



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.

El presente trabajo fue sometido 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:

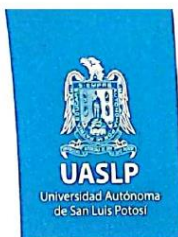
Dra. Silvia Romano Moreno.

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

**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

2022



www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372

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 rifampicina, etambutol, isoniacida y pirazinamida. 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 15 pacientes con diagnóstico de tuberculosis. La concordancia entre las concentraciones de ambas muestras, de acuerdo con el análisis de correlación se encontró entre 43.69 y 86.75% ($P < 0.05$) 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 15 patients diagnosed with tuberculosis. The concordance between the concentrations of both samples, according to the correlation analysis, was between 43.69 and 86.75% ($P < 0.05$) 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.	6
2.1 Fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB.	6
2.1.1 Isoniacida.....	6
2.1.2 Rifampicina.	8
2.1.3 Pirazinamida.....	9
2.1.4 Etambutol.....	10
2.2 Monitorización terapéutica de fármacos de primera línea.	11
2.3 Métodos de cuantificación para fármacos antituberculosos de primera línea.	12
2.4 Estimación bayesiana.....	12
2.5 Muestreo convencional y en DBS.	13
3.0 Justificación	15
4.0 Hipótesis.	17
5.0 Objetivos.	17
5.1 Objetivo general.	17
5.2 Objetivos particulares.	17
6.0 Material y métodos.	18
6.1.1 Equipos y reactivos.	18
6.1 Condiciones de espectrometría de masas.....	19
6.2 Estandarización de las condiciones cromatográficas.....	19
6.2.1 Preparación de las soluciones patrón.....	19

6.2.2 Preparación de la fase móvil.	20
6.2.3 Método cromatográfico para plasma.	20
6.2.4 Pruebas para la extracción de los analitos en plasma.....	20
6.2.5 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.	22
6.2.6 Método cromatográfico inicial para DBS.	23
6.2.7 Estandarización del hematocrito.....	23
6.2.8 Estandarización del método de extracción en DBS.....	23
6.2.9 Preparación de curva de calibración y controles de calidad en DBS.	25
6.3 Validación del método analítico en plasma y DBS.	26
6.3.1 Selectividad.....	27
6.3.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.	27
6.3.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.	27
6.3.4 Límite de detección.....	27
6.3.5 Linealidad.	28
6.3.6 Precisión y exactitud.	28
6.3.7 Estabilidad de la muestra.....	29
6.3.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.....	30
6.4 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.....	30
6.4.1 Diseño del estudio.....	30
6.4.2 Tipo de muestreo.....	31
6.4.3 Universo de estudio.....	31

6.5 Administración de medicamentos y toma de muestras.....	31
6.7 Cuantificación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.....	32
6.6 Genotipificación.....	32
6.6.1 Extracción de ADN.....	33
6.6.2 PCR en tiempo real.....	33
6.8 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.....	33
6.9 Análisis estadístico.....	34
7.0 Resultados.....	35
7.1 Validación de los métodos analíticos.....	35
7.1.1 Selectividad.....	35
7.1.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.....	41
7.1.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.....	41
7.1.4 Límite de detección.....	43
7.1.5 Linealidad.....	43
7.1.6 Precisión y exactitud.....	48
7.1.7 Estabilidad de las muestras en plasma y DBS.....	53
7.1.8 Evaluación del nivel de hematocrito en DBS.....	58
7.2 Aplicación del método cromatográfico en el análisis de muestras de pacientes con TB.....	59
7.3 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.....	63
7.4 Correlación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.....	64
8.0 Discusión.....	65
9.0 Conclusión.....	73

10 Referencias.....	74
11 Anexos.....	83
Glosario.....	94

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). En la Figura 1, se pueden observar los factores que determinarán la transmisión de la infección por TB.

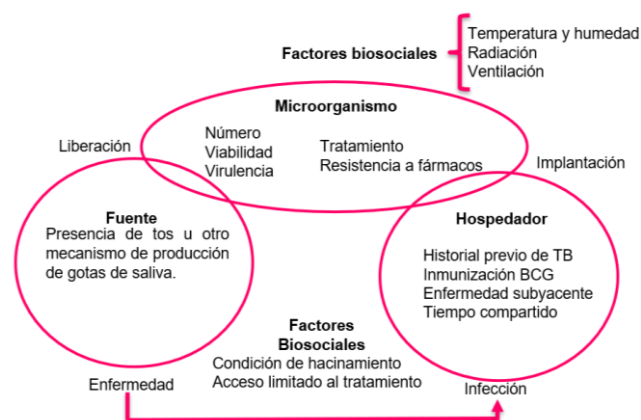


Figura 1. Factores que determinan la transmisión de la infección por TB.
Adaptado de Lee S. y cols., 2016 (4).

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 la Figura 2 se observa la progresión de la TB desde la exposición a la infección y de la progresión a la muerte. El entendimiento de esta exposición ayuda a explicar los factores de riesgo de la TB, las causas de la heterogeneidad en la epidemiología y la efectividad dirigida en las diferentes etapas de la TB (5).

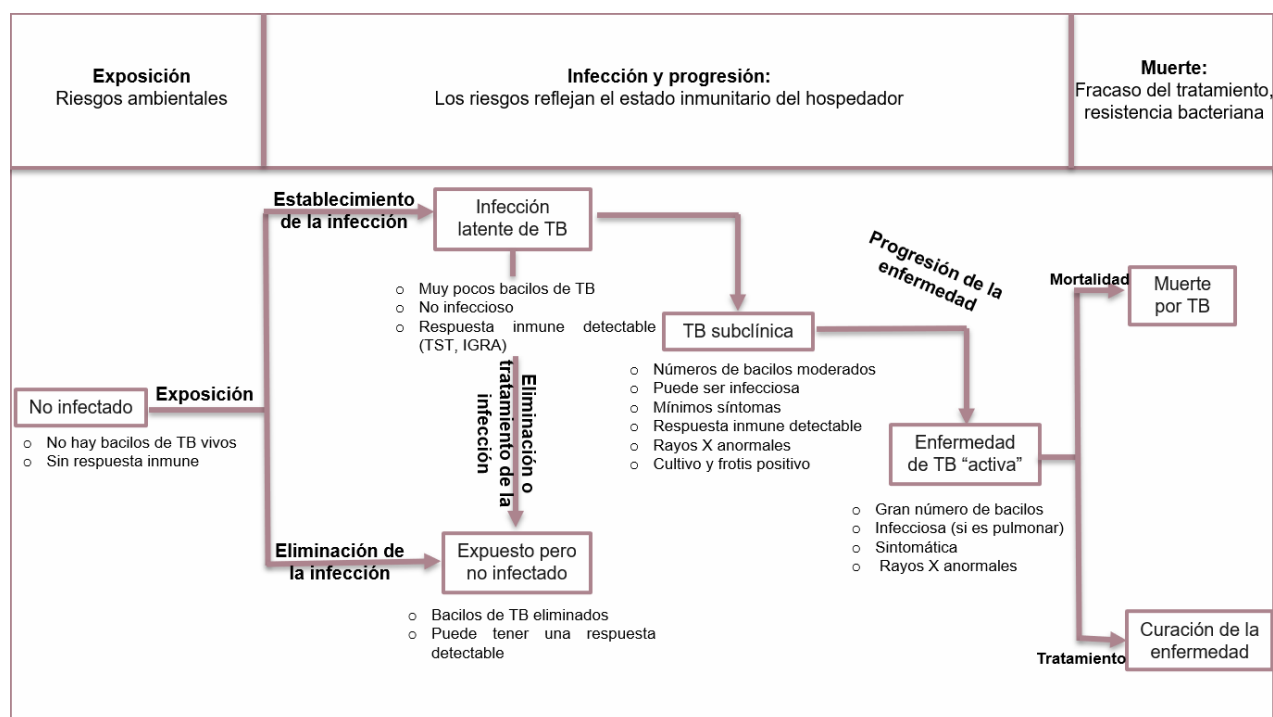


Figura 2. Espectro de la historia de la TB. Adaptado de Battista G. y cols., 2021 (5).

En función de la etapa del diagnóstico, se distinguen distintas formas de terapia contra TB (Figura 3): 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).

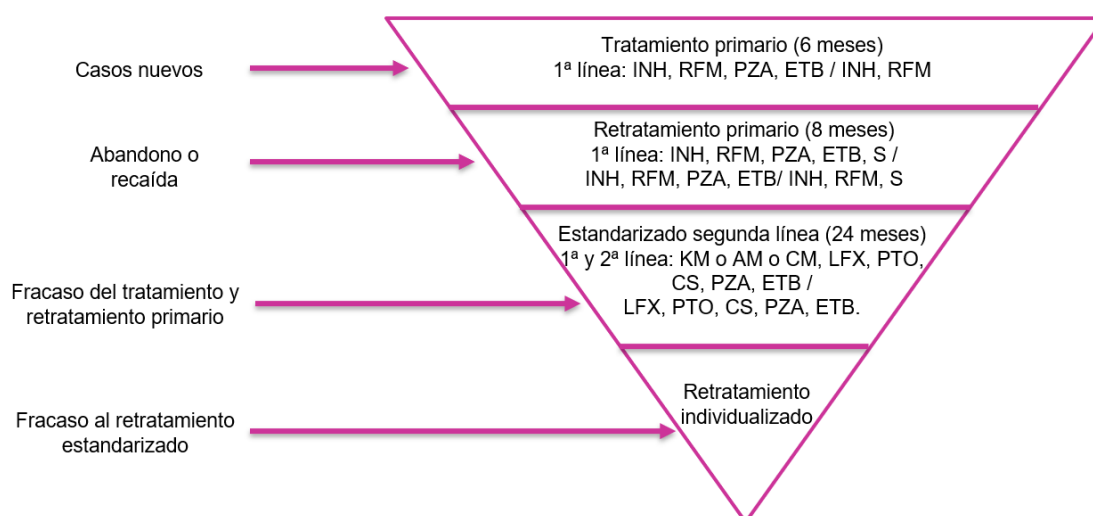


Figura 3. Pirámide de tratamiento para tuberculosis. Adaptado de Secretaría de Salud, 2013 (6).

INH: isoniacida; RIF: rifampicina; PZA: pirazinamida; ETB: etambutol; S: estreptomicina; KM: kanamicina; AM: amikacina; CM: capreomicina; LFX: levofloxacino; PTO: protionamida; CS: cicloserina.

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, la cual consta de isoniacida (INH), rifampicina (RFM), etambutol (ETB) y pirazinamida (PZA) por dos meses, seguida de la fase en sostén, en la cual se emplea de manera intermitente la INH y RFM durante cuatro meses (6). El régimen de tratamiento para la TB sensible 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 RFM e INH, 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 μ 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 RFM, ETB, INH y PZA y una fase de sostén (con efecto esterilizante) de cuatro meses con los fármacos INH y RFM (11).

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

2.1.1 Isoniacida.

La INH 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 (Figura 4). Las mutaciones en el gen KatG son de los principales mecanismos de resistencia a INH (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 (Cmax) 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 Cmax es inferior 3 µg/mL se recomienda un aumento de dosis (13,14). Es metabolizada en el hígado a acetil-isoniazida por la N-acetiltransferasa (NAT2), y después, acetil-isoniazida se hidroliza a acetilhidrazina que después de hidrolizarse genera compuestos hepatotóxicos por el citocromo P450E1; su principal vía de eliminación es la vía renal (15).

Hay diferentes factores que pueden afectar la variabilidad en las concentraciones de INH, 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 INH (18,19).

Las condiciones fisiopatológicas que se generan de un estado de desnutrición afectan la farmacocinética de INH; estos cambios incluyen el tiempo de vaciado gástrico, ya que esta condición disminuye las Cp de INH, 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 INH, ya que la tasa de acetilación y metabolismo de este fármaco cambia en función de la actividad de la enzima, dando lugar a acetilisoniacida que carece de actividad farmacológica y permite distinguir entre acetiladores lentos, intermedios o rápidos. Los acetiladores lentos de INH 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. En el Cuadro 1 se asignan los fenotipos probables según los diplotipos de los alelos de NAT2 (7).

Cuadro 1. Fenotipos de acetilación basados en los diplotipos de los alelos de NAT2 (7).

Fenotipo	Genotipo	Diplotipos
Acetilador rápido	NAT2 *4, *11, *12, *13, *18	*4/*4, *4/*12, *4/*13, etc.
Acetilador intermedio	1 alelo rápido de NAT2 y 1 alelo lento de NAT2	*4/*5, *4/*6, *5/*11, *7/*11, *13/*14, etc.
Acetilador lento	NAT2 *5, *6, *7, *14	*6/*6, *7/*7, *6/*7, *5/*6, *5/*7, etc.

Por lo anterior, es importante considerar el fenotipo acetilador con la finalidad de complementar la TDM de INH 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 Rifampicina.

La RFM es un antimicrobiano con actividad bactericida, el cual bloquea la transcripción inhibiendo la ARN polimerasa dependiente de ADN bacteriano (Figura 4). La resistencia a RFM 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 (arilacetamida desacetilasa) a 25-desacetil RFM 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 RFM y el tiempo en tratamiento (18).

Al igual que en INH, las variaciones en la biodisponibilidad se pueden deber a las diferencias entre los productos farmacéuticos, principalmente por la presencia de INH 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 C_{max} alcanzada, aumentando el riesgo de generar resistencia bacteriana (26). Si el paciente se encuentra en un estado de desnutrición, la farmacocinética de RFM se verá afectada, ya que dentro de los cambios fisiopatológicos, el tiempo de vaciado gástrico se retrasa provocando la disminución de las C_p (20,21).

Para la dosificación optimizada en RFM 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 RFM genera un estado de autoinducción metabólica, dando lugar a la disminución en la exposición de RFM con el tiempo; dicha autoinducción se ve completada a las dos semanas después de haber iniciado el tratamiento (28).

2.1.3 Pirazinamida

La PZA es un antimicrobiano con actividad bactericida y un profármaco que requiere la conversión a ácido pirazinoico por la enzima amidasa, la cual es codificada por el gen *pncA*. Su mecanismo de acción no se encuentra bien definido, pero la hipótesis es que acidifica el citoplasma celular de la bacteria (Figura 4) (29).

Se recomienda una dosis de 25 mg/kg diariamente por vía oral. Se une aproximadamente un 10% a proteínas; su V_d es de 0.75 a 1.65 L/kg y la t_{1/2} de 9 a 10 horas. La C_{max} >35 µg/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 µg/mL (30). Sufre metabolismo hepático por la enzima aldehído oxidasa, produciendo 5-hidroxi pirazinamida y se excreta por orina (31).

Como parte de los factores que afectan la farmacocinética de PZA, 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 Etambutol

El ETB 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 (Figura 4). Las mutaciones en el gen *embB* que codifica a la enzima arabinosil transferasa están relacionadas con la resistencia a ETB (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 µg/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 µg/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 ETB 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 Cp (20,21).

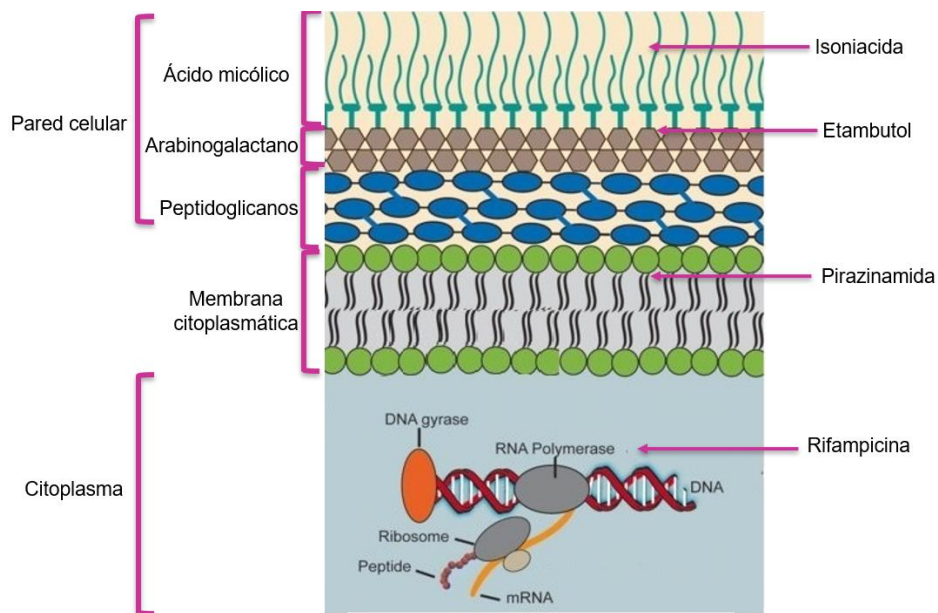


Figura 4. Mecanismo de acción de los fármacos antituberculosos de primera línea. Adaptado de Grotz E. y cols., 2018 (35).

