumplir con el criterio del  $\pm 15\%$  para poder aceptar la prueba.

#### **Estabilidad a corto, mediano y largo plazo en plasma.**

Se determinó la estabilidad a 20, 40 y a 50 días en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **Estabilidad en DBS.**

Se determinó la estabilidad a 3 y 6 días en refrigeración ( $4 - 8^{\circ}\text{C}$ ) y temperatura ambiente ( $\sim 20^{\circ}\text{C}$ ).

#### **Estabilidad en el automuestreador a 24 horas.**

Se determinó la estabilidad en el automuestreador a 24 horas a una temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ .

#### **Estabilidad ciclos congelación – descongelación en plasma.**

Se evaluó la estabilidad de los analitos en plasma, almacenadas a la temperatura de congelación ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) por al menos 12 horas, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por al menos 12 horas bajo las mismas condiciones. Se determinaron las estabildades a 1, 2 y 3 ciclos congelación – descongelación.

### **6.3.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.**

Para evaluar el impacto del nivel de hematocrito, se evaluó con MCB, MCM y MCA por triplicado, ajustando a un nivel de hematocrito bajo y alto. Las concentraciones

obtenidas fueron comparadas con las concentraciones nominales. El porcentaje de desviación debe cumplir con el criterio del  $\pm 15\%$  para poder aceptar la prueba.

## **6.4 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.**

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Dr. Ignacio Morones Prieto y por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas.

### **6.4.1 Diseño del estudio.**

El estudio tuvo un diseño analítico, transversal y prospectivo.

### **6.4.2 Tipo de muestreo.**

El muestreo fue no probabilístico consecutivo.

### **6.4.3 Universo de estudio.**

El estudio se llevó a cabo con pacientes con TB en tratamiento con los cuatro fármacos durante la fase intensiva de la terapia, a los cuales se les dio a firmar la carta de consentimiento informado.

#### **Criterios de selección:**

- **Inclusión:**
  - Pacientes de ambos sexos  $\geq 18$  años,
  - Pacientes con diagnóstico confirmado de TB bajo esquema TAES en fase intensiva.
  - Firma de la carta de consentimiento informado.
- **No inclusión:**
  - Mujeres embarazadas o en lactancia.
  - Pacientes con trastornos hepáticos o renales.
  - Pacientes con TB-MFR.

- **Eliminación:**

Retiro del consentimiento informado.

Pacientes que presenten dificultad en la toma de muestra.

## **6.5 Administración de medicamentos y toma de muestras.**

La administración de la dosis indicada para A, B, C y D para cada paciente se llevó a cabo conforme las indicaciones del médico. Posteriormente, se tomaron las muestras a las 2 y 4 horas postdosis.

- **Muestra de sangre venosa periférica.**

A cada paciente se le tomó una muestra sanguínea de 4 mL procedente de la vena cubital media en tubo Vacoutainer con heparina y EDTA como anticoagulante.

Las muestras para la cuantificación de fármacos en plasma fueron centrifugadas a 1300 rpm por 10 min a 4 °C, se separó el plasma en tubos eppendorf y fueron conservadas para su posterior análisis.

- **Muestra de sangre capilar.**

Se aplicó un masaje en el dedo índice para estimular la circulación de la sangre. Con una torunda con alcohol se procedió a desinfectar, posteriormente, se realizó la punción con una lanceta. Se tomó un volumen específico de sangre y se transfirieron y dejaron secar a temperatura ambiente a una tarjeta especial, posteriormente se almacenaron en refrigeración para su posterior análisis.

## **6.7 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.**

Cada muestra fue resguardada conforme a las condiciones de almacenamiento validadas y el día del análisis fueron tratadas conforme al método de extracción establecido para cada tipo de muestra. Previo a la determinación de las concentraciones de los diferentes pacientes se analizaron curvas de calibración para cada fármaco, así como las muestras de control de calidad. En la curva de calibración respectiva se interpoló la respuesta medida en el equipo UPLC - MS/MS

para cada muestra problema con la finalidad de obtener la correspondiente concentración plasmática y en DBS.

## **6.6 Genotipificación.**

Para la establecer el fenotipo acetilador de cada paciente se determinaron 7 SNP en NAT 2, utilizando PCR en tiempo real acoplado a sondas TaqMan™ para el análisis del ADN genómico extraído de sangre venosa periférica.

