



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis

**"Desarrollo de un método analítico
para la cuantificación de
hidroxicloroquina en plasma y tejido
linfoide y su aplicación a la clínica."**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

David Eder Sánchez Hernández

MÉXICO, D.F.

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la vida por permitirme ser como soy, y la oportunidad de vivir y crecer continuamente. Por dejarme estar en tantos lugares que se me hace difícil recordar.

Gracias a la libertad de ser, pensar y existir.

Doctora Helgi

Gracias por el apoyo, los consejos, por permitirme desarrollarme bajo su tutela, gracias por el tiempo, la dedicación a este trabajo, sobre todo gracias por ser una persona admirable, por su sencillez y honestidad, gracias por demostrarme que la grandeza se mide con la calidad humana y después con los certificados.

A mi Papá

Gracias por las lecciones, el apoyo, los consejos y la libertad del desarrolló fuera del yugo familiar, sabes que te amo y sin ti yo no estaría aquí; gracias por lo que pasamos juntos, nunca olvidare las mañanas, las tardes y las noches bajo tu cobijo, que estas continúen hasta que se las transmitas a mi nueva familia, de corazón muchas gracias Papá David, eres un pilar en mi vida.

A mi Mamá

Gracias Mamá por el apoyo, por ser mi amiga, por las presiones, por tu forma de ser tan singular la cual te hace una persona única, te amo mamá y tu eres parte fundamental de este logro, gracias por la libertad y también por no dejar que se volviera libertinaje, gracias por las oportunas lecciones de vida.

A Adderly

Gracias hermano por estar conmigo durante toda tu vida, gracias por el aprendizaje, las lecciones, gracias por el apoyo, la confianza, sobre todo gracias por ser como eres; recuerda que eres de primer mundo; tu puedes realizar lo que te propongas animo, todo saldrá bien, gracias por todo tu amor y cariño. Recuerda que de ti depende y siempre existe la **esperanza**.

A Eythan

Gracias por compartir muchos momentos felices conmigo hermano, por la espontaneidad de tu ser, por la alegría que transmites, animo tu puedes realizar todo, recuerda que en esta vida no hay imposibles, gracias por tu sinceridad y porque eres una persona autentica, siempre contarás conmigo; ponle entusiasmo a todo lo que hagas y éxito.

A mis otro papás

Gracias a todas aquellas familias que me recibieron en sus hogares sin nada a cambio, por que ustedes contribuyeron en gran medida a mi desarrollo profesional, gracias por las lecciones y las restricciones, Gracias Fam. Cervantes Bazán (mi segunda familia), Gracias Fam. Monsalvo Martínez, Gracias Tía Beatriz por el apoyo constante, por su casa y por su atención, Gracias Tía Lupita por su hogar, las atenciones y por ser una muy linda persona, Gracias Tía Rosario gracias por ser mi amiga y por el apoyo en los momentos difíciles. A todos ustedes GRACIAS totales por ser mi familia en algún momento de mi vida.

A mis otros hermanos

Gracias a todas las personas que me prestaron su casa, así como parte de su vida; Gracias Fer Cárdenas eres mi hermano, por los conciertos, la convivencia y el apoyo constante, de verdad primo para mi eres mi hermano, gracias Daniel Cervantes por considerarme parte de tu familia, por el apoyo, los regaños, las parrandas gracias hermanito (gracias a Lalo y a tus hermanas por el apoyo, y gracias Dieguito por la alegría), gracias Lalo (mi hermano) por la casa y el apoyo, por ser como eres; por brindarme tu amistad y confianza gracias; gracias Manolo por el apoyo y tu casa, gracias Lupe por el apoyo y ser mi maestra en muchas situaciones de la vida, gracias por el apoyo constante; gracias Martín por tu buena onda y por las fiestas, por los consejos y por tu amistad gracias primo; A Miguel Palma gracias por tu apoyo primo; gracias a todos por el tiempo compartido, gracias de corazón.

A mi abuelita Ema Pérez

Gracias por ser un ejemplo a seguir, por su fortaleza, su experiencia y sus conocimientos, gracias abuelita por que usted fue en muchos momentos esa fuerza inspiradora necesaria para los momentos complicados de la vida, la admirare por siempre y gracias.