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 Cp 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 (Figura 5) (36).

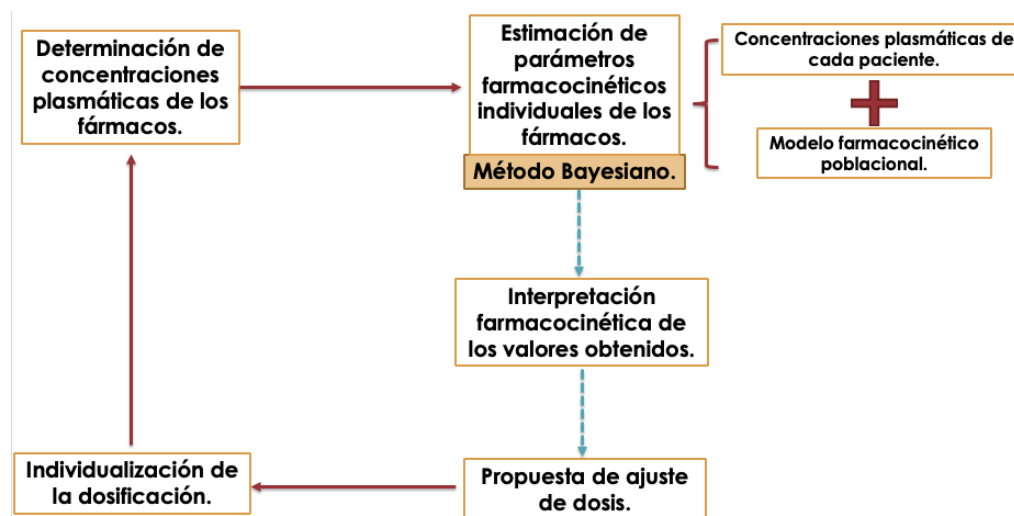


Figura 5. Proceso para la monitorización y posterior individualización de dosis a partir de la estimación Bayesiana de parámetros farmacocinéticos. Tomada de Jelliffe R. y cols., 2016 (36)

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 INH, RFM, PZA y ETB 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 INH 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 INH (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 µL) (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. En el Cuadro 2, se ejemplifican las comparaciones entre el método convencional por plasma y la alternativa de muestreo por DBS (45).

Cuadro 2. Comparación del método convencional por plasma y DBS como alternativa. Adaptado de Nys G. y cols., 2017 (45).

Aspectos a evaluar.	Plasma	DBS
Muestreo fácil.	Parcial	Parcial
Volumen de muestra bajo.	Parcial	Completamente
Posibilidad de transporte de muestras por temperatura ambiente.	Parcial	Completamente
Estabilidad de las muestras por almacenamiento a temperatura ambiente.	Parcial	Completamente
Preparación rápida de muestras.	Parcial	Completamente
Fácil preparación de muestras.	Completamente	Completamente

DBS: gotas de sangre seca.

4.0 Hipótesis.

La aplicación de un proceso de micromuestreo por DBS permitirá la cuantificación de las concentraciones de INH, RFM, PZA y ETB 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 INH, RFM, PZA y ETB 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 INH, RFM, PZA y ETB.
- Desarrollar y validar un método por UPLC-MS/MS para cuantificar simultáneamente los fármacos de INH, RMP, PZA y ETB a partir de DBS.
- Cuantificar INH, RFM, PZA y ETB 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 RFM e INH con el programa NONMEM v7.4.
- Determinar la correlación y concordancia entre las concentraciones obtenidas de INH, RFM, PZA y ETB 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 Corning® LSE.
- Centrífuga refrigerada Eppendorf 5804 R.
- Sonicator de la marca ultrasonic cleaner.
- Ultracongelador Thermo Scientific Forma 88000 series.

Reactivos.

- Estándares de referencia de la marca Supelco®:
INH (núm. CAS 54-85-3), pureza del 99.8%; RFM (núm. CAS 13292-46-1), pureza del 96.1%; ETB (núm. CAS 1070-11-7), pureza del 100% y PZA (núm. CAS 98-96-4), pureza del 99.96%.
- Agua HPLC de la marca TEDIA ®.
- Acetonitrilo LC Mass Spec de la marca TEDIA ®.
- Ácido fórmico de la marca EMSURE®.
- Metanol HPLC/Spectro de la marca TEDIA ®.
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega.
- Sondas TaqMan™:
C282T (rs 8684085_20), T341C (rs 1204093_20), C481T (rs 1204093_20), G590A (rs 1204091_20), A803G (rs 572769_20) y G857A (rs 572770_20).
- 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 a una concentración de 500 ng/mL. A partir de dichas infusiones, y con ayuda del implemento Intellistar, se establecieron y optimizaron los parámetros generales (voltaje del capilar, temperatura y flujo del gas de desolvatación) y específicas (ion molecular, fragmentos, voltaje del cono y energía de colisión) para llevar a cabo la identificación y cuantificación de INH, RFM, ETB y PZA (Cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros de operación y optimización.

Condiciones generales				
Voltaje del capilar				2.8 kV
Temperatura del gas de desolvatación				500°C
Flujo del gas de desolvatación				1000 L/h
Condiciones específicas				
Compuesto	Ion molecular m/z	Fragmento m/z	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (V)
INH	137.95	120.88*	30	12
		78.73		22
RFM	823.25	791.31*	36	16
		150.95		34
ETB	205.11	115.95*	30	30
		54.9		28
PZA	123.95	106.85*	28	10
		78.85		13

*Fragmentos utilizados para la cuantificación de los fármacos.

INH: isoniácida; RFM: rifampicina; ETB: etambutol; PZA: pirazinamida.

6.2 Estandarización de las condiciones cromatográficas.

6.2.1 Preparación de las soluciones patrón.

Las soluciones patrón de INH y ETB 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 RFM y PZA la concentración final fue de 1 mg/mL

y 5 mg/mL, respectivamente. INH, ETB y PZA se disolvieron en agua y RFM en acetonitrilo (ACN).

6.2.2 Preparación de la fase móvil.

En un matraz volumétrico de 200 mL se diluyeron 200 µL de ácido fórmico con agua desionizada para obtener una solución acuosa de ácido fórmico al 0.1%. Posteriormente, se filtró utilizando membranas de nylon de 0.2 µm Millipore® en un sistema de filtración al vacío.

6.2.3 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 Acquity UPLC® BEH (2.1 mm x 100 mm, 1.7 µm) y Acquity UPLC® HSS T3 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 µm). Se seleccionó la segunda columna debido a una mejor obtención en la forma de los picos de los cuatro fármacos antituberculosos. Se utilizó un sistema de bombeo en gradiente, evaluando diferentes proporciones de la composición de la fase móvil (ACN / ácido fórmico 0.1% en agua), además de determinar que 2 µL es el volumen de inyección adecuado con base a la señal analítica.

6.2.4 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 extracción líquido – líquido. Se preparó un estándar de concentraciones de 15 µg/mL para RFM, 10 µg/mL para ETB e INH y 40 µg/mL para PZA. El método de extracción requirió 100 µL del estándar o control a los cuales se les adicionó 100 µL de ACN, se agitó y posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos. Se transfirieron 160 µL del sobrenadante a un tubo eppendorf para volver a centrifugar a 14000 rpm por

10 minutos. Nuevamente se transfirió el sobrenadante (140 μ L) a otro tubo eppendorf y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. Finalmente, en los viales se colocaron 100 μ L del sobrenadante del estándar o control.

Al inyectarse un estándar procesado con el método de extracción anterior, se visualizó que los picos de los fármacos comenzaron a deformarse, por lo que se realizaron diluciones (1:1, 6:4, 8:2 y 1:10 estándar/agua) con la finalidad de mejorar la forma y simetría de los picos. Para estas pruebas se decidió ocupar un estándar de baja concentración para evaluar el índice señal/ruido a bajas concentraciones. Se seleccionó la dilución 1:9 estándar/agua con base en la forma de los picos obtenidos. El método de extracción final se muestra en la Figura 6. Además, se realizaron modificaciones en el gradiente para un mejor resultado (Figura 7).



Figura 6. Método de extracción de los fármacos antituberculosos a partir del plasma.

ACN: acetonitrilo.

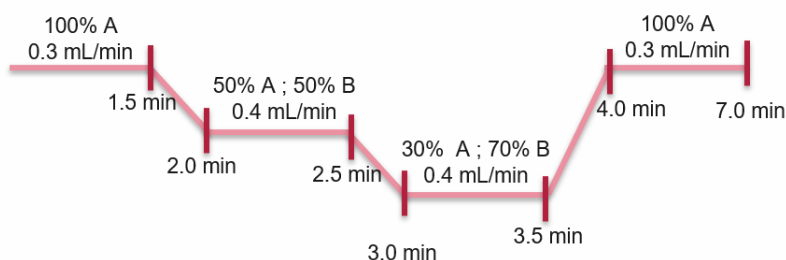


Figura 7. Gradiente utilizado para la elución de los fármacos antituberculosos en plasma.

A: Ácido fórmico 0.1% en agua; B: ACN.

6.2.5 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad en plasma.

Para preparar la curva de calibración y muestras control, en el Cuadro 4 se muestra el volumen requerido de cada fármaco para cada nivel de concentración en la curva de calibración y en las muestras control de calidad baja, media, alta y diluida (MCB, MCM, MCA y MCD).

Cuadro 4. Curva de calibración y muestras control de calidad.

Curva de calibración							
Estándar	µL de la mezcla (INH y ETB)	µL solución patrón de RFM	µL solución patrón de PZA	Concentraciones de los analitos (µg/ mL)			
				INH	ETB	RFM	PZA
1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	5
2	1	1	2	1	1	1	10
3	2	5	3	2	2	5	15
4	5	10	4	5	5	10	20
5	10	15	8	10	10	15	40
6	15	20	16	15	15	20	80
7	20	25	24	20		25	120
Muestras Control de Calidad							
MCB	0.8	0.8	1.6	0.8	0.8	0.8	8
MCM	8	8	10	8	8	8	50
MCA	12	18	20	12	12	18	100
MCD	30	40	40	30	30	40	200

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; MCD: muestra control diluida.

6.2.6 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.

6.2.7 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 de 40%. 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 un hematocrito de 40%.

6.2.8 Estandarización del método de extracción en DBS.

Se probaron diferentes métodos de extracción ejemplificados en las siguientes pruebas.

Se comenzó con un método de extracción líquido – líquido. Se preparó un estándar de concentraciones de 15 µg/mL para RFM, 10 µg/mL para ETB e INH y 40 µg/mL para PZA en sangre completa, se mezcló y posteriormente, se tomaron 25 µL del estándar para su colocación en las tarjetas Whatman 903 Protein Saber Card. Las tarjetas impregnadas con la sangre completa se dejaron secar por 1 hora, posterior a esto se perforaron las tarjetas (6.0 mm). Se probaron dos solventes de extracción (ACN y metanol) para extraer a los cuatro antituberculosos, así como una mezcla de solventes (50:50 ACN/metanol). Se agitó el contenido dentro del tubo eppendorf y posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm. Finalmente se tomaron 280 µL del sobrenadante y se colocó en un vial para su posterior análisis con un volumen de inyección de 2 µL. Para llevar a cabo la separación cromatográfica por DBS se emplearon las condiciones finales establecidas en la validación del método analítico para plasma. Debido a la señal obtenida de los cuatro fármacos, se optó por incrementar el volumen de inyección a 10 µL.

En vista de los resultados obtenidos, debido a una señal baja se optó por implementar un paso extra en el método de extracción el cual consistió en sonicar los estándares por 20 minutos a temperatura ambiente ($\sim 20^{\circ}\text{C}$).

Finalmente, para la extracción en DBS de los cuatro fármacos antituberculosos se decidió hacer pruebas con diferentes volúmenes de agua (con la finalidad de disolver la sangre).

En la Figura 8, se resumen el procesamiento final de las muestras DBS para la extracción de los fármacos antituberculosos, sin embargo, para mejorar la forma y simetría de los picos, y mantener los tiempos de retención entre inyecciones, se realizaron modificaciones al gradiente de elución establecido para muestras en plasma (Figura 9).

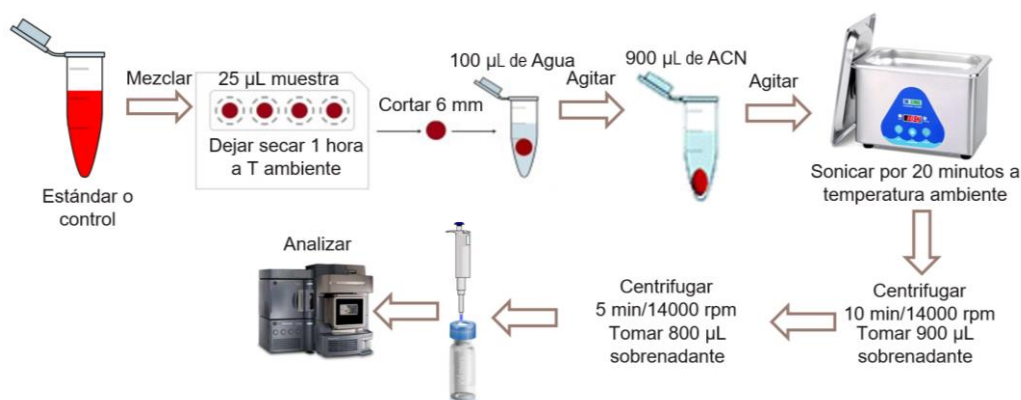


Figura 8. Método de extracción de fármacos antituberculosos en muestras de DBS.

ACN: acetonitrilo.

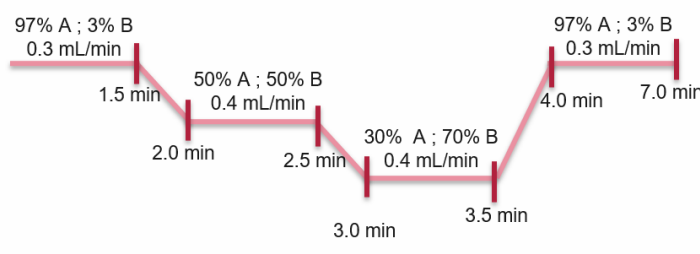


Figura 9. Gradiente.

A: Ácido fórmico 0.1% en agua; B: ACN.

6.2.9 Preparación de curva de calibración y controles de calidad en DBS.

La curva de calibración y controles de calidad se prepararon por dilución para obtener las concentraciones finales que se muestran en el Cuadro 5. Para la curva de calibración, se preparó el estándar de mayor concentración (estándar 7) en 500 μ L de sangre completa. Se tomaron 12 μ L del stock de RMF (1 mg/L) y de la mezcla de INH y ETB (1 mg/L) y 13 μ L del stock de PZA (5 mg/L). Posterior a esta preparación, se realizaron diluciones 1:1 hasta obtener el estándar de menor concentración.

Para los controles de calidad se preparó la MCA en 500 μ L de sangre completa. Se tomaron 10 μ L del stock de RMF (1 mg/L) y de PZA (5 mg/L) y 5 μ L del stock de la mezcla de INH y ETB (1 mg/L). Posterior a esta preparación, se realizaron las diluciones 1:1 hasta obtener la MCB. La MCD se preparó de forma independiente en 1 mL de sangre completa, tomando 20 μ L del stock de RFM, 15 μ L de la mezcla de INH y ETB y 40 μ L del stock de PZA (Cuadro 5).

Cuadro 5. Curva de calibración y muestras control de calidad en DBS.