### **6.6.1 Extracción de ADN.**

Para llevar a cabo las extracciones de ADN, se empleó un kit comercial.

### **6.6.2 PCR en tiempo real.**

Para llevar a cabo la PCR en tiempo real, se emplearon sondas TaqMan, PCR TaqMan Master mix, el cual contiene los componentes necesarios para la PCR y el ADN de los pacientes.

## **6.8 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.**

Para la obtención de los parámetros farmacocinéticos individuales de A y C se llevó a cabo la estimación bayesiana. Se crearon bases de datos con la información de cada paciente, tomando en cuenta las  $C_p$  determinadas a las 2 y 4 horas postdosis. Para C se utilizó el modelo farmacocinético poblacional desarrollado por Huerta y cols., 2020 (19), en el cual, como covariables de interés se añade el IMC y fenotipo acetilador de cada paciente; para A el modelo desarrollado por Medellín S. y cols., 2020 (27) y como covariable el peso total del paciente.

Se realizó el ajuste de dosis en aquellos pacientes que presentaban  $C_p$  por debajo del intervalo terapéutico para C (3 – 6  $\mu\text{g/mL}$ ) y A (8 – 24  $\mu\text{g/mL}$ ). Se procedió a determinar las  $C_p$  sustituyendo la dosis inicial por el nuevo régimen de dosificación sugerido y se determinó si las nuevas concentraciones esperadas se encontraban dentro del intervalo terapéutico para cada fármaco.

## **6.9 Análisis estadístico.**

Para determinar el grado de concordancia y asociación entre las concentraciones en plasmáticas y por DBS, se realizó un análisis de regresión lineal y de correlación.

## **7.0 Resultados.**

### **7.1 Validación de los métodos analíticos.**

#### **7.1.1 Selectividad.**

Se obtuvo el porcentaje de ABC con respecto al LIC promedio, el cual debe ser menor al 20%, tanto en muestras blanco de plasma como de DBS.

#### **7.1.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.**

Se calculó el FMN, DE y el porcentaje de CV, el cual fue menor al 15%.

#### **7.1.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.**

Se obtuvo el porcentaje de ABC de muestras blanco inyectadas en plasma y DBS. El porcentaje de ABC con respecto al LIC fue menor al 20%.

#### **7.1.4 Límite de detección.**

Se obtuvieron los LD para cada fármaco en plasma y DBS, calculados a partir de la señal promedio de 6 blancos de matriz biológica.

#### **7.1.5 Linealidad.**

Se construyeron las curvas de calibración con el ABC y las concentraciones empleadas. Se determinó la media del ABC, la DE y el porcentaje de recobro de cada estándar de la curva de calibración para plasma y DBS. Además, se presentan los datos de m, b, r y r<sup>2</sup>.

#### **7.1.6 Precisión y exactitud.**

Se evaluó la precisión y exactitud en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El porcentaje de CV para las muestras control fue menor al 15% y para el LIC menor al 20%. Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de desviación, el cual se encontró entre el  $\pm 15\%$  con respecto al valor promedio de las concentraciones

recuperadas para las MCB, MCM y MCA, mientras que para el LIC fue entre el  $\pm 20\%$ .

### **7.1.7 Estabilidad de las muestras en plasma y DBS.**

#### **Estabilidad a corto, mediano y largo plazo en plasma.**

Se determinó la estabilidad a 20, 40 y 50 días, para plasma. El porcentaje de desviación se encontró entre el  $\pm 15\%$ .

#### **Estabilidad a corto, mediano plazo en DBS.**

Se evaluó estabilidad con MCB, MCM y MCA por triplicado en dos formas de almacenamiento a corto y mediano plazo. El porcentaje de desviación se encontró entre el  $\pm 15\%$ .

#### **Estabilidad en el automuestreador a 24 horas.**

Se evaluó la estabilidad con MCB, MCM y MCA por triplicado en muestras de plasma y DBS a las 24 horas a  $10^{\circ}\text{C}$ . El porcentaje de desviación se encontró entre el  $\pm 15\%$ .

#### **Estabilidad ciclos congelación – descongelación en plasma.**

Se evaluó la estabilidad a 1, 2 y 3 ciclos congelación-descongelación. El porcentaje de desviación se encontró entre el  $\pm 15\%$ .

### **7.1.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.**

Se evaluaron MCB, MCM y MCA por triplicado, ajustando a un nivel de hematocrito bajo y alto. El porcentaje de desviación se encontró entre el  $\pm 15\%$ .