A la UNAM y a la Fac. de química

Gracias por permitirme desarrollarme y llenarme de conocimiento en sus aulas y también gracias por el conocimiento fuera de las aulas y gracias por permitirme decir con orgullo que soy Universitario; gracias a todos los maestros que compartieron sus conocimientos, no los defraudare afuera y siempre diré con orgullo que soy universitario.

A mis amigos

Gracias a todas las personas que convivieron conmigo durante mi estancia en la Universidad; Gracias Fer Contreras por la amistad y por los años compartidos gracias hermano por la ayuda y el apoyo; gracias Beto Palomares por el fútbol, las bromas y por tu apoyo constante y sobretodo por tu amistad gracias hermano, gracias a Chucho por su amistad y por el tiempo de convivencia; gracias Judith, Liliana, Adriana, Roberto, Pepe, Jorge Contreras, Jorge, Richie, Cinthia, Karina, Pavo, Martín, Samuel, Daniel, por los viajes y las aventuras por la sana diversión; Gracias a la banda del boxito por el trabajo, gracias a mis grandes amigos Daniel y Edgar por las distracciones, los juegos, por su amistad, por el relajo y por el tiempo brindado, gracias por ser unos tipazos y por la amistad arrebatada por el pony.

A Biofarmacia

Gracias a todos lo del Laboratorio, gracias por el apoyo; gracias Julio por la experiencia, la ayuda, la discreción y sobre todo por mostrarte siempre como un amigo; gracias Roberto Carlos vas a ser muy grande y espero que no me olvides, gracias por tus conocimientos, el apoyo y sobre todo por tu sencillez y humildad éxito en todo amigo, gracias Myrna por tu ayuda y el apoyo, gracias Oscar Mendoza por la ayuda y más que todo por ser mi amigo, gracias Maestra Lulú usted es un factor muy trascendente en este trabajo, gracias por el tiempo y la actitud; gracias Lupita por tu amistad, los conocimientos y los consejos; gracias Kenneth por siempre tener tiempo para dudas y por tu alegría; gracias Maestra Inés por la ayuda y por el apoyo; gracias jorge, gracias Alberto, Paulina por su ayuda y su amistad.

A Nancy

Gracias por las enseñanzas, por el amor incondicional; se que el error te hace crecer, quien sabe cuantos debamos cometer, gracias por el tiempo, por las nuevas expectativas, gracias por tu compañía y ante todo mantente firme y fuerte pues eres especial y llegarás lejos y sobretodo perdona mis ofensas y todo lo que he hecho mal durante nuestra compañía. Porque el esfuerzo de hoy es para la familia del mañana.

A mis nuevos amigos a Emmanuel, a Jules, Tere, Julián, Maricela, Cristina, Maritere gracias por permitirme entrar en su círculo de la confianza y por todo lo que nos espera en el futuro; sobretodo gracias a mi pareja favorita (Emmanuel y Julia) gracias por ser como son conmigo , créanme eso nunca se olvida gracias de corazón.

A las personas que nunca confiaron en mí

Gracias a todos ustedes (y vaya que son muchas personas) por que sin proponérselo fueron una ayuda ligera en el desempeño de mi persona, y este éxito y todos los consecuentes llevan una dedicatoria especial para ustedes.

Y sobre todo gracias a todas las personas que me conocen, que saben quien soy y que conocen mi forma de ser por que ustedes estuvieron en distintos sucesos de mi vida y las lecciones aprendidas no se pagan con nada y finalmente gracias a la música por ser mi motor y mi mayor pasatiempo.

"you may say i´m dreamer, but i´m not the only one. I hope someday you´ll join us and the world will live as one"

John Lennon

Lista de Figuras

Figura		Página
Figura 1.	Esquema del VIH-1.....	18
Figura 2.	Ciclo vital y reproducción del VIH-1.....	18
Figura 3.	Estructura de la HCQ.....	24
Figura 4.	Método de extracción empleado para las muestras plasmáticas.....	33
Figura 5.	Método de extracción empleado para las muestras de tejido adenoideo.....	34
Figura 6.	Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en plasma.....	39
Figura 7.	Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en tejido adenoideo	39
Figura 8.	Curva 1 obtenida en linealidad del método.....	40
Figura 9.	Curva 2 obtenida en linealidad del método	41
Figura 10	Curva 3 obtenida en linealidad del método.....	41
Figura 11	Curva promedio obtenida en linealidad del método.....	41
Figura 12	Cromatograma obtenido en muestras plasmáticas 1.....	50
Figura 13.	Cromatograma obtenido en muestras plasmáticas 2.....	51
Figura 14.	Cromatograma obtenido en muestras plasmáticas 3.....	51
Figura 15.	Cromatograma obtenido en muestras de tejido 1.....	53
Figura 16.	Cromatograma obtenido en muestras de tejido 2.....	54
Figura 17.	Cromatograma obtenido en muestras de tejido 3.....	54