Curva de calibración				
Estándar	Concentraciones de los analitos (µg/mL)			
	INH	EMB	RFM	PZA
1	0.375	0.375	0.375	2.03
2	0.75	0.75	0.75	4.06
3	1.5	1.5	1.5	8.1
4	3	3	3	16.3
5	6	6	6	32.5
6	12	12	12	65
7	24	24	24	130
Muestras Control de Calidad				
MCB	2.5	2.5	5	25
MCM	5	5	10	50
MCA	10	10	20	100
MCD	30	30	40	200

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; MCD: muestra control diluida.

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 RFM, ETB, INH y PZA 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 (r²).

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°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°C.

Estabilidad ciclos congelación – descongelación en plasma.

Se evaluó la estabilidad de los analitos en plasma, almacenadas a la temperatura de congelación (-80°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 (30%) y alto (45%). 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 con número de registro 67-21 (anexo I). También fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas con clave CEID2021-012-S (anexo II).

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 15 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 (anexo III).

Criterios de selección:

- **Inclusión:**
Pacientes de ambos sexos ≥ 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 INH, RFM, PZA y ETB 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 como anticoagulante (cuantificación de fármacos en plasma) y 4 mL de muestra sanguínea en tubo Vacoutainer con

EDTA (para llevar a cabo los estudios de genotipificación y hematocrito, solamente a las 2 horas postdosis).

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 a -80°C 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 de grosor de 21G y profundidad de 2 mm. Se tomaron 25 µL de sangre y se transfirieron y dejaron secar a temperatura ambiente a un papel filtro Whatman 903, 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, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G y G857A, 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 el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, utilizando 400 µL de sangre venosa periférica.

6.6.2 PCR en tiempo real.

En el Cuadro 6 se pueden observar los componentes y las cantidades empleadas para llevar a cabo la reacción de amplificación.

Cuadro 6. Componentes PCR en tiempo real.

Componente	Volumen
PCR TaqMan™ Master mix	3.0 µL
Sonda TaqMan™	0.3 µL
Agua libre de ADNasas	0.7 µL
ADN	2.0 µL
Volumen de reacción final	6.0 µL

En el Cuadro 7 se puede observar el programa de termociclado para efectuar la reacción de amplificación.

Cuadro 7. Programa de termociclado.

Activación enzimática	PCR (50 ciclos)	
Incubación	Desnaturalización	Extensión
95°C (10 minutos)	92°C (15 segundos)	60° C (90 segundos)

6.8 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.

Para la obtención de los parámetros farmacocinéticos individuales de INH y RFM se llevó a cabo la estimación bayesiana a través del programa farmacoestadístico NONMEM® v.7.3. Se crearon bases de datos con la información de cada paciente, tomando en cuenta las Cp determinadas a las 2 y 4 horas postdosis. Para INH 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 RFM 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 INH (3 – 6 $\mu\text{g/mL}$) y RFM (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 empleando el programa GraphPad® v 5.1.

Para el análisis de regresión lineal se determinó m y b , además del intervalo de confianza al 95%. Para medir la fuerza de relación entre ambas variables, se llevó a cabo el análisis de correlación, para lo cual se evaluó la distribución de las variables con la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk. Las variables con distribución normal fueron analizadas con las pruebas de Pearson y las de distribución no normal con la prueba de Spearman, considerando como significativo un valor de $P < 0.05$. En estos casos se calculó r^2 , lo que permite determinar el grado con que las concentraciones en DBS se relacionan con las concentraciones plasmáticas.

7.0 Resultados.

7.1 Validación de los métodos analíticos.

7.1.1 Selectividad.

En las Figuras 10 y 11, se muestran los cromatogramas de los blancos de matriz biológica específicos para cada analito en plasma y DBS, respectivamente y en las Figuras 12 y 13 los cromatogramas de cada fármaco a una concentración establecida para plasma y DBS, respectivamente.

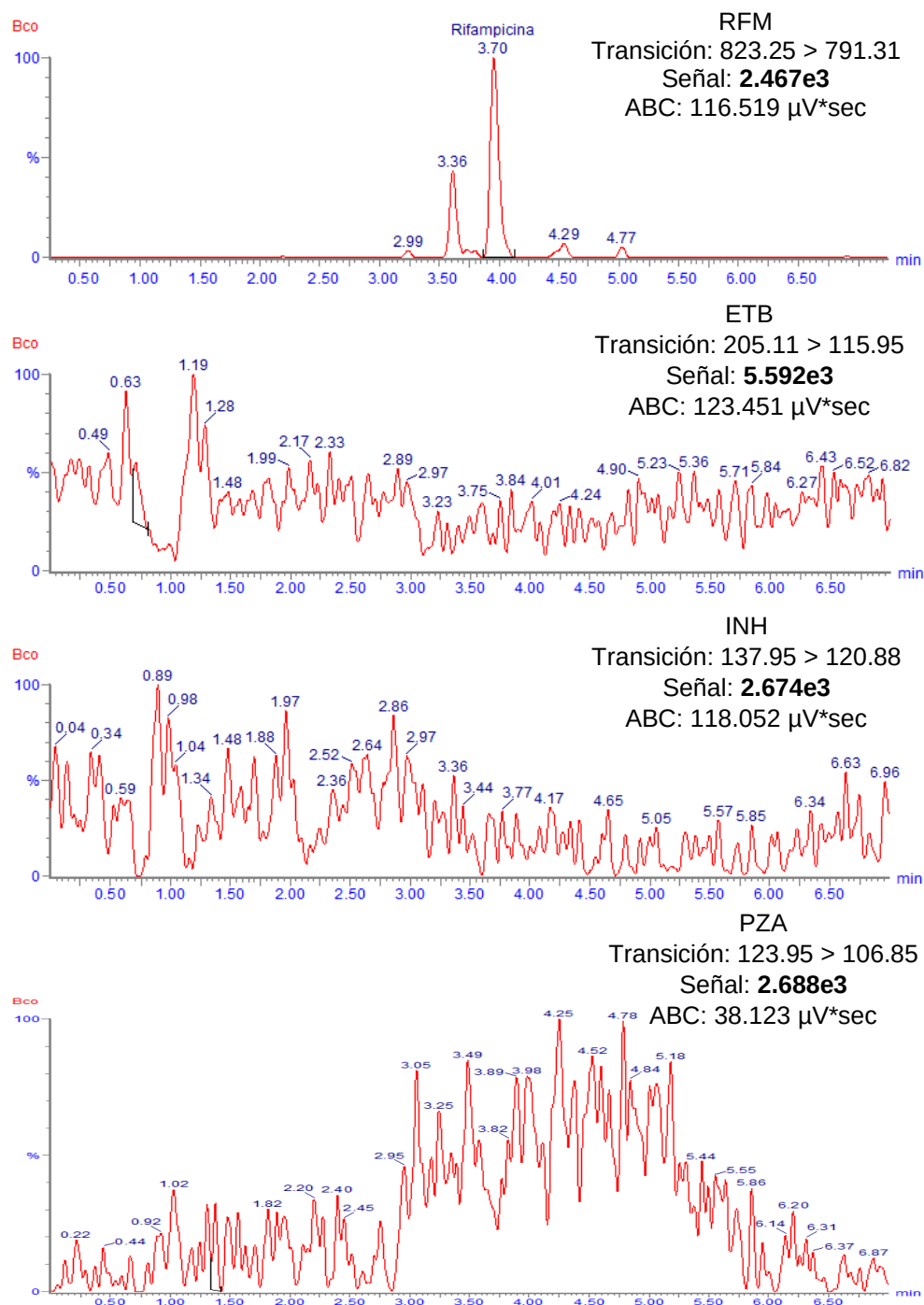


Figura 10. Cromatogramas de los blancos de matriz biológica en plasma.

ABC: Área Bajo la Curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

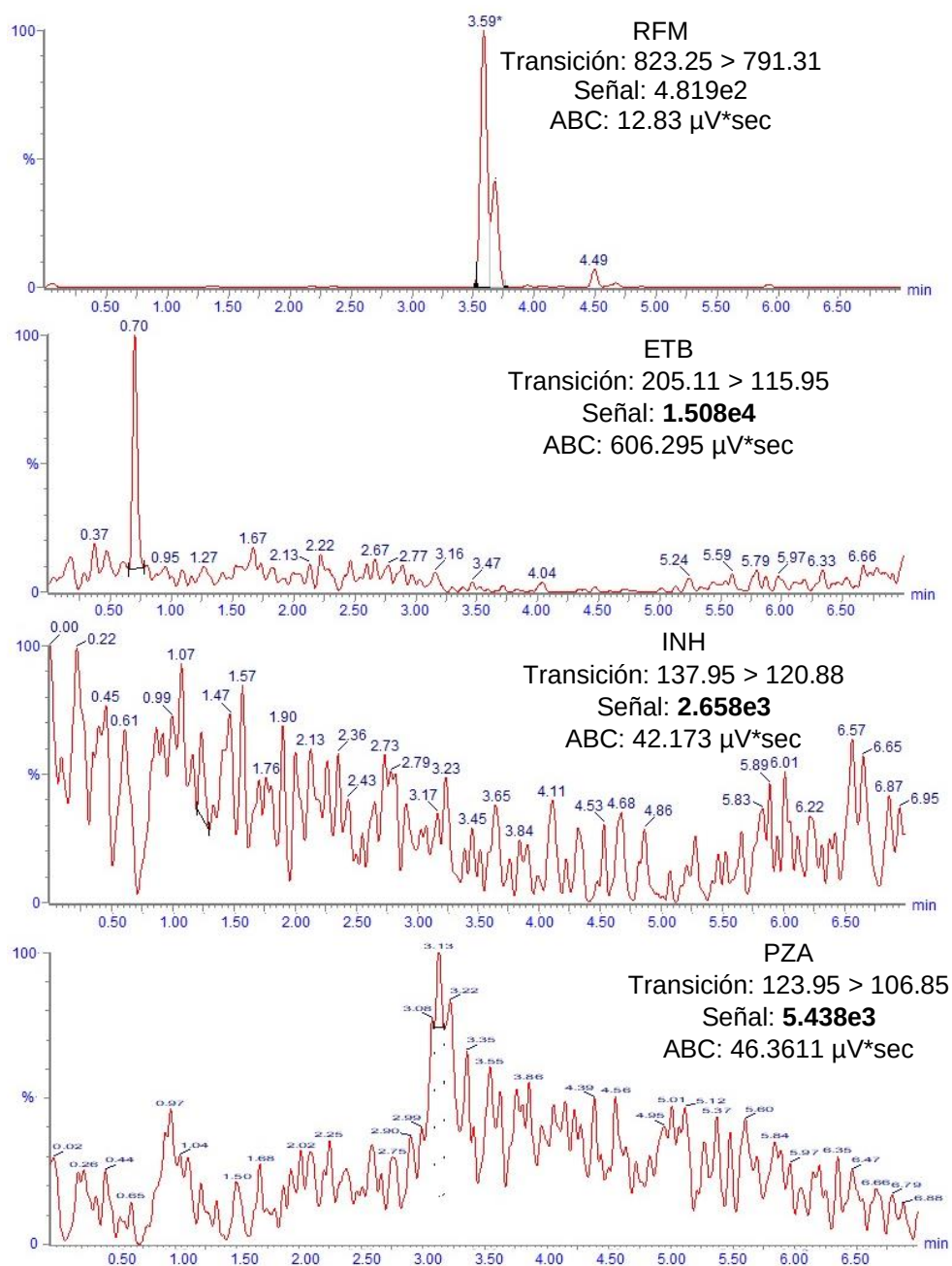


Figura 11. Cromatogramas de los blancos de matriz biológica en DBS.

ABC: Área bajo la curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

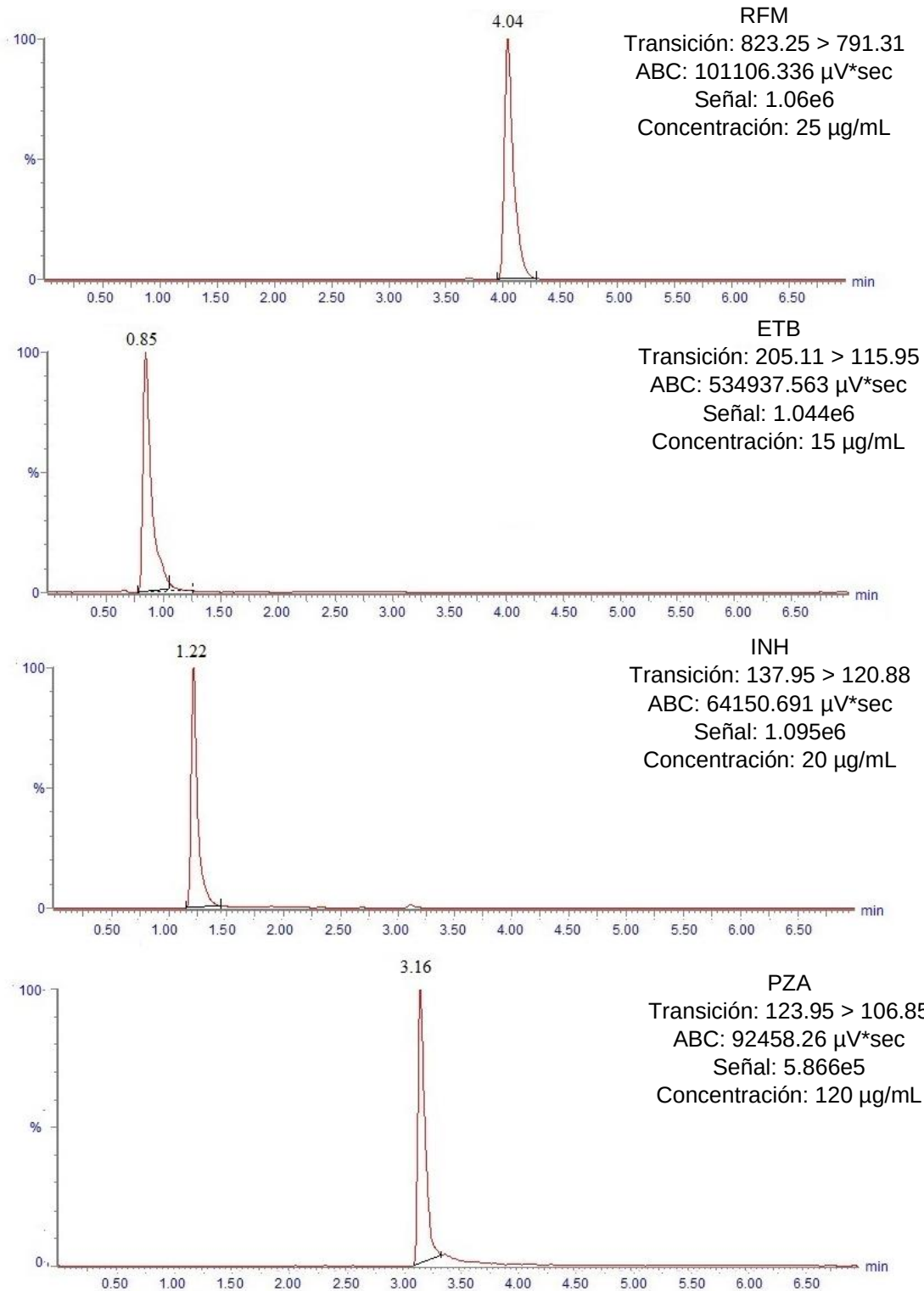


Figura 12. Cromatogramas de los analitos en plasma.