## **7.2 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.**

Para comprobar la utilidad de los métodos validados, se analizaron las muestras correspondientes a 15 pacientes con diagnóstico confirmado de TB con tratamiento en fase intensiva.

Se obtuvieron las concentraciones plasmáticas de A, B, C y D a las 2 y 4 horas postdosis. La mayoría de los pacientes presentaron Cp subterapéuticas de A y C. Para B y D, el mayor porcentaje de pacientes presentó Cp dentro del intervalo terapéutico.

Se determinaron las concentraciones en DBS a las 2 y 4 horas postdosis. Al realizar la comparación de las concentraciones en DBS con el intervalo terapéutico reportado en plasma se observa que el porcentaje de pacientes con Concentraciones dentro del intervalo terapéutico disminuyen para A y C. Para el caso de B aumentaron las concentraciones por encima del intervalo y para D, las concentraciones permanecieron similares.

## **7.3 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.**

Se estimaron los parámetros farmacocinéticos para los 15 pacientes con TB por el método bayesiano.

El ajuste de dosis se llevó a cabo mediante la estimación de las Cp predichas con la nueva dosis, empleando los parámetros farmacocinéticos ajustados por el método bayesiano. La mayoría de los pacientes requirió de un ajuste de dosis con base en las Cp de A y C.

## **7.4 Correlación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.**

Se determinó el análisis de correlación ( $P < 0.05$ ) y análisis de regresión lineal para los cuatro fármacos entre las concentraciones plasmáticas y en DBS.

## 8.0 Discusión.

La TDM es necesaria para poder identificar y prevenir un tratamiento subóptimo o concentraciones tóxicas en pacientes con TB, por lo tanto, permite al médico tomar decisiones informadas con respecto al ajuste oportuno de la terapia con medicamentos. Algunos pacientes con TB que responden lentamente al TAES en fase intensiva, llegan a presentar interacciones o presentan estados de enfermedad que complican la situación clínica. Estos pacientes pueden beneficiarse de la TDM y las intervenciones que se realicen pueden contribuir a una mejora en la evolución clínica e impedir la resistencia bacteriana (8). Se conoce que si los fármacos antituberculosos no alcanzan la concentración mínima de su intervalo terapéutico, estos presentarán una respuesta ineficaz en el tratamiento (51), por ello la necesidad de desarrollar técnicas analíticas específicas tales como HPLC o cromatografía de gases (10) para llevar a cabo la cuantificación de estos fármacos.

Existen situaciones en las que el muestreo convencional no se puede llevar a cabo, especialmente en zonas de difícil acceso y/o con recursos limitados. Además, una vez obtenida la muestra, ésta debe ser centrifugada y congelada lo más pronto posible, ya que C no es estable a temperatura ambiente y es propensa a degradarse, A es más estable, durante 6 horas a estas condiciones y la mayoría de los demás fármacos antituberculosos son estables hasta 24 horas. Por ello, como alternativa se propone el uso de los DBS, (8).

Por estas razones se desarrollaron y validaron los métodos analíticos para cuantificar a los cuatro fármacos antituberculosos de primera línea en muestras plasmáticas y en DBS. Dichas validaciones se llevaron a cabo bajo la normativa que rige a nuestro país y a través de guías internacionales.

El pretratamiento de las muestras consiste en un paso crítico para la extracción de los cuatro fármacos antituberculosos a partir de la muestra biológica. El plasma y la sangre completa consisten en muestras complejas, en las cuales se deben de remover componentes tales como las proteínas presentes. Para este propósito se

pueden ocupar solventes orgánicos como ACN, metanol, metanol:agua o ACN:agua en diferentes proporciones (52). En el presente trabajo se utilizaron métodos de extracción sencillos y rápidos (53).

Una comparación de los métodos encontrados en la literatura tanto en plasma como en DBS con los métodos desarrollados en este estudio es el tiempo de corrida total reportados van desde los 2.5 – 10.5 minutos para plasma y 2.5 – 4 minutos en DBS, con la ventaja de que, en ambas muestras, se incluyeron los cuatro antituberculosos de primera línea. Si bien los analitos eluyen antes de los cinco minutos en ambos métodos, se deja pasar un tiempo de 2 minutos para realizar el reacondicionamiento de la columna.