Lista de tablas

Tabla		Página
Tabla 1.	Enfermedades oportunistas más frecuentes en los pacientes enfermos de SIDA.....	16
Tabla 2.	Fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa utilizados para el tratamiento del SIDA.....	16
Tabla 3.	Fármacos inhibidores de proteasa e Inhibidores de fusión.....	21
Tabla 4.	Linealidad del método de cuantificación de HCQ en plasma.....	22
Tabla 5.	Resultados obtenidos para repetibilidad del método en plasma.....	40
Tabla 6.	Resultados para reproducibilidad del método.....	41
Tabla 7.	Resultados para exactitud del método de cuantificación de HCQ en plasma.....	41
Tabla 8.	Resultados obtenidos para el parámetro de recobro absoluto para la cuantificación de HCQ en plasma.....	42
Tabla 9.	Resultados de estabilidad para la cuantificación de HCQ en 30 días.....	44
Tabla 10.	Resultados para el límite de cuantificación	45
Tabla 11.	Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas	45
Tabla 12.	Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide.....	47
Tabla 13.	Niveles proporcionales de HCQ en sangre y tejido linfoide.....	55

Abreviaturas

SI	Sistema Inmunitario
NK	(Por sus siglas en ingles) Natural Killer
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia humana tipo-1
OMS	Organización Mundial de la Salud
gp41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
Ac	Anticuerpo
HAART	(Por sus siglas en ingles) Terapia Antiretroviral Altamente Efectiva
AZT, ZDV	Zidovudina
ddI	Didanosina
ABC	Abacavir
d4T	Stavudina
bis-POM, PMPA	Adefovir
T-20	Enfuvirtide
HCQ	Hidroxicloroquina
ng	nanogramo
mL	mililitro
ACN	Acetonitrilo
Rp	Respuesta en plasma
Rs	Respuesta en solución
CV	Coefficiente de Variación

Índice

1. Introducción.....	12
1.2 Objetivos.....	13
1.2.1 Objetivos generales.....	13
1.2.2 Objetivos particulares.....	13
2. Generalidades.....	15
2.1 Sistema Inmunitario (SI)	15
2.1.1 Sistema Linfoide.....	15
2.2 SIDA	16
2.3 VIH	18
2.4 El SI y el VIH	20
2.5 Tratamientos actuales contra el SIDA	21
2.6 Antecedentes directos	23
2.6.1 Hidroxicloroquina.....	23
2.7 Nomenclatura	24
2.7.1 Nombre químico.....	24
2.7.2 Formula condensada.....	24
2.7.3 CAS.....	24
2.7.4 Peso molecular.....	24
2.7.5 Estructura química.....	25
2.7.6 Descripción.....	25
2.7.7 Coeficientes de disociación.....	25
2.7.8 Coeficientes de partición.....	25
2.8 Farmacocinética.....	26
2.9 Farmacodinamia.....	26
2.10 Toxicidad.....	27
2.10.1 Signos y síntomas.....	27
2.10.2 Mecanismos de toxicidad.....	28
3. Parte experimental.....	30
3.1 sustancia de referencia.....	30
3.2 Reactivos.....	30
3.3 Equipo.....	30