ABC: Área Bajo la Curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

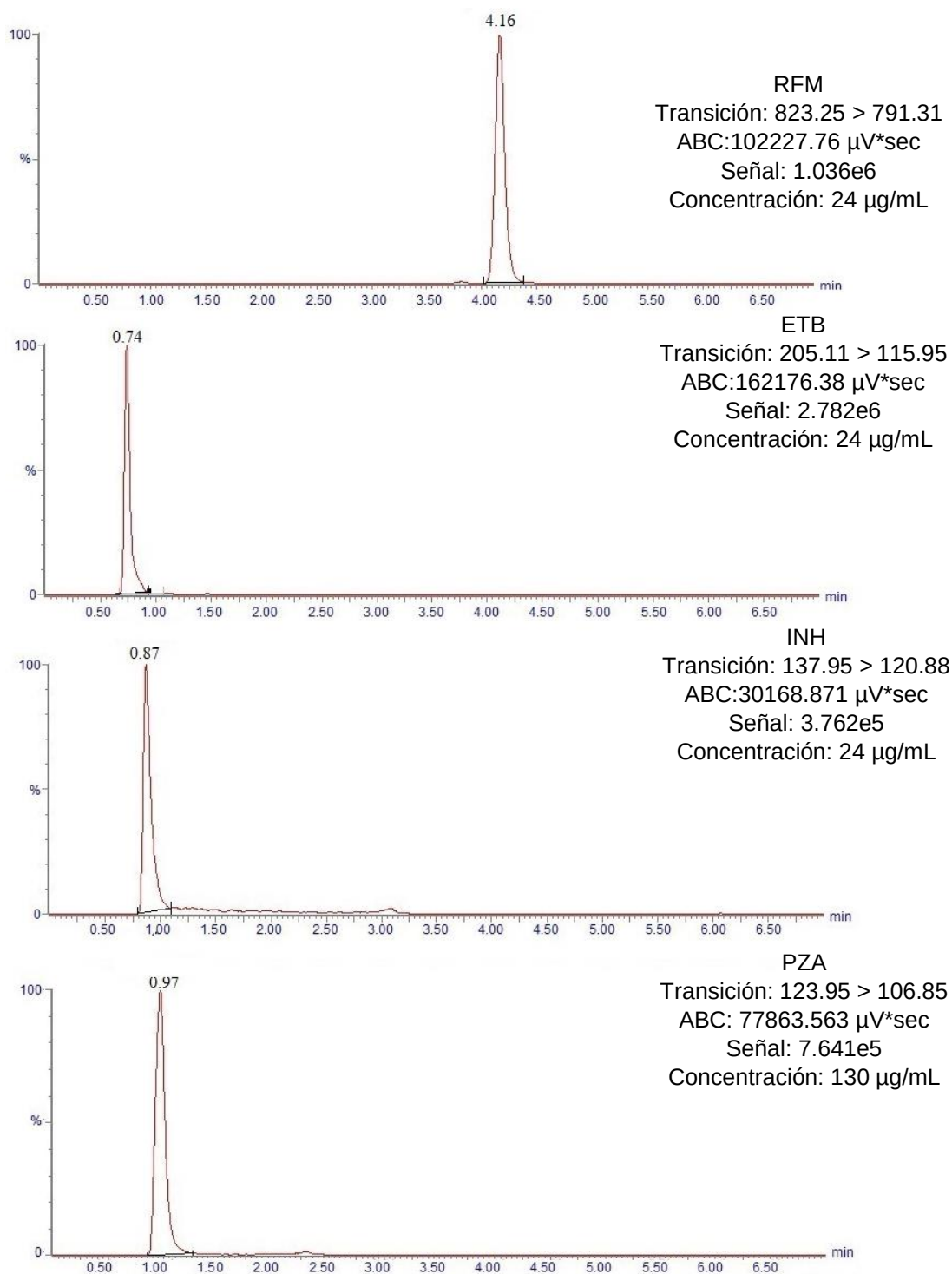


Figura 13. Cromatogramas de los analitos en DBS.

ABC: Área bajo la curva; INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

En el Cuadro 8 se muestra el ABC respectiva a cada blanco y 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. Adicionalmente, para plasma se evaluaron muestras blanco de plasma lipémico, de sangre venosa periférica hemolizada y con el uso de dos tipos de anticoagulante, heparina y EDTA.

Cuadro 8. Selectividad del método en muestras blanco.

Método	Muestra (n=6)		RFM	ETB	INH	PZA
Plasma	Matriz endógena	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	163.16	500.88	83.96	27.92
		ABC – LIC (%)	12.61	2.62	5.77	0.78
	Plasma lipémico	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	5.49	35.93	99.99	126.38
		ABC – LIC (%)	0.42	0.19	6.87	3.53
	Hemolizada	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	3.56	106.32	34.90	98.12
		ABC – LIC (%)	0.28	0.56	2.71	2.74
	Heparina	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	12.10	23.87	49.61	79.84
		ABC – LIC (%)	0.94	0.12	3.41	2.23
	EDTA	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	91.90	1500.96	181.03	208.80
		ABC – LIC (%)	7.10	7.84	12.44	5.83
DBS	Matriz endógena	ABC ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	36.68	402.14	42.98	127.71
		ABC – LIC (%)	2.86	10.61	5.49	8.28

En el cuadro se observan las medias de las ABC y el porcentaje del ABC con respecto al LIC.

ABC: Área Bajo la Curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; ABC - LIC: área bajo la curva con respecto al límite inferior de cuantificación; DBS: gotas de sangre seca.

7.1.2 Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.

En el Cuadro 9 se visualiza las medias de las respuestas analíticas obtenidas para cada muestra control, se calculó el FMN, DE y el porcentaje de CV, el cual no debe ser mayor al 15%.

Cuadro 9. Efecto matriz para métodos por espectrometría de masas.

Método	Fármaco	Muestra control	Media del ABC en matriz ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Media del ABC en solución ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	Media del FMN $\pm$ DE	CV (%)
Plasma	RFM	MCB	65040.81	43583.50	1.50 ± 0.17	10.99
		MCA	1655483.27	1490425.35	1.11 ± 0.04	3.80
	ETB	MCB	501135.57	360902.82	1.39 ± 0.12	8.31
		MCA	3832064.75	4055338.00	0.95 ± 0.08	8.27
	INH	MCB	45702.13	145674.54	0.31 ± 0.03	8.52
		MCA	689606.47	1616144.71	0.43 ± 0.04	10.45
	PZA	MCB	100076.36	95049.84	1.05 ± 0.05	4.56
		MCA	1012877.56	947563.65	1.07 ± 0.04	3.82
DBS	RFM	MCB	2545113.00	1943846.44	1.31 ± 0.06	4.46
		MCA	8930141.67	8014318.58	1.11 ± 0.03	2.56
	ETB	MCB	1189597.33	2281455.38	0.52 ± 0.02	3.17
		MCA	3480729.63	5545957.25	0.63 ± 0.03	4.08
	INH	MCB	385216.19	728880.89	0.52 ± 0.02	3.87
		MCA	1585826.67	2630416.54	0.60 ± 0.01	1.71
	PZA	MCB	887841.30	444342.13	2.00 ± 0.20	9.98
		MCA	2552540.25	1381827.60	1.85 ± 0.11	5.94

ABC: Área Bajo la Curva; NH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCA: muestra control alta; FMN: factor de matriz normalizado; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; DBS: gotas de sangre seca.

7.1.3 Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas.

En el Cuadro 10 se visualizan las respuestas analíticas próximas al tiempo de retención de las muestras blanco inyectadas para plasma y DBS. El porcentaje de ABC con respecto al LIC debe ser menor al 20%.

Cuadro 10. Efecto acarreo para métodos por espectrometría de masas en plasma.

RFM				
Inyección de muestra blanco	Plasma		DBS	
	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)
1	126.8	9.80	72.824	5.68
2	169.796	13.12	37.389	2.92
3	248.165	19.18	1.325	0.10
ETB				
Inyección de muestra blanco	Plasma		DBS	
	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)
1	123.45	0.65	86.47	2.28
2	220.85	1.15	555.79	14.67
3	959.66	5.01	326.77	8.62
INH				
Inyección de muestra blanco	Plasma		DBS	
	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)
1	201.138	4.40	34.499	3.86
2	118.052	8.11	52.490	6.70
3	64.063	4.40	30.215	3.86
PZA				
Inyección de muestra blanco	Plasma		DBS	
	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)	ABC (μV*sec)	ABC – LIC (%)
1	35.78	1.00	248.801	16.14
2	38.12	1.07	101.604	6.59
3	36.13	1.01	10.118	0.66

La primera muestra blanco se inyecta antes del estándar de concentración más alta y las segundas y terceras muestras son posteriores a la inyección del estándar de máxima concentración.

ABC: Área bajo la curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; ABC - LIC: área bajo la curva con respecto al límite inferior de cuantificación; DBS: gotas de sangre seca.

7.1.4 Límite de detección.

En el Cuadro 11, se muestran los LD para cada fármaco en plasma y DBS, calculados a partir de la señal promedio de 6 blancos de matriz biológica.

Cuadro 11. LD para los fármacos antituberculosos.

Método	RFM (µg/mL)	ETB (µg/mL)	INH (µg/mL)	PZA (µg/mL)
Plasma	0.04	0.05	0.07	0.04
DBS	0.04	0.02	0.12	0.64

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

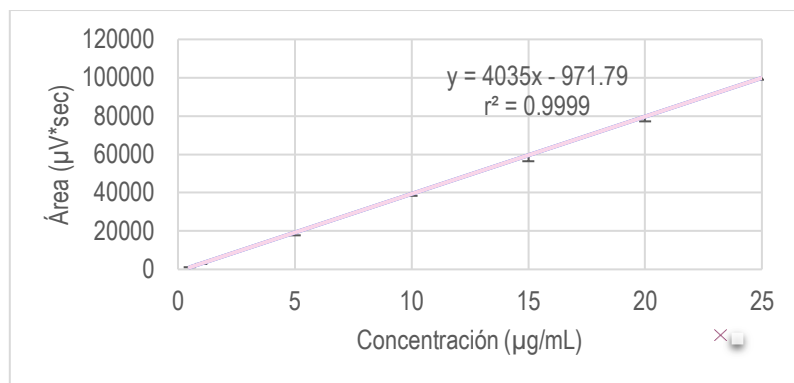
7.1.5 Linealidad.

En los Cuadros 12 y 13 se muestran la media del ABC, la DE y el porcentaje de recobro de cada estándar de la curva de calibración para plasma y DBS, respectivamente. Además, se presentan los datos de m, b, r y r^2 . En la Figura 14 y 15, se presentan las curvas de calibración en plasma y DBS respectivas a cada fármaco antituberculoso.

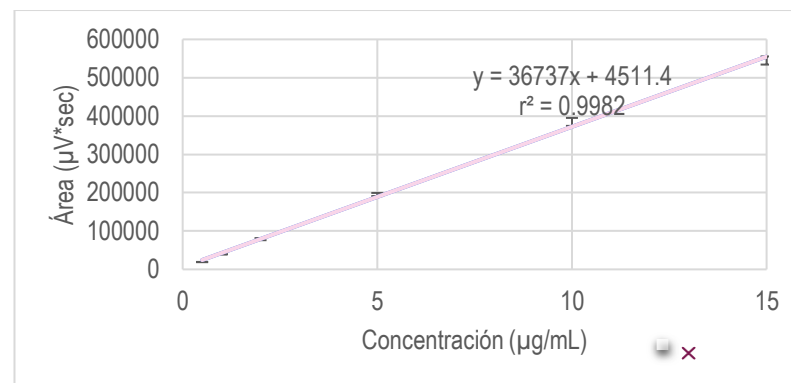
Cuadro 12. Linealidad en plasma.

RFM				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.5	1293.84	154.60	106.67	m = 4035
1	3004.35	155.20	96.67	
5	18942.63	1189.68	98.67	b = -971.79
10	39469.55	1089.63	100.33	
15	59712.25	3291.79	100.22	r = 0.9994
20	79248.11	2027.12	99.67	
25	100206.36	1235.12	100.40	r² = 0.9990
ETB				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.5	19137.48	318.33	100.00	m = 36737
1	39407.75	798.34	110.00	
2	78875.36	2762.60	105.00	b = 4511.4
5	195350.29	4097.51	104.00	
10	384763.10	10403.44	102.00	r = 0.9991
15	544881.81	10632.86	96.44	
INH				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.5	1455.40	142.06	100.00	m = 3265.2
1	3200.48	205.48	106.67	
2	6337.64	149.22	98.33	b = -164.72
5	15995.65	616.67	98.67	
10	32297.06	283.74	99.33	r = 0.9999
15	49459.54	532.21	101.33	
20	64788.81	1299.41	99.50	r² = 0.9998
PZA				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
5	3578.44	149.31	102.67	m = 780.3
10	7062.94	485.34	96.00	
15	11540.16	613.37	101.78	b = -305.86
20	14960.30	450.38	98.33	
40	31190.67	1806.75	100.92	r = 0.9998
80	63271.11	3157.18	101.67	
120	92542.74	561.72	98.89	r² = 0.9997

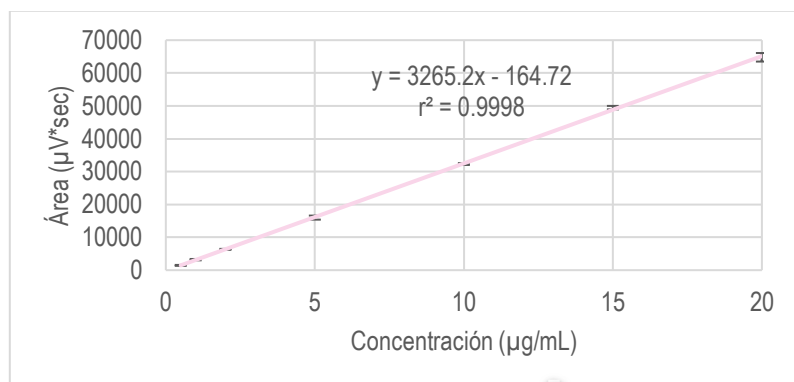
ABC: Área bajo la curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; m: pendiente; b: intersección con el eje Y; r: coeficiente de correlación; r²: coeficiente de determinación.



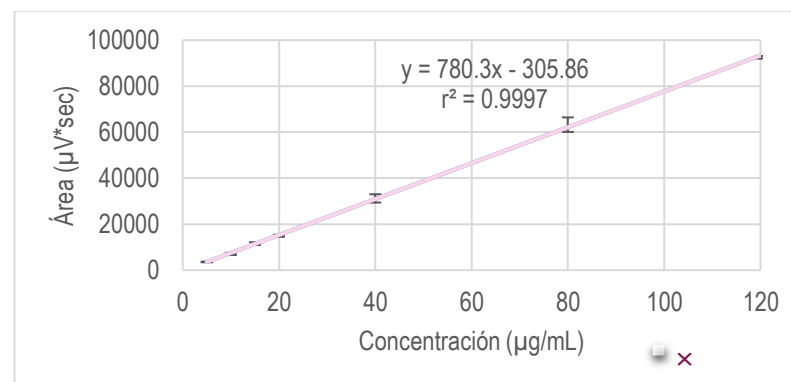
A) RFM



B) ETB



C) INH



D) PZA

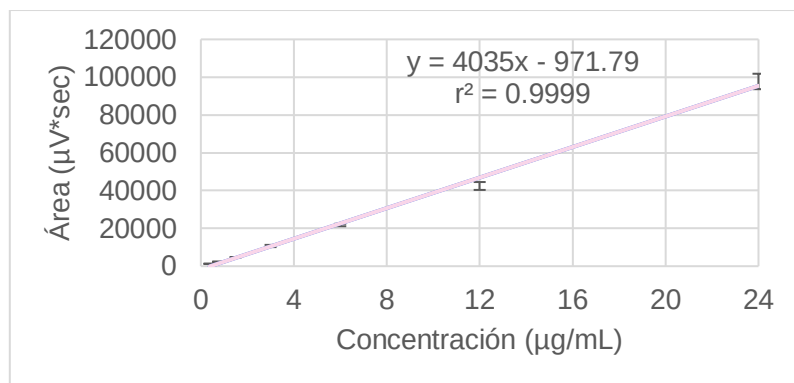
Figura 14. Curva de calibración en plasma.

INH: isoniácida; *ETB*: etambutol; *RFM*: rifampicina; *PZA*: pirazinamida.