Las curvas de calibración fueron adecuadas en el rango establecido para cada fármaco, tanto para plasma como para DBS, ya que el intervalo terapéutico de cada uno se encuentra en el rango de concentraciones establecidas.

Alsultan A., y cols., 2014 (8), mencionan que, para la obtención del plasma, la recolección de sangre venosa periférica en pacientes con TB comúnmente se usan tubos al vacío con heparina como anticoagulante; durante la validación del método analítico en plasma, se evaluó el impacto de dos anticoagulantes, demostrando que no hay interferencias al usar cualquiera de los anticoagulantes mencionados.

En otros estudios como el de Wang X. y cols., 2020 (54) y Wu L. y cols., 2020 (55) evaluaron la estabilidad hasta 20 y 14 días, respectivamente, para los cuatro fármacos de interés, mientras que en el presente estudio la estabilidad en plasma se evaluó hasta los 50 días.

En estudios como Wu L. y cols., 2020 (55) y Sturkenboom M. y cols., 2015 (56) evaluaron la estabilidad en el automuestreador a las 12 y 24 horas, además de la estabilidad a tres ciclos congelación – descongelación dando como resultado que A, B, C y D eran estables. En este estudio se obtuvo que A, B, C y D son estables en el automuestreador a 24 horas. Solamente A, B y D son estables hasta tres ciclos,

mientras que C solo es estable hasta el primer ciclo, por ello la importancia de realizar alícuotas en las muestras de los pacientes.

Actualmente, se han desarrollado métodos para cuantificar antituberculosos en DBS con la limitante de que solo incluyen de 1 a 3 fármacos antituberculosos de primera línea, sin embargo, en este estudio se desarrolló un método analítico en DBS para los cuatro fármacos en una sola corrida analítica, la cual tiene una duración de 7 minutos. Además, se demostró que el nivel de hematocrito no interfiere con los resultados en el rango evaluado.

Existen estudios en los que se han asociado las concentraciones plasmáticas bajas de A y C con un fracaso al tratamiento o recaída (8). En este estudio, del total de los 15 pacientes, la mayoría de los pacientes presentaron las dos concentraciones plasmáticas por debajo del intervalo terapéutico, por ello, se les realizó un ajuste de dosis.

Los valores estimados de  $C_{max}$  y  $T_{max}$  para A y C fueron los esperados con base en la bibliografía, ya que se reportan concentraciones de  $C_{max}$  de 8 – 24  $\mu\text{g/mL}$  para A y de 3 – 6  $\mu\text{g/mL}$  para C. En el caso de C, se cuantificaron  $C_p$  a las 2 y 4 horas postdosis que se quedaron por debajo del intervalo terapéutico, mientras que todas las  $C_{max}$  estimadas se encontraron dentro o por encima del intervalo terapéutico; sin embargo, se realizó el ajuste de dosis en los pacientes con  $C_p$  bajas aun cuando las  $C_{max}$  estuvieran dentro del rango debido a que las concentraciones plasmáticas por debajo del intervalo terapéutico a las 2 y 4 horas post dosis, estaban relacionadas con una pobre respuesta al tratamiento (50). Los valores de  $K_a$ ,  $CL$  y  $V_d$  de A y C fueron similares a los reportados en la bibliografía (19,27).

Lee K. y cols., 2017 (41), reportaron una correlación significativa entre las concentraciones encontradas en plasma y DBS de C. En el caso Vu D. y cols., 2014 (40) obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.9527 entre las concentraciones plasmáticas y en DBS para A. En el presente estudio, se realizó un análisis de regresión lineal que describe la relación entre las concentraciones en DBS y las

plasmáticas de A, B, C y D, además de un análisis de correlación para evaluar la fuerza de la relación entre las dos variables. Si bien se logró llevar a cabo la determinación de  $r$  y  $r^2$ , para incrementar la potencia en ambos coeficientes, es necesario aumentar el número de muestras de pacientes (59). La guía de desarrollo y validación de métodos basados en DBS para la TDM, 2019 (48), establece que, para realizar la validación clínica en DBS es necesario tomar 80 muestras provenientes de al menos 40 pacientes. Un grupo de 40 muestras deben ser utilizadas para obtener un factor de conversión, por ejemplo, de las concentraciones de DBS a concentraciones plasmáticas. El otro grupo de 40 muestras son utilizadas para validar dicho factor obtenido. En ocasiones, el número de pacientes y muestras es limitada, por ello, se recomienda tener al menos 40 muestras provenientes de 25 pacientes (48).

Dentro de las limitaciones del estudio se encuentra que solo se evaluó un tipo de tarjeta para la obtención de las DBS, ya que dependiendo del tipo de papel filtro, se puede afectar la homogeneidad de la muestra, la dispersión de la sangre y la recuperación del analito (48). Otro punto a señalar es que, como método de recolección de muestra para las DBS, se realizó un método volumétrico, el cual consiste en depositar una cantidad establecida de la sangre capilar del paciente en las tarjetas seleccionadas, lo que por el momento imposibilita que el paciente deje caer la sangre proveniente del pinchazo con lanceta sobre la tarjeta (48,60).

Con base en el desarrollo del proyecto, es necesario realizar mejoras en la técnica analítica para DBS, tales como evaluar el efecto del volumen de la muestra ocupada para la formación de las DBS y optimizar las condiciones de almacenamiento de las muestras. Además, se logró identificar que un incremento en el número de muestras de los pacientes es necesario para determinar el factor de conversión de las concentraciones en DBS a concentraciones plasmáticas y posteriormente dicho factor deberá ser validado.

## **9.0 Conclusión.**

Se llevó a cabo el desarrollo y validación de un método por UPLC – MS/MS para cuantificar simultáneamente concentraciones plasmáticas y en DBS de A, B, C y D en términos de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, efecto acarreo y efecto matriz para métodos por espectrometría de masas. Además, se estandarizaron métodos de extracción para ambos métodos.

Se interpretaron las concentraciones plasmáticas obtenidas de manera individual mediante la estimación bayesiana de los parámetros farmacocinéticos de A y C.

Se logró la aplicación de la alternativa de muestreo por DBS en muestras de pacientes con TB. Este tipo de muestreo ofrece diversas ventajas en comparación con la técnica convencional de venopunción, ya que es sencillo de obtener y almacenar, además de ser método no invasivo para el paciente.

## 10 Referencias.

1. Baya B, Achenbach CJ, Kone B, Toloba Y, Dabitao DK, Diarra B, et al. Clinical risk factors associated with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) in Mali. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2019;81:149–55. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.02.004>
2. World Health Organization. Global Tuberculosis Report [Internet]. 2021 [citado el 19 de enero de 2022]. p. 57. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
3. Dirección General de Epidemiología. Boletín de Semana Epidemiológica 32-2022 [Internet]. 2022 [citado el 23 de agosto de 2022]. p. 1–68. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/754307/sem32.pdf>
4. Lee SH. Tuberculosis infection and latent tuberculosis. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*. 2016;79(4):201–6.
5. Battista G, Mario C. Essential Tuberculosis [Internet]. 1st ed. Switzerland: Springer Nature; 2021. 436 p. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=jTw6EAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=jTw6EAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
6. Secretaría de salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis. [Internet]. 2013 [citado el 16 de abril de 2022]. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013)
7. Choi R, Jeong BH, Koh WJ, Lee SY. Recommendations for optimizing tuberculosis treatment: Therapeutic drug monitoring, pharmacogenetics, and nutritional status considerations. *Ann Lab Med*. 2017;37(2):97–107.
8. Alsultan A, Peloquin CA. Therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis: An update. *Drugs*. 2014;74(8):839–54.
9. Capiou S, Alffenaar JW, Stove CP. Alternative Sampling Strategies for

Therapeutic Drug Monitoring [Internet]. Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring: Special Populations, Physiological Conditions, and Pharmacogenomics. Elsevier Inc.; 2016. 279–336 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802025-8.00013-1>

10. Avataneo V, D'Avolio A, Cusato J, Cantù M, De Nicolò A. LC-MS application for therapeutic drug monitoring in alternative matrices. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2019;166:40–51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.040>
11. Riccardi N, Canetti D, Rodari P, Besozzi G, Saderi L, Dettori M, et al. Tuberculosis and pharmacological interactions: A narrative review. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*. 2021;2(October 2020):100007.
12. Fernandes GF dos S, Salgado HRN, Santos JL dos. Isoniazid: A Review of Characteristics, Properties and Analytical Methods. *Crit Rev Anal Chem*. 2017;47(4):298–308.
13. IBM Micromedex. Isoniazid. 2021.
14. DrugBank. Isoniazid [Internet]. 29 de Enero. 2021 [citado el 3 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00951>
15. DrugBank. Isoniazid [Internet]. 2022 [citado el 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00951>
16. Saktiawati AMI, Harkema M, Setyawan A, Subronto YW, Sumardi, Stienstra Y, et al. Optimal Sampling Strategies for Therapeutic Drug Monitoring of First-Line Tuberculosis Drugs in Patients with Tuberculosis. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2019;58(11):1445–54. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40262-019-00763-3>
17. Chirehwa MT, McIlleron H, Wiesner L, Affolabi D, Bah-Sow O, Merle C, et al. Effect of efavirenz-based antiretroviral therapy and high-dose rifampicin on the pharmacokinetics of isoniazid and acetyl-isoniazid. *J Antimicrob Chemother*.