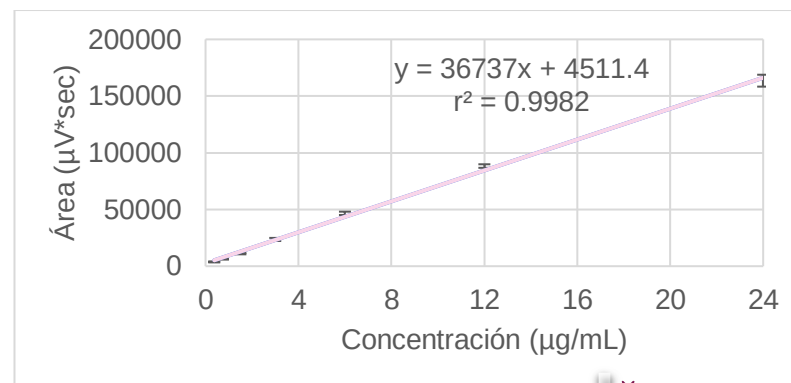
Cuadro 13. Linealidad en DBS.

RFM				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.375	1281.94	41.57	106.67	m = 4035 b = -971.79 r = 0.9999 r² = 0.9999
0.75	2256.22	236.14	88.89	
1.5	4758.72	103.54	88.89	
3	10684.76	579.21	95.56	
6	21789.77	656.11	96.11	
12	42433.10	2084.40	92.50	
24	97734.99	4084.61	105.83	
ETB				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.375	3789.38	450.90	97.78	m = 36737 b = 4511.4 r = 0.9991 r² = 0.9982
0.75	6107.76	268.43	97.78	
1.5	11120.05	665.64	93.33	
3	23585.16	1368.93	105.56	
6	46625.41	1451.14	107.78	
12	88295.94	1568.49	103.33	
24	163577.06	5243.91	96.25	
INH				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
0.375	783.07	25.17	97.78	m = 1159.4 b = 377.3 r = 0.9997 r² = 0.9995
0.75	1239.26	78.74	102.22	
1.5	2200.25	305.89	104.44	
3	3844.66	242.13	100.00	
6	7577.55	560.38	103.89	
12	13859.35	960.51	96.94	
24	28355.39	1600.22	100.56	
PZA				
Concentración del estándar (µg/mL)	Media del ABC (µV*sec)	DE (µV*sec)	Recobro (%)	Regresión lineal
2.03	1541.60	91.16	100.11	m = 589.96 b = 664.34 r = 0.996 r² = 0.9994
4.06	2560.03	115.09	91.07	
8.1	5357.52	226.54	103.79	
16.3	10385.11	491.64	103.38	
32.5	21294.46	179.73	107.69	
65	38384.49	2124.55	97.69	
130	77319.50	2877.14	98.85	

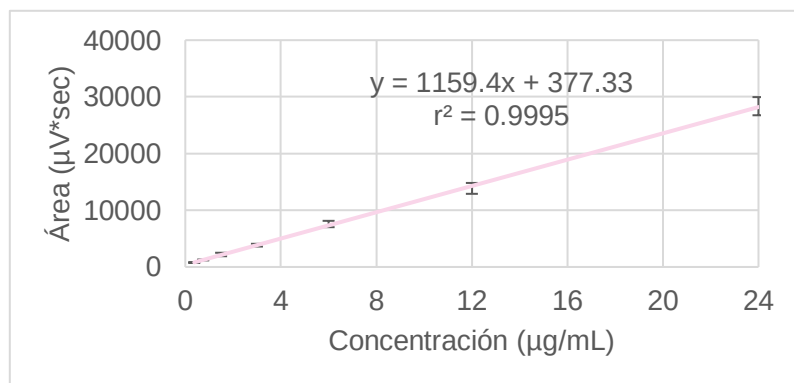
ABC: Área bajo la curva; INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; m: pendiente; b: intersección con el eje Y; r: coeficiente de correlación; r²: coeficiente de determinación.



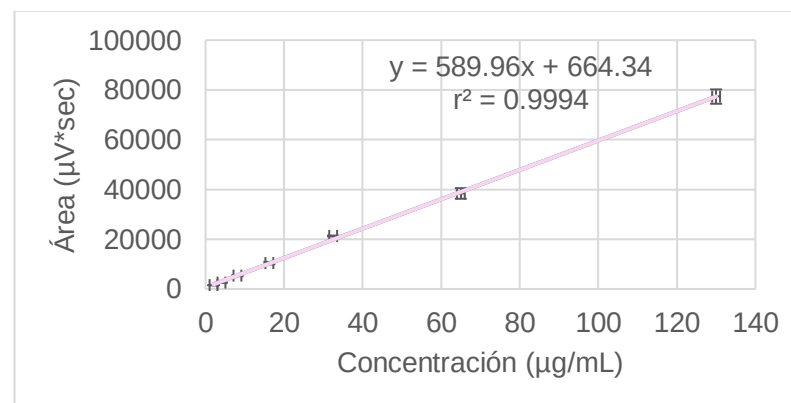
B) RFM



B) ETB



D) INH



D) PZA

Figura 15. Curva de calibración en DBS.

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida.

7.1.6 Precisión y exactitud.

Para plasma, en los Cuadros 14 y 15 se encuentran los datos de repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente. El porcentaje de CV para las muestras control debe ser $<15\%$ y para el LIC $<20\%$. Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de desviación, el cual debe encontrarse entre el $\pm 15\%$ con respecto al valor promedio de las concentraciones recuperadas para las MCB, MCM y MCA, mientras que para el LIC es del $\pm 20\%$. Los datos para DBS, se visualizan en los Cuadros 16 y 17.

Cuadro 14. Repetibilidad del método en plasma.

RFM				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.50 ± 0.07	14.14	0.00
MCB	0.8	0.76 ± 0.05	7.21	-5.00
MCM	8.0	8.78 ± 0.43	4.93	9.75
MCA	18.0	19.48 ± 0.39	2.00	8.22
MCD	40.0	22.98 ± 1.40	6.10	14.90
ETB				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.48 ± 0.04	9.32	-4.0
MCB	0.8	0.86 ± 0.05	6.37	7.5
MCM	8.0	8.18 ± 0.25	3.04	2.25
MCA	12.0	11.48 ± 0.41	3.61	-4.33
MCD	30.0	14.52 ± 0.25	1.71	-3.20
INH				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.5 ± 0.07	14.14	0.0
MCB	0.8	0.84 ± 0.05	6.52	5.0
MCM	8.0	8.06 ± 0.09	1.11	0.75
MCA	12.0	12.06 ± 0.23	1.91	0.50
MCD	30.0	16.22 ± 0.54	3.36	8.13
PZA				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	5.0	5.02 ± 0.25	4.96	0.4
MCB	8.0	8.42 ± 0.15	1.76	5.25
MCM	50.0	52.90 ± 1.31	2.48	5.8
MCA	100.0	98.74 ± 2.86	2.90	-1.26
MCD	200.0	101.24 ± 4.28	4.23	1.24

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; LIC: límite inferior de cuantificación; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; MCD: muestra control diluida; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Cuadro 15. Reproducibilidad del método en plasma.

RFM				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.54 ± 0.06	11.71	8.0
MCB	0.8	0.75 ± 0.05	6.92	-6.67
MCM	8.0	8.01 ± 0.67	8.33	0.17
MCA	18.0	18.61 ± 1.38	7.42	3.37
ETB				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.51 ± 0.06	11.72	1.13
MCB	0.8	0.75 ± 0.09	12.26	-6.67
MCM	8.0	7.49 ± 0.57	7.55	-6.42
MCA	12.0	10.72 ± 0.63	5.85	-10.67
INH				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.5	0.5 ± 0.04	7.56	0.00
MCB	0.8	0.79 ± 0.06	7.48	-0.83
MCM	8.0	8.27 ± 0.48	5.84	3.42
MCA	12.0	12.36 ± 0.53	4.30	3.00
PZA				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	5.0	5.01 ± 0.21	4.19	0.27
MCB	8.0	8.47 ± 0.45	5.31	5.83
MCM	50.0	52.68 ± 1.80	3.41	5.36
MCA	100.0	101.64 ± 3.03	2.98	1.64

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; LIC: límite inferior de cuantificación; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Cuadro 16. Repetibilidad del método en DBS.

RFM				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.42 ± 0.04	10.65	12.0
MCB	5	4.46 ± 0.35	7.8	-10.8
MCM	10	9.16 ± 0.30	3.33	-8.4
MCA	20	20.54 ± 1.19	5.78	2.70
MCD	15	22.84 ± 0.21	0.91	14.20
ETB				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.36 ± 0.05	15.21	-4.0
MCB	2.5	2.36 ± 0.05	2.32	-5.6
MCM	5	4.82 ± 0.11	2.27	-3.6
MCA	10	9.86 ± 0.19	1.98	-1.40
MCD	15	15.26 ± 0.61	4.03	1.73
INH				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.36 ± 0.05	15.21	-4.0
MCB	2.5	2.48 ± 0.20	8.26	-0.8
MCM	5	5.06 ± 0.36	7.21	1.2
MCA	10	8.84 ± 0.64	7.27	-11.6
MCD	15	15.18 ± 1.54	9.57	5.33
PZA				
Muestra control (n=5)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	2.031	1.98 ± 0.19	9.71	-2.51
MCB	25	24.80 ± 1.11	4.48	-0.8
MCM	50	48.18 ± 1.19	2.47	-3.64
MCA	100	100.80 ± 5.19	5.14	0.80
MCD	100	99.90 ± 4.28	4.29	-0.1

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; LIC: límite inferior de cuantificación; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; MCD: muestra control diluida; DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

Cuadro 17. Reproducibilidad del método en DBS.

RFM				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.42 ± 0.04	9.86	12.0
MCB	5	4.59 ± 0.46	9.95	-8.27
MCM	10	8.95 ± 0.78	8.74	-10.53
MCA	20	19.87 ± 1.51	7.58	-0.63
ETB				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.36 ± 0.05	14.09	-4.0
MCB	2.5	2.28 ± 0.16	7.07	-8.80
MCM	5	4.71 ± 0.29	6.10	-5.73
MCA	10	9.73 ± 0.85	8.72	-2.67
INH				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	0.375	0.39 ± 0.06	16.55	3.11
MCB	2.5	2.26 ± 0.22	9.58	-9.60
MCM	5	4.67 ± 0.51	11.01	-6.67
MCA	10	8.93 ± 0.47	5.24	-10.67
PZA				
Muestra control (n=15)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración ± DE (µg/mL)	CV (%)	Desviación (%)
LIC	2.031	2.04 ± 0.15	7.59	0.44
MCB	25	24.21 ± 1.13	4.66	-3.15
MCM	50	48.32 ± 1.74	3.61	-3.36
MCA	100	97.95 ± 4.80	4.91	-2.05

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; LIC: límite inferior de cuantificación; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; MCD: muestra control diluida; DE: desviación estándar; %CV: porcentaje de coeficiente de variación.

7.1.7 Estabilidad de las muestras en plasma y DBS.

Estabilidad a corto, mediano y largo plazo en plasma.

En el Cuadro 18 se muestra las estabildades a 20, 40 y 50 días, para plasma.

Cuadro 18. Estabilidad de los fármacos antituberculosos en muestras de plasma, conservadas a -80°C.

RFM							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		20 días	40 días	50 días	20 días	40 días	50 días
MCB	0.8	0.7	0.8	0.77	-12.50	0.0	-4.17
MCM	8.0	7.23	6.83	7.40	-9.58	-14.58	-7.50
MCA	18	18.20	17.67	18.53	1.1	-1.85	2.96
ETB							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		20 días	40 días	50 días	20 días	40 días	50 días
MCB	0.8	0.8	0.7	0.9	0.0	-12.5	11.11
MCM	8.0	8.33	7.27	8.03	4.17	-9.17	0.42
MCA	12	12.3	10.83	11.37	2.78	-9.72	-5.28
INH							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		20 días	40 días	50 días	20 días	40 días	50 días
MCB	0.8	0.7	0.69	0.87	-12.50	-13.33	8.33
MCM	8.0	7.57	8.03	7.10	-5.42	0.42	-11.25
MCA	12	11.97	12.13	11.17	-0.28	1.11	-6.94
PZA							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		20 días	40 días	50 días	20 días	40 días	50 días
MCB	5.0	4.41	0.7	7.67	-15.0	-12.50	-4.17
MCM	50.0	45.03	43.83	45.07	-9.93	-12.33	-9.87
MCA	100.0	96.53	91.97	92.80	-3.47	-8.03	-7.20

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta.

Estabilidad a corto, mediano plazo en DBS.

Se evaluó estabilidad con MCB, MCM y MCA por triplicado en dos formas de almacenamiento; a temperatura ambiente (~20°C) y en refrigeración (4 – 8°C) por 3 días (Cuadro 19) y por 6 días (Cuadro 20). El criterio de aceptación que se debe cumplir es del $\pm 15\%$ de desviación.

Cuadro 19. Estabilidad de los fármacos antituberculosos en muestras de DBS, conservadas en refrigeración y a temperatura ambiente por 3 días.

RFM					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	5.0	4.50	4.97	-10.0	-0.67
MCM	10.0	9.17	8.50	-8.33	-15.0
MCA	20.0	20.53	20.10	2.67	0.50
ETB					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	2.5	2.43	2.10	-2.67	-16.0
MCM	5.0	4.90	3.70	-2.0	-26.0
MCA	10.0	10.27	8.57	2.67	-14.33
INH					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	2.5	2.20	1.80	-12.00	-28.0
MCM	5.0	4.37	3.73	-12.67	-25.33
MCA	10.0	8.73	8.37	-12.67	-16.33
PZA					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	25.0	24.27	23.43	-2.93	-6.27
MCM	50.0	47.73	44.67	-4.53	-10.67
MCA	100.0	101.00	94.80	1.00	-5.20

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; TA: temperatura ambiental.

Cuadro 20. Estabilidad de los fármacos antituberculosos en muestras de DBS, conservadas en refrigeración y a temperatura ambiente por 6 días.

RFM					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	5.0	5.13	4.27	2.67	-14.67
MCM	10.0	9.70	8.53	-3.00	-14.67
MCA	20.0	19.83	18.80	-0.83	-6.0
ETB					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	2.5	2.00	1.63	-20.00	-34.67
MCM	5.0	4.30	3.23	-14.00	-35.33
MCA	10.0	8.03	6.63	-19.67	-36.37
INH					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	2.5	1.63	1.27	-34.67	-49.33
MCM	5.0	3.40	2.50	-32.00	-50.00
MCA	10.0	6.60	5.12	-34.00	-48.67
PZA					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Refrigeración	TA	Refrigeración	TA
MCB	25.0	23.87	22.77	-4.53	-8.93
MCM	50.0	49.70	47.83	-0.60	-4.33
MCA	100.0	94.30	95.63	-5.70	-4.37

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; TA: temperatura ambiental.

Las muestras para los cuatro fármacos fueron estables únicamente por 3 días en refrigeración, ya que para ETB e INH, las muestras control en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente sufrieron una degradación de estos fármacos, la cual incrementó con el paso del tiempo.

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°C (Cuadro 21). El criterio de aceptación que se debe cumplir es del $\pm 15\%$ de desviación.

Cuadro 21. Estabilidad en el automuestreador a 24 horas de los fármacos antituberculosos en muestras plasmáticas y DBS.

RFM						
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)		Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
	Plasma	DBS	Plasma	DBS	Plasma	DBS
MCB	0.8	5.0	0.77	5.13	-4.17	2.67
MCM	8.0	10.0	8.53	9.50	6.67	-5.00
MCA	18	20.0	18.23	20.20	1.30	1.00
ETB						
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)		Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
	Plasma	DBS	Plasma	DBS	Plasma	DBS
MCB	0.8	2.5	0.87	2.53	8.33	1.33
MCM	8.0	5.0	7.57	5.40	-5.42	8.00
MCA	12	10.0	11.17	10.73	-6.94	7.33
INH						
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)		Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
	Plasma	DBS	Plasma	DBS	Plasma	DBS
MCB	0.8	2.5	0.7	2.60	-12.50	4.00
MCM	8.0	5.0	7.30	4.90	-8.57	-2.00
MCA	12	10.0	11.27	9.23	-6.11	-7.67
PZA						
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)		Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
	Plasma	DBS	Plasma	DBS	Plasma	DBS
MCB	5.0	25.0	7.00	26.77	-12.00	7.07
MCM	50.0	50.0	44.90	53.50	-10.20	7.00
MCA	100.0	100.0	89.93	102.83	-10.07	2.83

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; TA: temperatura ambiental.

Estabilidad ciclos congelación – descongelación en plasma.