2019;74(1):139–48.

18. McIlleron H, Chirehwa MT. Current research toward optimizing dosing of first-line antituberculosis treatment. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2019;17(1):27–38. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1555031>
19. Huerta-García AP, Medellín-Garibay SE, Ortiz-Álvarez A, Magaña-Aquino M, Rodríguez-Pinal CJ, Portales-Pérez DP, et al. Population pharmacokinetics of isoniazid and dose recommendations in Mexican patients with tuberculosis. *Int J Clin Pharm* [Internet]. 2020;42(4):1217–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11096-020-01086-1>
20. Muliaditan M, Pasqua O Della. How long will treatment guidelines for TB continue to overlook variability in drug exposure? 2019;(July):3274–80.
21. Verrest L, Wilthagen EA, Beijnen JH, Huitema ADR, Dorlo TPC. Influence of Malnutrition on the Pharmacokinetics of Drugs Used in the Treatment of Poverty-Related Diseases: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 2021;60(9):1149–69. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s40262-021-01031-z>
22. Rens NE, Uyl-De Groot CA, Goldhaber-Fiebert JD, Croda J, Andrews JR. Cost-effectiveness of a Pharmacogenomic Test for Stratified Isoniazid Dosing in Treatment of Active Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2020;71(12):3136–43.
23. Grobbelaar M, Louw GE, Sampson SL, van Helden PD, Donald PR, Warren RM. Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019;74(June):103937. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103937>
24. IBM Micromedex. Rifampicin [Internet]. 2022 [citado el 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.micromedexsolutions.com.creativaplus.uaslp.mx/micromedex2/libr>

arian/PFDefaultActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?navitem=topHome  
&isToolPage=true

25. DrugBank. Rifampicin [Internet]. 2022 [citado el 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01045>
26. Saktiawati AMI, Sturkenboom MGG, Stienstra Y, Subronto YW, Sumardi, Kosterink JGW, et al. Impact of food on the pharmacokinetics of first-line anti-TB drugs in treatment-naive TB patients: A randomized cross-over trial. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(3):703–10.
27. Medellin-garibay SE, Huerta-garcía AP, Sc M, D M, Alvarez AO-, Portales-p DP, et al. A population approach of rifampicin pharmacogenetics and pharmacokinetics in Mexican patients with tuberculosis. 2020;124(August).
28. Svensson RJ, Aarnoutse RE, Diacon AH, Dawson R, Gillespie SH, Boeree MJ, et al. A Population Pharmacokinetic Model Incorporating Saturable Pharmacokinetics and Autoinduction for High Rifampicin Doses. *Clin Pharmacol Ther.* 2018;103(4):674–83.
29. Ali AE, Elasala GS, Mohamed EA, Kolkaila SA. Spectral, thermal studies and biological activity of pyrazinamide complexes. *Heliyon* [Internet]. 2019;5(11):e02912. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02912>
30. DrugBank. Pyrazinamide [Internet]. 2022 [citado el 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00339>
31. IBM Micromedex. Pyrazinamide [Internet]. 2022. Disponible en: <https://www.micromedexsolutions.com.creativaplus.uaslp.mx/micromedex2/librarian/PFDefaultActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?navitem=headerLogout#>
32. Diacon AH, Jager VR De, Rodney Dawson, Kim Narunsky NV, Burger DA, Everitt D, Frances Pappas JN, et al. Fourteen-Day Bactericidal Activity, Safety,

and Pharmacokinetics of Linezolid in Adults with Drug-Sensitive Pulmonary Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(4):1–8.