En el Cuadro 22 se muestran los resultados de concentración recuperada de cada muestra control empleado en plasma, para estabilidad a 1, 2 y 3 ciclos congelación-descongelación, también se muestra la media y porcentaje de desviación, el cual debe encontrar en $\pm 15\%$.

Cuadro 22. Estabilidad ciclos congelación – descongelación.

RFM							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		1°	2°	3°	1°	2°	3°
MCB	0.8	0.7	0.77	0.77	-12.50	-4.17	-4.17
MCM	8.0	7.43	7.43	7.43	-7.08	-7.08	-7.08
MCA	18	19.27	19.30	18.97	7.04	7.22	5.37
ETB							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		1°	2°	3°	1°	2°	3°
MCB	0.8	0.90	0.83	0.83	12.50	6.93	4.17
MCM	8.0	8.0	8.30	8.03	0.0	3.75	0.42
MCA	12	12.60	12.17	11.47	5.00	1.90	-4.44
INH							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		1°	2°	3°	1°	2°	3°
MCB	0.8	0.8	0.77	0.67	0.00	-4.17	-16.67
MCM	8.0	7.17	6.60	6.23	-10.42	-17.50	-22.08
MCA	12	11.20	10.47	10.17	-6.67	-12.78	-15.28
PZA							
Muestra control	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)			Desviación (%)		
		1°	2°	3°	1°	2°	3°
MCB	5.0	8.77	8.77	8.60	9.58	9.58	7.50
MCM	50.0	50.07	47.63	49.43	0.13	-4.73	-1.13
MCA	100.0	103.63	103.63	96.33	3.63	3.63	-3.67

INH: isoniacida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta.

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 (30%) y alto (45%). El criterio de aceptación que se debe cumplir es del $\pm 15\%$ de desviación (Cuadro 23).

Cuadro 23. Evaluación del nivel de hematocrito para la cuantificación de fármacos antituberculosos en muestras de DBS.

RFM					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		30%	45%	30%	45%
MCB	5.0	4.47	4.50	-10.67	-10.0
MCM	10.0	9.33	9.80	-6.67	-2.0
MCA	20.0	19.23	22.07	-3.83	10.33
ETB					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Hto 30%	Hto 45%	Hto 30%	Hto 45%
MCB	2.0	2.60	2.67	4.00	6.67
MCM	5.0	5.17	5.53	3.33	10.67
MCA	10.0	10.77	10.47	7.67	4.67
INH					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Hto 30%	Hto 45%	Hto 30%	Hto 45%
MCB	2.0	2.13	2.13	-14.67	-14.67
MCM	5.0	4.27	4.37	-14.67	-12.67
MCA	10.0	8.53	8.80	-14.67	-12.0
PZA					
Muestra control (n=3)	Concentración (µg/mL)	Media de la concentración recuperada (µg/mL)		Desviación (%)	
		Hto 30%	Hto 45%	Hto 30%	Hto 45%
MCB	25.0	23.63	25.03	-5.47	0.13
MCM	50.0	48.67	52.73	-2.67	5.47
MCA	100.0	98.67	99.20	-1.33	-0.80

INH: isoniácida; ETB: etambutol; RFM: rifampicina; PZA: pirazinamida; MCB: muestra control baja; MCM: muestra control media; MCA: muestra control alta; Hto: hematocrito.

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. En el Cuadro 24 se muestran las características antropométricas y clínicas, además de las distribuciones fenotípicas de NAT 2 y la dosis de los pacientes con TB incluidos en el estudio.

Cuadro 24. Características antropométricas, genéticas y clínicas de los pacientes con TB incluidos en el estudio.

Variable	Pacientes con TB	
Sexo (n)	Mujer	8
	Hombre	7
Edad (años)	46 ± 17	
Peso (kg)	55.58 ± 10.23	
Estatura (m)	1.59 ± 0.08	
IMC (%)	≤ 18.5 (kg/m ²)	20
	18.6 - 24.9 (kg/m ²)	53
	≥ 25 (kg/m ²)	27
Hematocrito (%)	40.67 ± 4.44	
Tipo de TB (n)	Pulmonar	2
	Meníngea	1
	Cerebral	1
	Ganglionar	3
	Intestinal	2
	Diseminada	4
	Peritoneal	1
	Vertebral	1
Fenotipo acetilador (n)	Rápido	5
	Intermedio	5
	Lento	5
Dosis (mg)	RFM	600 (450 – 600)
	ETB	1200 (600 – 1200)
	INH	300 (150 – 500)
	PZA	1600 (800 – 1600)

Los resultados se muestran como media ± DE o mediana (rango), con base en la distribución de los datos. IMC: índice de masa corporal; RFM: rifampicina; ETB: etambutol; INH, isoniacida; PZA: pirazinamida.

En la Figura 16, se observan las concentraciones plasmáticas de RFM, ETB, INH y PZA a las 2 y 4 horas postdosis.

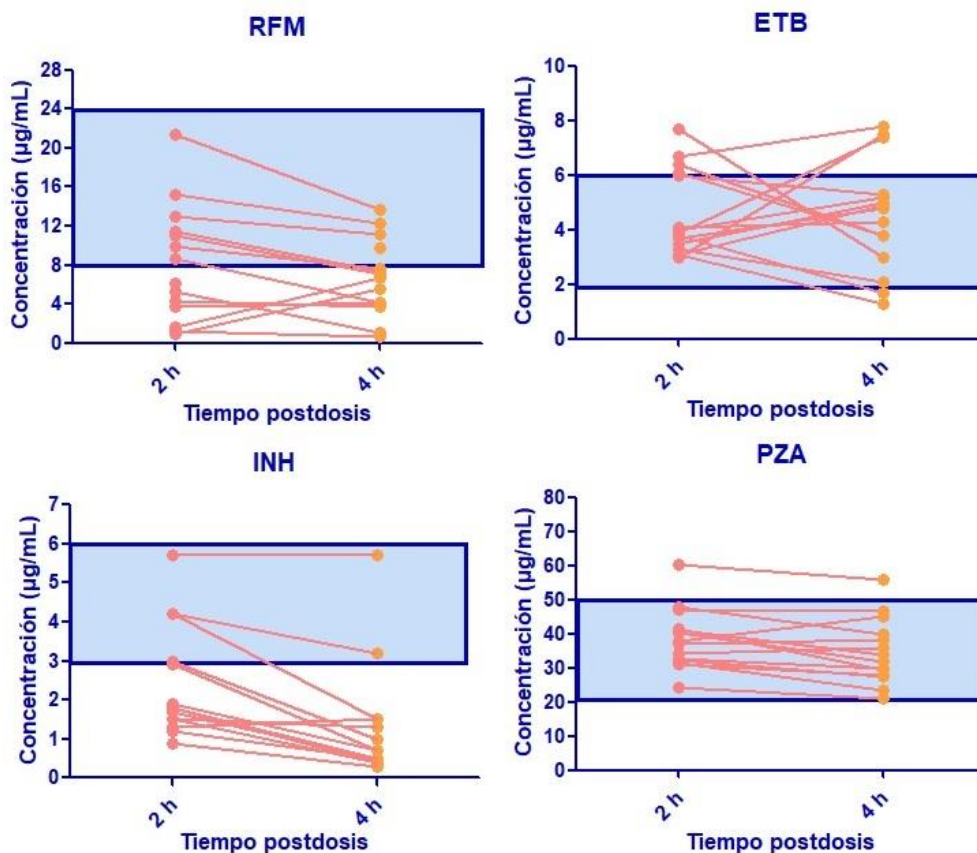


Figura 16. Concentraciones plasmáticas 2 y 4 horas postdosis de los fármacos de primera línea administrados por vía oral en pacientes con TB.

INH: Isoniacida; RFM: Rifampicina; ETB: Etambutol; PZA: Pirazinamida. El área sombreada corresponde al intervalo terapéutico de cada fármaco; 8 – 24 µg/mL para rifampicina, 2 – 6 µg/mL para etambutol, 3 – 6 µg/mL para isoniacida y 20 – 50 µg/mL para pirazinamida.

Para determinar las C_p de los cuatro fármacos antituberculosos es necesario realizar la cuantificación a las 2 y 4 horas postdosis, ya que se ha establecido que en estos tiempos es posible caracterizar la C_{max} de cada fármaco, por ello, al menos una concentración debe encontrarse dentro del intervalo terapéutico para obtener una respuesta favorable en el tratamiento (50).

En el caso de RFM, el 57% de los pacientes presentaban al menos una Cp dentro del intervalo. El 43% de restante, tenían las dos concentraciones por debajo del intervalo terapéutico.

Para ETB y PZA, el 93% de los pacientes presentaron al menos una concentración dentro del intervalo terapéutico. El 7% de los pacientes presentaron las dos concentraciones por encima del intervalo terapéutico.

Para INH el 27% de los pacientes presentaban una concentración dentro del intervalo terapéutico y el 73% de los pacientes restantes tenían las dos concentraciones por debajo del intervalo terapéutico.

En la Figura 17, se presentan las concentraciones en DBS a las 2 y 4 horas postdosis. Los rangos de las concentraciones fueron desde 0.4 – 12.4 µg/mL para RFM, 2.7 – 12.1 µg/mL para ETB, 0.3 – 3.7 µg/mL para INH y de 18.8 – 46.2 µg/mL para PZA.

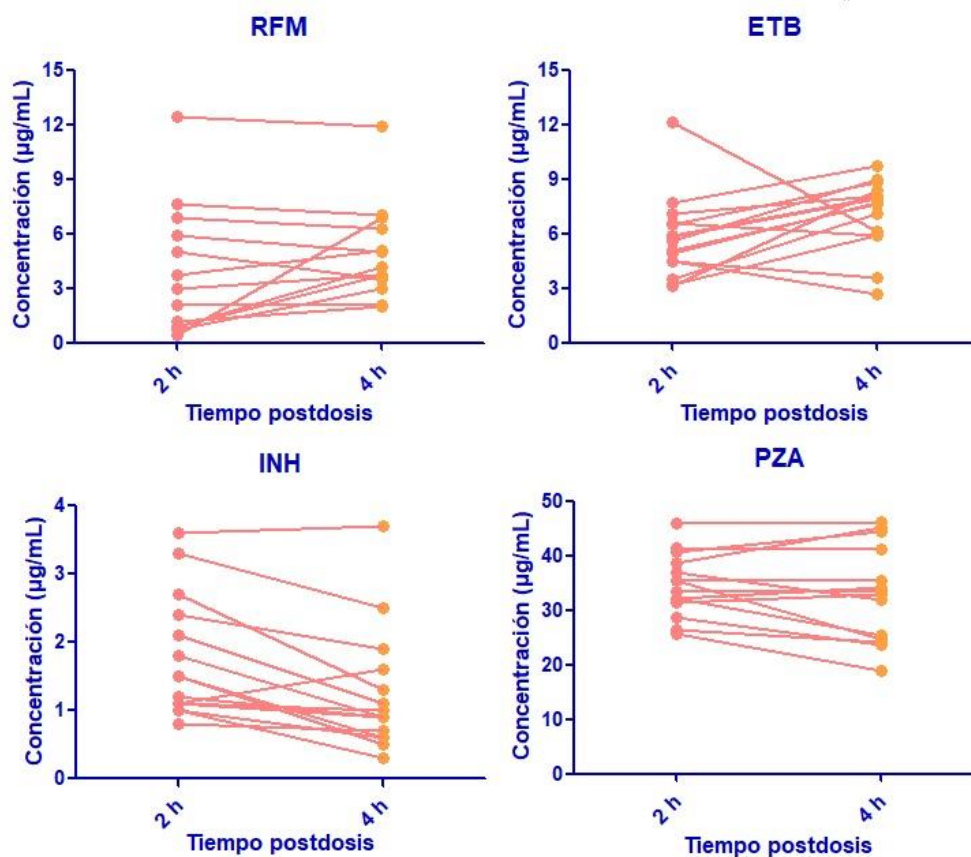


Figura 17. Concentraciones en DBS, 2 y 4 horas postdosis de los fármacos de primera línea administrados por vía oral en pacientes con TB.

INH: Isoniacida; RFM: Rifampicina; ETB: Etambutol; PZA: Pirazinamida.

Al realizar la comparación de las concentraciones en DBS con el intervalo terapéutico reportado en plasma se observa que:

En el caso de INH, el porcentaje de pacientes que presentaron al menos una concentración dentro del intervalo terapéutico disminuyó hasta un 87% en comparación con las concentraciones plasmáticas.

Para RFM, el 7% los pacientes presentaron al menos una concentración dentro del intervalo y se aumentó al 93% los pacientes que presentaron ambas concentraciones por debajo del intervalo en comparación con plasma.

Para ETB, el 73% de los pacientes presentaron al menos una concentración dentro del intervalo terapéutico.

En el caso de PZA, el 100% de los pacientes que presentaron ambas concentraciones dentro del intervalo terapéutico.

7.3 Estimación bayesiana y ajuste de dosis.

En el Cuadro 25, se observan los parámetros farmacocinéticos estimados obtenidos para los 15 pacientes con TB por el método bayesiano con el software NONMEM.

Cuadro 25. Parámetros farmacocinéticos para RFM e INH estimados.

RFM		INH	
C_{max} (µg/mL)	9.82 ± 4.3	C_{max} (µg/mL)	5.38 (4.14 – 8.6)
T_{max} (h)	4.04 ± 2.52	T_{max} (h)	0.75 ± 0.25
K_a (h⁻¹)	1.18 (0.16 – 3.35)	K_a (h⁻¹)	2.49 ± 0.62
CL (L/h)	8.75 ± 8.55	CL_R (L/h)	31.36 ± 8.08
		CL_I (L/h)	24.54 ± 9.89
		CL_L (L/h)	21 ± 8.07
V_d (L)	40.10 (17.80 – 52.60)	V_C (L)	32 (19.50 – 45.20)
		V_P (L)	4.68 ± 2.02

Los datos se muestran como media ± desviación estándar o mediana (rango) de acuerdo a la distribución de los datos. C_{max}: Concentración máxima; T_{max}: tiempo de C_{max}; K_a: constante de absorción; CL_R: aclaramiento de acetiladores rápidos; CL_I: aclaramiento de acetiladores intermedios; CL_L: aclaramiento de acetiladores lentos; V_d: volumen de distribución; V_C: volumen central; V_P: volumen periférico.

El ajuste de dosis se llevó a cabo mediante la estimación de las C_p predichas con la nueva dosis, empleando los parámetros farmacocinéticos ajustados por el método bayesiano. En el Cuadro 26, se muestran los datos de los pacientes que se encontraron dentro y por debajo del intervalo terapéutico para INH y RFM. El 13% de los pacientes presentaban concentraciones de RFM e INH dentro del intervalo terapéutico, por ello, se recomendó al médico continuar con la misma dosis hasta el término de la fase intensiva. El 33% presentaban concentraciones de RFM e INH por debajo del intervalo terapéutico. Para estos pacientes la recomendación al médico fue de aumentar la dosis (150 mg para

RFM y 75 mg para INH). El 47% presentaba concentraciones de RFM dentro del intervalo terapéutico, pero concentraciones de INH por debajo del intervalo, por lo tanto, se les realizó la recomendación de aumentar la dosis de INH. Finalmente, el 7% presentó concentraciones de RFM por debajo del intervalo terapéutico, pero para INH las concentraciones se encontraban en intervalo, debido a la dosis que se le estaba administrando, en la recomendación se mencionaba la disminución de dosis de INH, con el subsecuente aumento en la dosis de RFM.

Cuadro 26. Cp de INH y RFM de pacientes con TB en fase intensiva.

Fármaco	Concentraciones (µg/mL)	Pacientes con Cp dentro del intervalo	Pacientes con Cp debajo del intervalo terapéutico.
INH	1.4 (0.3 – 5.7)	3 (20%)	12 (80%)
RFM	6.90 (3.88 – 21.4)	10 (67%)	5 (33%)

Los datos se muestran como *mediana (rango) o n (porcentaje)*.
INH: isoniacida; RFM: rifampicina; Cp: concentraciones plasmáticas.