33. IBM Micromedex. Ethambutol [Internet]. 2022 [citado el 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://www.micromedexsolutions.com.creativaplus.uaslp.mx/micromedex2/librarian/PFDefaultActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?navitem=topHome&isToolPage=true#>
34. DrugBank. Ethambutol [Internet]. 29 de Enero. 2021 [citado el 4 de febrero de 2021]. Disponible en: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00330>
35. Grotz E, Tateosian N, Amiano N, Cagel M, Bernabeu E, Chiappetta DA, et al. Nanotechnology in Tuberculosis: State of the Art and the Challenges Ahead. *Pharm Res.* 2018;35(11).
36. Jelliffe R, Neely M. Individualized Drug Therapy for Patients. Basic Foundations, Relevant Software and Clinical Applications. 1st Editio. Goutelle S, Maire P, editores. Los Angeles: ELSEVIER; 2016. 434 p.
37. Zuur MA, Bolhuis MS, Anthony R, Den Hertog A, Van Der Laan T, Wilffert B, et al. Current status and opportunities for therapeutic drug monitoring in the treatment of tuberculosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2016;12(5):509–21. Disponible en: <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1162785>
38. Martial LC, Kerkhoff J, Martinez N, Rodríguez M, Coronel R, Molinas G, et al. Evaluation of dried blood spot sampling for pharmacokinetic research and therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs in children. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;52(1):109–13.
39. Kuhlín J, Sturkenboom MGG, Ghimire S, Margineanu I, van den Elsen SHJ, Simbar N, et al. Mass spectrometry for therapeutic drug monitoring of anti-tuberculosis drugs. *Clin Mass Spectrom* [Internet]. 2019;14(May 2018):34–45.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2018.10.002>

40. Vu DH, Koster RA, Bolhuis MS, Greijdanus B, Altena R V., Nguyen DH, et al. Simultaneous determination of rifampicin, clarithromycin and their metabolites in dried blood spots using LC-MS/MS. *Talanta*. 2014;121:9–17.
41. Lee K, Jun SH, Choi MS, Song SH, Park JS, Lee JH, et al. Application of the isoniazid assay in dried blood spots using the ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem* [Internet]. 2017;50(15):882–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2017.04.010>
42. Pavan Kumar P, Murthy TE. A new, simple and rapid method for simultaneous determination of ethambutol and isoniazid in dried blood spots by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *Int J Chem Anal Sci*. 2014;5(1):49–54.
43. Freeman JD, Rosman LM, Ratcliff JD, Strickland PT, Graham DR, Silbergeld EK. State of the science in dried blood spots. *Clin Chem*. 2018;64(4):656–79.
44. Harahap Y, Maggadani B. Asian Journal of Scientific Research Analysis of Rifampicin in Dried Blood Spots Using High Performance Liquid Chromatography Research Article Analysis of Rifampicin in Dried Blood Spots Using High Performance Liquid Chromatography Yahdiana Harahap , Ghin. 2018;(November 2017).
45. Nys G, Kok MGM, Servais AC, Fillet M. Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2017;97:326–32. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.002>
46. Secretaría de Salud. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 [Internet]. 2013 [citado el 23 de agosto de 2021]. Disponible en: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#)

gsc.tab=0

47. Services D of H and H. Analytical method validation [Internet]. New Drug Development: Regulatory Paradigms for Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics. 2018 [citado el 24 de agosto de 2021]. p. 138–59. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
48. Capiou S, Veenhof H, Koster RA, Bergqvist Y, Boettcher M, Halmingh O, et al. Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot – Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit.* 2019;41(4):409–30.
49. EMA. ICH Guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures [Internet]. Vol. 2. 2022 [citado el 25 de enero de 2022]. p. 39. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q2r2-validation-analytical-procedures-step-2b_en.pdf)
50. Heysell SK, Moore JL, Keller SJ, Houpt ER. Therapeutic drug monitoring for slow response to tuberculosis treatment in a state control program, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(10):1546–53.
51. Xu Y, Wu J, Liao S, Sun Z. Treating tuberculosis with high doses of anti-TB drugs: Mechanisms and outcomes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):1–13.
52. Guillaume D, Veuthey J-L. UHPLC in Life Sciences [Internet]. illustrate. Great Britain; 2012. 447 p. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=D3UoDwAAQBAJ&pg=PT350&dq=Sample+preparation+in+UPLC&hl=en&sa=X&ved=2ahUKEwiO-arS05L5AhWMIUQIHUnbBa0Q6AF6BAgJEAI#v=onepage&q=Sample+preparation+in+UPLC&f=false>