7.4 Correlación de las concentraciones plasmáticas y en DBS.

En la Figura 18, se pueden observar los gráficos correspondientes a cada fármaco, se grafican las concentraciones en DBS vs concentraciones plasmáticas. Los cuatro análisis de correlación presentaron un valor de $P < 0.0001$, indicativo que r es significativamente distinta de cero y existe una correlación positiva entre las concentraciones en DBS con respecto a las concentraciones plasmáticas; el valor de r^2 fue de 0.6961, 0.4369, 0.8675 y 0.7363 para RFM, ETB, INH y PZA, respectivamente, lo cual señala que las concentraciones de las DBS están asociada a las concentraciones plasmáticas.

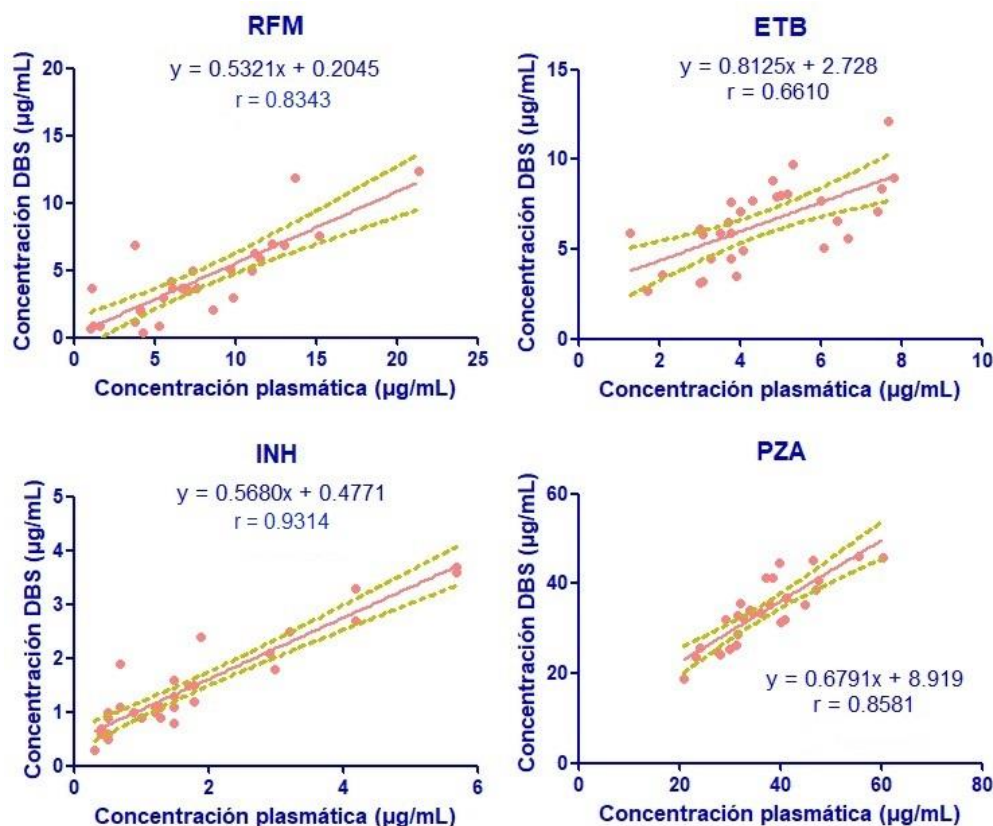


Figura 18. Correlación entre las concentraciones de los fármacos de primera línea cuantificados en muestras de DBS y plasmáticas obtenidas 2 y 4 h postdosis.

Regresión lineal y correlación entre las concentraciones en DBS y las concentraciones plasmáticas. En la figura se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación. RFM: rifampicina; ETB: etambutol; INH: isoniácida; PZA: pirazinamida; r = coeficiente de correlación.

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 INH no es estable a temperatura ambiente y es propensa a degradarse, RFM 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. En el caso de plasma, se utilizó la adición de ACN como solvente orgánico en una proporción 1:1 con respecto a la muestra, seguido de una serie de centrifugaciones y una dilución al final del sobrenadante, eligiendo que la mejor dilución fue 1:10 (muestra – agua HPLC), esto para asegurar una mejor forma en el pico cromatográfico para cada fármaco (52).

En el caso de DBS, como primer paso para la extracción de los cuatro antituberculosos se ocupó agua HPLC para eluir los fármacos desde la tarjeta de DBS, ya que añadir agua ayudó a disolver la sangre seca, seguido de la adición de ACN como solvente orgánico para llevar a cabo la precipitación de proteínas, las cuales también eluyeron desde la tarjeta de DBS; ocupar el solvente orgánico, sin la adición de agua resulta en una extracción pobre de los analitos (53).

Una comparación de los métodos encontrados en la literatura tanto en plasma como en DBS con los métodos desarrollados en este estudio se muestra en los Cuadros 25 y 26. Los tiempos 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. También se eligió una fase móvil binaria simple ACN y ácido fórmico 0.1% en agua, en comparación con otras fases móviles encontradas en la literatura (Cuadro 27 y 28).

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 (EDTA y heparina), 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 un almacenamiento a -80°C.

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 RFM, ETB, INH y PZA eran estables. En este estudio se obtuvo que RFM, ETB, INH y PZA son estables en el automuestreador a 24 horas. Solamente RFM, ETB y PZA son estables hasta tres ciclos, mientras que INH 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 (Cuadro 28) 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 de 30 – 45%.

Cuadro 27. Métodos analíticos para la cuantificación de fármacos antituberculosos en plasma/suero.

Autor	TR TTC (min)	Método de extracción	Columna	Fase móvil	Volumen de inyección	Sistema de bombeo	Modo de ionización	Transiciones MRM (m/z)	Condiciones de espectrómetro de masas
Song S. y cols., 2007. (57)	INH: 1.27 RFM: 3.43 PZA: 1.34 ETB: 0.89 TTC: 4.0	50 µL de suero con 50 µL de metanol al 50% y 50 µL del EI. Centrifugación 16 100 g/2 min. 50 µL del sobrenadante se transfirieron a 50 µL de metanol al 100%. Centrifugación 16 100 g/7 min. Se tomaron 90 µL para los viales.	Hydrosphere C18 (50 x 2 mm, 3 µm)	Ácido fórmico 0.3% en metanol y Ácido fórmico 0.3% en agua.	10 µL	Gradiente	ES +	INH: 138 > 121 RFM: 824 > 792 ETB: 205 > 116 PZA: 124 > 81	Voltaje del capilar: 3.5 kV Voltaje del cono: 24 V Energía de colisión: 13 V
Sturkenboom M. y cols., 2015. (56)	INH: 1.41 PZA: 1.72 EMB: 1.15 TTC: 2.5	Se tomaron 10 µL de suero con 250 µL de la solución del estándar interno y se colocaron en filtros. Se centrifugó a 14000 g/10 min. Se recupero el sobrenadante y se colocaron en viales.	Atlantis T3 C18 analytical (2.0 x 100 mm, 3 µm)	ACN, agua y buffer de acetato de amonio 200 mM pH 5.	5 µL	Gradiente	ES +	INH: 138.1 > 121.0 PZA: 124.0 > 81.0 EMB: 205.1 > 116.1	Voltaje del capilar: 4 kV Temperatura del gas de colisión: 400°C Flujo del gas: 12 L/min Energía de colisión: INH: 11 V ETB: 13 V PZA: 20 V
Wu L. y cols., 2020. (55)	INH: 1.27 PZA: 1.20 RFM: 1.0 TRT: 3.5	100 µL de plasma se transfieren a un tubo eppendorf de 1.5 mL que contienen 10 µL de la solución de trabajo mixta ILIS y se añadieron 300 µL de ACN. Centrifugar 12000 g/5 min. 300 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo con 300 µL de ACN-agua (40:60 v/v).	Inertsil HILIC (2.1 x 150 mm, 3 µm)	Acetato de amonio 5 mM con ácido acético al 0.05% y solución de acetato de amonio 50 mM / ACN (1:9 v/v)	2 µL	Gradiente	ES +	INH: 138.1 > 121.0 PZA: 124.0 > 81.0 RFM: 823.5 > 791.4	Voltaje del capilar: 5.5 kV Temperatura: 550°C Energía de colisión: INH: 19 PZA: 24 RFM: 24
Wang X. y cols., 2020. (54)	INH: 0.49 PZA: 1.24 ETB: 0.40 RFM: 4.06 TRT: 7	Se tomaron 100 µL de plasma y se añadieron 5 µL de estándar interno. Se añadieron 295 µL de ACN. Centrifugar 15000 g/10 min. El sobrenadante se secó con nitrógeno. Se resuspendió con 100 µL de metanol-agua con 0.1% de ácido fórmico	CAPCELL RAK-ADME (2.1 mm x 50 mm, 3 µm)	Ácido fórmico 0.1% en agua y acetonitrilo.	1 µL	Gradiente	ES +	INH: 138.20 > 121.00 PZA: 124.10 > 79.10 RFM: 823.5 > 791.4 ETB: 205.30 > 116.10	Voltaje del capilar: 4 kV. Flujo del gas de nebulización: 3 L/min
Zheng X. y cols., 2020. (58)	ETB: 2.6 PZA: 3.4 TTC: 10.5	100 µL de plasma con 400 µL del agente de precipitación se colocaron en un tubo eppendorf. Se centrifugó a 11000 g/10 min. 200 µL del sobrenadante se transfirieron a los viales.	Atlantis T3 (2.1 x 100 mm, 3 µm)	Ácido fórmico 0.1% en agua y acetonitrilo	1 µL	Gradiente	ES +	ETB: 205.20 > 116.10 PZA: 124.10 > 81.10	Temperatura del gas de colisión: 350 °C Flujo del gas: 9 L/min Voltaje del capilar: 2 kV.

TR: tiempo de retención; TTC: tiempo total de corrida; INH: isoniacida; RFM: rifampicina; ETB: etambutol; PZA: pirazinamida; ACN: acetonitrilo.

Cuadro 28. Métodos analíticos para la cuantificación de fármacos antituberculosos en DBS.

Autor	TR TTC (min)	Método de extracción	Columna	Fase móvil	Volumen de inyección	Sistema de bombeo	Modo de ionización	Transiciones MRM (m/z)	Condiciones de espectrómetro de masas
Lee K. y cols., 2017. (41)	INH: 1.27 TTC: 3	papel de filtro Whatman 903 se perforó 3.2 mm de diámetro y para su extracción se utilizó 150 µL metanol al 50% con 1 g/L de EDTA y 1 g/L de mesilato de deferoxamina. Sonicación por 10 min. Centrifugación 15 700 g/10 min. El sobrenadante (80 µL) se transfirieron a los viales.	ACQUITY UPLC BEH C18 (50.0 x 2.1 mm x 1.7 µm)	Ácido fórmico 0.3% en metanol y Ácido fórmico 0.3% en agua.	10 µL	Gradiente	ES +	138 > 79	Voltaje del capilar: 3.5 kV Voltaje del cono: 24 V Energía de colisión: 13 V
Martial L. y cols., 2018. (38)	INH: 1.41 PZA: 1.72 ETB: 1.15 TTC: 2.5	Se cortaron de 3 – 8 mm del papel filtro, posteriormente se sónica y se lleva a cabo una extracción líquida.	Atlantis T3 C18 (2.0 x 100 mm, 3 µm)	ACN, agua y buffer de acetato de amonio 200 mM pH 5	5 µL	Gradiente	ES +	INH: 138.1 > 121.0 PZA: 124.0 > 81.0 ETB: 205.1 > 116.1	Voltaje del capilar: 4 kV Temperatura del gas de colisión: 400°C Flujo del gas: 12 L/min Energía de colisión: INH: 11 V ETB: 13 V PZA: 20 V
Pavan K. y cols., 2014. (42)	INH: 1.90 ETB: 1.34 TTC: 3.5	Se perforo un disco de 3 mm de las tarjetas Whatman DMPK-C. Se añadió 300 µL de metanol. Centrifugación de 14000 rpm/5 min y el sobrenadante se colocó en viales.	Kromasil C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	Ácido fórmico 0.1% en agua y metanol (35:65 v/v)	-	Isocrático	ES +	INH: 138.1 > 121.1 ETB: 205.1 > 116.1	Temperatura de la fuente: 400 °C Voltaje del capilar: 5 kV
Vu D. y cols., 2014. (40)	RFM: 2 TTC: 4	Se perforó un disco de 8 mm de diámetro y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregó 300 µL de solución de extracción. Se sonicó durante 20 minutos. 200 µL se transfirieron y se agregaron 600 µL de ACN para precipitar proteínas. Se centrifugo a 10 146 g/5 min. Se recupero el sobrenadante.	HyPurity C18 (50 mm x 2.1 mm, 3 µm)	Acetato de amonio 10 g/L, ácido acético 35 mg/L and anhidrido trifluoroacético 2 mg/L a pH 3.5	5 µL	Gradiente	ES +	RFM: 823.3 > 791.2	Voltaje del capilar: 3.5 kV Energía de colisión: 17 V

TR: tiempo de retención; TTC: tiempo total de corrida; INH: isoniacida; RFM: rifampicina; ETB: etambutol; PZA: pirazinamida; ACN: acetonitrilo

Se demostró que las muestras se deben de almacenar en refrigeración por un tiempo máximo de 3 días para poder asegurar la calidad de los resultados obtenidos.

Existen estudios en los que se han asociado las concentraciones plasmáticas bajas de INH y RFM con un fracaso al tratamiento o recaída (8). En este estudio, del total de los 15 pacientes, el 43 y 73% para RFM e INH, respectivamente, 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} (media $\pm$ DE) y T_{max} (mediana, rango) para RFM e INH fueron de 9.82 ± 4.32 $\mu\text{g/mL}$ y 5.38 (4.14 – 8.6) $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estos resultados obtenidos fueron los esperados con base en la bibliografía, ya que se reportan concentraciones de C_{max} de 8 – 24 $\mu\text{g/mL}$ para RFM y de 3 – 6 $\mu\text{g/mL}$ para INH. En el caso de INH, 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 RFM e INH 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 INH. 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 RFM. En el presente estudio, se realizó un análisis de regresión lineal que describe la relación entre las concentraciones en DBS y las plasmáticas de RFM, ETB, INH y PZA, 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). Finalmente, las condiciones de almacenamiento no son las óptimas para la estabilidad de los fármacos antituberculosos en las tarjetas, ya que se obtuvo un tiempo corto (3 días) de estabilidad.

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 RFM, ETB, INH y PZA, 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 RFM e INH.

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, Dabita 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
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
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, Sadari 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-naïve 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/PFDDefaultActionId/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. Kuhlin 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#

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
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. Guillarme 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.

11 Anexos.

Anexo I. Carta de aprobación por el comité de investigación y comité de ética en investigación del hospital DR. Ignacio Morones Prieto.



HOSPITAL CENTRAL
"DR. IGNACIO
MORONES PRIETO"

San Luis Potosí, S.L.P., a 26 de agosto de 2021

Dr. Arturo Ortiz Álvarez
Investigador principal
PRESENTE.-

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado **"Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos"**, fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 17 CI 24 028 093, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

APROBADO

El número de registro es **67-21**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

La vigencia de ejecución de este protocolo es por 1 año a partir de la fecha de emisión de este oficio, de igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe técnico final.

*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente

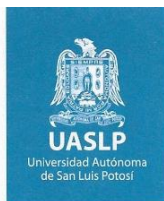
Dra. Ma. Del Pilar Fonseca Leal
Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"



C.C.P. Archivo

Av. Venustiano Carranza No. 2395
Zona Universitaria
San Luis Potosí, S.L.P. C.P. 78290
Tel. 01 (444) 198-10-00
www.hospitalcentral.gob.mx
www.slp.gob.mx

Anexo II. Carta de aprobación por el comité de ética en investigación y docencia de la Facultad de Ciencias Químicas.



Comité de Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas
Registro Número CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726

17 de noviembre de 2021

DRA. SUSANNA EDITH MEDELLÍN GARIBAY
PROFESORA INVESTIGADORA.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.
PRESENTE.