53. Li W, Tse FLS, Zhang J. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations. 1a ed. 2013. 704 p.
54. Wang X, Zhang H, Han Y, Huo L, Cao Y, Xu X, et al. Rapid and simultaneous determination of ten anti-tuberculosis drugs in human plasma by UPLC-MS/MS with applications in therapeutic drug monitoring. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci [Internet]. 2020;1152(March):122246. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122246>
55. Wu L, Ye Z, Liu H, Guo H, Lin J, Zheng L, et al. Rapid and highly sensitive quantification of the anti-tuberculosis agents isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, rifampicin and rifabutin in human plasma by UPLC-MS/MS. J Pharm Biomed Anal. 2020;180.
56. Sturkenboom MGG, van der Lijke H, Jongedijk EM, Kok WT, Greijdanus B, Uges DRA, et al. Quantification of isoniazid, pyrazinamide and ethambutol in serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Appl Bioanal. 2015;1(3):89–98.
57. Song SH, Jun SH, Park KU, Yoon Y, Lee JH, Kim JQ, et al. Simultaneous determination of first-line anti-tuberculosis drugs and their major metabolic ratios by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2007;21:1457–66.
58. Zheng X, Jongedijk EM, Hu Y, Kuhlin J, Zheng R, Niward K, et al. Development and validation of a simple LC-MS / MS method for simultaneous determination of moxifloxacin , levofloxacin , prothionamide , pyrazinamide and ethambutol in human plasma. 2020;1158(March).
59. Antonio J, Fiacro J, Arnaud R, Ramírez Y, Lino L. Introducción a la metodología de la investigación en Ciencias de la Salud. 1a edición. Hill MG, editor. México; 2011. 377 p.
60. Wenkui L, Lee M. Dried Blood Spots. Applications and Techniques. Novartis I.

Wenkui L, editor. East Hanover, NJ, USA.; 2014. 363 p.

61. Birkett D. Farmacocinética. Dominguez A, García M, editores. Vol. 1999. MMadrid, Españ: Mc Graw Hill; 2006. 144 p.

## **Glosario.**

**Aclaramiento:** velocidad con la que un fármaco es eliminado de forma irreversible de la circulación sistémica (61).

**Biodisponibilidad:** fracción de la dosis administrada que logra alcanzar la circulación sistémica (61)

**Blanco de matriz biológica:** muestra de matriz biológica a la cual no se le ha añadido analitos (47).

**Curva de calibración:** relación de la respuesta obtenida por parte del instrumento y las concentraciones de los estándares (47).

**Efecto acarreo:** aumento en la señal del analito en consecuencia del análisis de una muestra anterior (47).

**Efecto matriz:** interferencias debido a la presencia de analitos presentes en la matriz biológica (47).

**Estabilidad:** parámetro que mide la integridad de un analito en una matriz en condiciones específicas de almacenamiento (47).

**Estabilidad en ciclos congelación – descongelación:** se refiere a la estabilidad de los analitos en la muestra al congelarse y descongelarse (47).

**Estándar de referencia:** sustancia química de pureza e identidad conocida, utilizada para la preparación de estándares y muestras control (47).

**Exactitud:** grado de proximidad del valor determinado con respecto al valor nominal (47).

**Interferencia:** acción de los componentes de la matriz biológica que pueden afectar la cuantificación del analito de interés (47).

**Monitorización terapéutica de fármacos:** individualización de la dosis mediante la cuantificación de las concentraciones plasmáticas en el organismo (61).

**Precisión:** grado de concordancia entre una serie de mediciones (47).

**Pretratamiento:** procesamiento de una muestra que se ha sometido a diferentes manipulaciones (61).

**Recobro:** eficiencia de la extracción en un proceso analítico, expresado en porcentaje (47).

**Selectividad:** parámetro en que un método puede determinar un compuesto de interés en las matrices seleccionadas sin que exista interferencia por parte de los componentes de la matriz (47).

**Unión a proteínas:** porcentaje de interacción de las proteínas en el organismo con los fármacos administrados (61).

**Vida media:** tiempo en que un fármaco se reduce un 50% de su concentración en el organismo (61).

**Volumen de distribución:** parámetro que relaciona la concentración de un fármaco en el plasma con la cantidad total del fármaco en el organismo (61).