Con relación a su solicitud de revisión del protocolo titulado **"ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE MICROMUESTREO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS"**, aprobado por el Comité de Ética y por el Comité de Investigación Científica del Hospital General "Dr. Ignacio Morones Prieto" con registro 67-21, se le comunica que éste fue evaluado en la sesión del 17 de noviembre del año en curso por el Comité Ética en Investigación y Docencia de la Facultad de Ciencias Químicas (CEID-FCQ) (registro CONBIOÉTICA-24-CEI-003-20190726) y dictaminado como:

APROBADO

Su protocolo tiene la clave **CEID2021-012-S**

Conforme al Reglamento del CEID-FCQ, todo protocolo registrado y aprobado queda sujeto al seguimiento señalado en el **Art. 13**, en particular al apartado **13.2.2**:

"El profesor o investigador responsable deberá entregar al CEID-FCQ un informe al término del proyecto ante la suspensión prematura del estudio o cuando le sea requerido. Si el proyecto no ha sido terminado en el lapso de un año deberá entregarse un informe anual que señale el grado de avance. Para la entrega de este informe se considerará un año transcurrido desde la fecha de emisión del dictamen de aprobación y un lapso no mayor de 10 días hábiles. El incumplimiento de lo anterior impedirá la revisión de un nuevo protocolo del investigador solicitante. El informe se enviará al CEID-FCQ con una carta de presentación dirigida al Presidente, así como el respectivo informe".

ATENTAMENTE

Dra. Silvia Romano Moreno
Presidente del CEID-FCQ



Ccp. Archivo

www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372

Anexo III. Carta de consentimiento informado.



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"
Documentos de Apoyo para los Investigadores

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO" FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ.

PACIENTE ADULTO

TÍTULO DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	
"Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos"	
Nº REGISTRO DEL PROTOCOLO AUTORIZADO ANTE EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN	PERIODO DE EJECUCIÓN DEL PROTOCOLO AUTORIZADO
67-21	26ago 2021-26ago 2022
INVESTIGADOR PRINCIPAL	ADSCRIPCIÓN DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
Dr. Arturo Ortiz Álvarez.	División de Medicina Interna. Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"
CO-INVESTIGADOR	ADSCRIPCIÓN DEL CO-INVESTIGADOR
Dra. Susanna Edith Medellín Garibay.	Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética, Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

FECHA DE LA PRESENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Nº DE IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE	

El Departamento de Medicina Interna del Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" realiza este protocolo de investigación en colaboración con la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Usted es un paciente que cumple con los requisitos para ser incluido en este estudio, por lo que le invitamos a que participe.

Hospital Central
Dr. Ignacio Morones Prieto
COMITÉ DE
INVESTIGACIÓN
26 ABO. 2021
COMITÉ DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN
SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

A continuación, se describe cual es el objetivo del protocolo de investigación, en que consistirá su participación y cuáles serán los riesgos y los beneficios de su participación; por lo que le pediremos que lea cuidadosamente la información para que pueda tomar una decisión.

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE.

La tuberculosis es un problema de salud pública a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria. La transmisión se da de persona a persona cuando se tose, estornuda o habla, y el desarrollar la enfermedad depende esencialmente de: la frecuencia con la que se convive con una persona infectada, la duración del contacto y la susceptibilidad de la persona expuesta. Para la confirmación del diagnóstico de la tuberculosis se realiza por: baciloscopia, cultivo y biopsia. Como terapia se emplea un tratamiento estándar, el cual consiste en cuatro medicamentos: isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Sin embargo, pueden existir fallas terapéuticas debido a las concentraciones plasmáticas de los fármacos en los pacientes. Estas fallas pueden ser problemas como la alta prevalencia de los casos de toxicidad, por lo tanto, se utilizan estrategias de monitorización terapéutica de fármacos, en donde se pretende individualizar la terapia.

OBJETIVO

Desarrollar y validar un método por UPLC-MS/MS para cuantificar simultáneamente isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, en gotas de sangre seca, como alternativa de muestreo y demostrar su aplicación en monitorización farmacocinética de pacientes con tuberculosis.

PROCEDIMIENTOS A LOS QUE SE SOMETERÁ AL PACIENTE

Usted ha sido invitada a participar en este estudio de investigación debido a que ha sido diagnosticada con tuberculosis y tiene al menos 2 semanas de tratamiento con los medicamentos isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Su participación en este estudio de investigación es completamente voluntaria y si usted acepta participar, le pediremos que lea cuidadosamente el presente documento de consentimiento informado y que haga todas las preguntas necesarias al investigador responsable, el **Dr. Arturo Ortiz Alvarez**, para que pueda resolver sus dudas. Cuando ya no tenga alguna duda con respecto a lo que se hará en este estudio, le pediremos que firme su aceptación de participar al final de este documento, y le pediremos nos proporcione información general como su nombre, datos personales, su edad, peso, estatura; y de sus antecedentes médicos (p. ej., diabetes, presión alta), cuántas pastillas toma de los medicamentos isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, la posible presencia de reacciones adversas (reacciones no deseadas debidas a su tratamiento); en una entrevista de aproximadamente 15 minutos.

Como parte del estudio, le solicitaremos su autorización para revisar su expediente clínico y obtener algunos datos como los resultados de los análisis clínicos que le han realizado (glucosa, urea, creatinina, colesterol, albúmina, triglicéridos), que le ayudarán a los investigadores para entender mejor los resultados que se obtengan de este estudio.

También le pediremos nos autorice para que la QFB Ivette Guadalupe Herrera Pérez

obtenga 3 muestras de su sangre, cada una de ellas de una cantidad de 3 mL, que equivalen aproximadamente a media cucharadita, de las que se usan para el café. Dos de las muestras se obtendrán mediante la punción de la vena de su antebrazo con una jeringa estéril en la que se colocará directamente un tubo especial para la recolección de sangre. La tercera muestra se obtendrá de un dedo de una de las manos, se recolectarán unas cuantas gotas obtenidas por punción con una lanceta en la yema y se recolectarán en un papel especial. Las dos muestras se obtendrán en postdosis a las 2 y 4 horas.

Como parte y complemento de este estudio de investigación, se realizará un estudio de la Farmacogenética de estos medicamentos, en el que se analizará si existen cambios en la manera en cómo el medicamento de isoniacida se comporta en el organismo de cada paciente.

RIESGOS ESPERADOS PARA EL PACIENTE

Los riesgos potenciales implicados por su participación en este estudio son mínimos. En la muestra sanguínea los riesgos físicos son dolor al momento de la punción, sensación leve de ardor y posible aparición de moretón que desaparecerá en un periodo máximo de 2 días. Si usted llegara a detectar una molestia permanente después de 3 días posteriores a la toma de muestra como enrojecimiento, hinchazón y/o dolor en la zona en la que se realizó la punción (antebrazo), deberá comunicárselo inmediatamente el **Dr. Arturo Ortiz Álvarez** o a la **Dra. Susanna Edith Medellín Garibay** para que le den el tratamiento y/o seguimiento pertinente.

Los posibles riesgos que le hemos explicado previamente no son mayores o diferentes a las otras ocasiones en las que le han realizado una toma de muestra sanguínea mediante una punción venosa para realizar los análisis clínicos que le ha indicado su médico, por lo que tenga la confianza que el personal que realizará este proceso está capacitado para realizarlo adecuadamente. El material utilizado para la toma de muestra sanguínea será nuevo, estéril y desechable.

BENEFICIOS PARA EL PACIENTE

Su participación en este estudio no implica que usted reciba un beneficio directo e inmediato. Al participar en esta investigación podrá conocer la información de las cantidades de los medicamentos isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol en su sangre y los resultados de los estudios genéticos que se realicen a su muestra.

BENEFICIO PARA LA SOCIEDAD

Este estudio ayudará a que en un futuro el tratamiento con estos medicamentos se ajuste de mejor manera a cada paciente, de acuerdo a cómo responde su organismo en función de los posibles cambios genéticos propios de cada paciente.

PARTICIPACIÓN O RETIRO:

Usted está en la libertad de negarse a participar en este estudio de investigación; pero si decide participar, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, usted puede revocar o anular el consentimiento que ahora firma. Si decide terminar su participación en este estudio, deberá comunicarlo a la **Dra. Susanna Edith Medellín Garibay** o al **Dr. Arturo Ortiz Álvarez**, quienes le proporcionarán un documento (formato) muy sencillo en el que usted pondrá algunos de sus datos e indicará que ya no desea

participar en el estudio. Su decisión de participar o no, no afectará de ninguna forma el trato médico que reciba en la institución para su enfermedad.

GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD

La información personal y médica que usted proporcione para en este estudio será de carácter estrictamente confidencial y será utilizada únicamente por el equipo de investigación de este proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Esta información se conjuntará con la de otros participantes para realizar el presente estudio. Con la finalidad de mantener el anonimato, se le asignará un código para el uso de sus datos.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio se considera de bajo riesgo debido a que únicamente se le solicitarán muestras de sangre.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS AL FINALIZAR EL ESTUDIO

Sus muestras serán utilizadas únicamente para los fines que el presente trabajo ha especificado y que le han explicado, y que el Comité de Ética en Investigación revisó y autorizó.

COMPROMISO DE RESPUESTA A PREGUNTAS Y DUDAS

Para realizar cualquier pregunta, duda o aclaración sobre este el estudio, o sobre alguna reacción adversa relacionada con el medicamento que usted está tomando como tratamiento y que le ha sido indicado por su médico tratante, usted puede comunicarse con:

Q.F.B Ivette Guadalupe Herrera Pérez

Departamento de Biofarmacia y Farmacocinética,
Facultad de Ciencias Químicas
Manuel Nava No.6
Tel. celular: 4442075677



Hospital Central
Dr. Ignacio Morones Prieto
**COMITE
DE
INVESTIGACION**

Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como participante en el estudio de investigación, también puede ponerse en contacto con una persona no involucrada con el equipo de investigadores de este estudio:

Dr. Juan José Ortiz Zamudio
Presidente del Comité de Ética en Investigación
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"
Av. Venustiano Carranza 2395,
Col. Zona Universitaria, San Luis Potosí, S.L.P., C.P. 78290,
Tel 444 834 2701, Ext. 1710



Hospital Central
Dr. Ignacio Morones Prieto
26 AGO. 2021
**COMITE DE ETICA
EN INVESTIGACION**
SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

**Aceptación del documento de Consentimiento Informado
para el estudio.**

Si usted desea consentir su participación en esta investigación, por favor firme y feche este documento en los espacios proporcionados en la parte inferior y ponga sus iniciales en cada página. Su firma significa que usted acepta lo siguiente:

1. Se me ha dado información completa y adecuada en forma verbal y por escrito sobre el objetivo del estudio Farmacocinético y Farmacogenético de este protocolo de investigación, sus beneficios y riesgos implicados.
2. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento y terminar mi participación en el estudio en cualquier momento sin afectar mi derecho a recibir atención médica.
3. Es mi responsabilidad preguntar para aclarar cualquier punto que no entienda claramente en relación a mi participación en este estudio. He hecho todas las preguntas a la persona que realiza el proceso de consentimiento y he recibido respuestas satisfactorias.
4. No he ocultado o distorsionado cualquier condición médica actual o cualquier antecedente médico que pudiera perjudicar o afectar mi salud. He respondido todas las preguntas en relación a mi salud en forma precisa y verdadera.
5. Tengo 18 años de edad o más y soy legalmente capaz de dar este consentimiento.
6. Acepto participar en este estudio de la farmacocinética de isoniácida, rifampicina, pirazinamida y etambutol de manera voluntaria sin que me hayan presionado, manipulado y/u obligado. Entiendo que mi negación a participar o la discontinuación de mi participación en cualquier momento, no implicará penalidad o pérdida de beneficios a los que de otra forma tengo derecho.
7. Entiendo y estoy de acuerdo en que la información obtenida a partir del presente estudio puede ser utilizada para la publicación de estos resultados como parte de la divulgación científica y como apoyo a la práctica clínica, pero que en todo momento se utilizará un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de mis datos.
8. Me han explicado que la información personal y clínica que he consentido en proporcionar conservará mi privacidad y que se utilizará solo para los fines que deriven de este estudio. Los datos relacionados con mi privacidad personal y/o familiar serán manejados en forma confidencial ya que se utilizará un código asignado para mantener mi anonimato y la confidencialidad de todos los datos y resultados.
9. Los investigadores que participan en este proyecto se han comprometido a proporcionarme la información actualizada que pueda ser importante para mi salud y que se obtenga durante el estudio en el momento en el que lo solicite y me entregarán una copia firmada de este documento de consentimiento informado.

**Autorización para el acceso al expediente clínico del paciente
y uso de datos clínicos.**

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que los investigadores responsables de este proyecto puedan revisar su expediente clínico y utilizar los datos clínicos que se encuentran descritos en el mismo, de manera anónima para este protocolo de investigación, cuyos objetivos y procedimientos se le han explicado. Marque con una X su respuesta:

☐ Sí, doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

☐ No doy mi autorización a los investigadores que participan en este proyecto para el uso de los datos en mi expediente clínico en la investigación que me han explicado.

Autorización para el uso de mis datos personales de contacto.

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que únicamente los investigadores responsables de este estudio de investigación puedan utilizar los datos personales de contacto como teléfono fijo, teléfono móvil, correo electrónico o redes sociales que usted ha indicado, para poder localizarme de ser necesario para una posible cita y/o entrevista o participación en un seguimiento de mi enfermedad y/o tratamiento. Marque con una X su respuesta:

☐ Sí, doy mi autorización a los investigadores que me localicen utilizando mis datos de contacto para un posible seguimiento de mi enfermedad o tratamiento, como me han explicado.

☐ No doy mi autorización a los investigadores que me localicen utilizando mis datos de contacto para un posible seguimiento de mi enfermedad o tratamiento, como me han explicado.

Autorización para informar a mi médico tratante de mi participación en este estudio Farmacocinético de investigación y para que mis resultados sean incluidos en mi expediente clínico.

Se le solicita que indique su acuerdo o desacuerdo para que los investigadores responsables de este estudio de investigación le informen a mi médico tratante, el Dr. Arturo Ortiz Álvarez, que he aceptado participar en este estudio de los medicamentos isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol con el número de registro 67-21 ante el CEI de este hospital y para que los resultados obtenidos con las muestras de sangre que he consentido en proporcionar sean incluidos en mi expediente clínico para que puedan ser

utilizados como referencia para mi tratamiento con isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol por mi médico tratante. Marque con una X su respuesta:

☐ Sí, doy mi autorización a los investigadores para que informen a mi médico tratante de mi participación en este estudio de investigación de la farmacocinética de isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol y para que se incluyan mis resultados en mi expediente, de acuerdo con lo anterior mencionado y como me han explicado.

☐ No doy mi autorización a los investigadores para que informen a mi médico tratante de mi participación en este estudio de investigación de la farmacocinética de isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol y para que se incluyan mis resultados en mi expediente, de acuerdo a lo anterior mencionado y como me han explicado.

Por medio del presente documento de consentimiento informado acepto participar en el estudio de investigación denominado "Estandarización y validación de una estrategia de micromuestreo para la cuantificación de fármacos antituberculosos", de manera libre y voluntaria.

NOMBRE DEL PACIENTE	FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL PACIENTE
FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO	

NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL (si es necesario)	FIRMA DE ACEPTACIÓN DEL REPRESENTANTE LEGAL
FECHA DE LA OBTENCIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO	PARENTESCO
DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL REPRESENTANTE LEGAL	

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"
Documentos de Apoyo para los Investigadores

NOMBRE DEL TESTIGO 1		FIRMA DEL TESTIGO 1	
FECHA	PARENTESCO		
DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 1			

NOMBRE DEL TESTIGO 2		FIRMA DEL TESTIGO 2	
FECHA	PARENTESCO		
DIRECCIÓN / TELÉFONO DE CONTACTO DEL TESTIGO 2			

QFB Ivette Guadalupe Herrera Pérez. ALUMNA PARTICIPANTE EN EL PROTOCOLO
--

DR. Arturo Ortiz Álvarez INVESTIGADOR PRINCIPAL. División de Medicina Interna Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto" CÉDULA PROFESIONAL <u>9978483</u>	Dra. Susanna Edith Medellín Garibay. CO-INVESTIGADOR Laboratorio de Biofarmacia y Farmacocinética Facultad de Ciencias Químicas UASLP CÉDULA PROFESIONAL <u>8900474</u>
--	---

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).