3.4 Soluciones.....	31
3.5 Preparación de soluciones.....	31
3.6 Fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfatos (0.1M pH 3.0) (25:75).....	32
3.7 Preparación de la curva patrón de HCQ.....	32
3.8 Obtención de muestras.....	33
3.8.1 Sangre periférica.....	33
3.8.2 Tejido adenoide.....	34
3.9 Procedimiento de extracción de HCQ en plasma.....	35
3.10 Procedimiento de extracción de tejido adenoide.....	36
3.10.1 Homogenado de tejido adenoide.....	36
3.11 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma.....	36
3.11.1 Linealidad del método.....	36
3.11.2 Precisión del método.....	37
3.11.3 Exactitud del método.....	37
3.11.4 Recobro absoluto.....	38
3.11.5 Estabilidad.....	38
3.11.6 Limite de cuantificación.....	39
3.12 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en tejido adenoide.	39
3.12 Estudio in vivo.....	40
3.12.1 Análisis de muestras de pacientes bajo tratamiento con HCQ.....	40
3.13 Metodología.....	41
4. Resultados.....	43
4.1 Blanco plasma.....	43
4.2 Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en plasma.....	43
4.3 Blanco en tejido linfóide.....	44
4.2 Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en tejido adenoide...44	
4.3 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma.45	
5. Discusión de resultados.....	58
5.1 Sistema cromatográfico.....	58
5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma y tejido adenoide.....	58

5.2.1	Linealidad del método en plasma.....	58
5.2.2	Precisión del método.....	59
5.2.3	Reproducibilidad del método.....	59
5.2.4	Exactitud del método.....	59
5.2.5	Recuperación absoluta.....	59
5.2.6	Estabilidad de la muestra.....	60
5.2.7	Límite de cuantificación.....	60
5.3	Estudio in vivo.....	61
5.3.1	Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras plasmática.....	61
5.3.2	Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.....	61
5.3.3	Cuantificación de HCQ en tejido adenoide.....	61
5.3.4	Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoideo proveniente de pacientes enfermos de VIH-1.....	62
5.3.5	Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras adenoideas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.....	62
5.3.6	Resultados de la relación de HCQ en sangre y tejido linfoideo de los pacientes bajo estudio.....	62
6.	Conclusiones.....	65
7.	Bibliografía.....	67

**“si me advertí, que el error te hace crecer,
cuantos debo cometer; ¡Dime! ”**

Zurdok.

Capítulo 1

Introducción y objetivos

1. Introducción

En la actualidad existen más de 40 millones de personas infectadas con el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), de las cuales mueren más de 20 millones de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Se estima que en el 2001 en todo el planeta había 40 millones de personas con VIH. En muchas partes del mundo en desarrollo, la mayoría de las nuevas infecciones se presentan en adultos jóvenes, siendo particularmente vulnerables las mujeres. Cerca de una tercera parte de las personas infectadas con el VIH/SIDA tienen entre 15 y 24 años. En su mayor parte no saben que son portadores del virus. Muchos otros millones de personas no saben nada o saben muy poco acerca del VIH para protegerse a sí mismas contra él. Por lo que el SIDA es un grave problema mundial. (ONUSIDA OMS, 2001).

Las estrategias terapéuticas contra el VIH-1 son diversas, una de ellas consiste en el uso de fármacos que disminuyen la carga viral de forma significativa, sin embargo los regímenes terapéuticos son complejos, y presentan efectos importantes que tienen impacto deletéreo sobre la calidad de vida de los pacientes enfermos, cabe mencionar que estos fármacos son de costos muy elevados, por lo que solo una porción de los pacientes infectados tienen acceso a ellos (Sotelo J, 2005). Cabe mencionar que hoy en día los países están tan unidos en el combate contra esta enfermedad que existen acuerdos para que los fármacos sean más accesibles para la población.

La búsqueda de fármacos que mejoren el efecto del tratamiento, además de que sean mas costeables para la población en general, ha llevado a la investigación con otros agentes, uno de ellos es la cloroquina que es una 9-aminoquinolona conocida por su efecto inmunomodulador disminuyendo la infectividad del virus; sin embargo, este fármaco presenta efectos adversos muy graves, ya que puede producir ceguera. Dado que se requiere de un agente que pueda ser tomado durante largos períodos de tiempo y que no presente efectos secundarios graves se han estudiado otros agentes pertenecientes a la familia de la Cloroquina, entre los que destaca la HIDROXICLOROQUINA (HCQ). Ambos agentes alteran el proceso de degradación de proteínas por las hidrolasas ácidas en los lisosomas, el ensamblaje de macromoléculas en los endosomas y las modificaciones post transcripcionales de proteínas en el aparato de Golgi, lo cual conduce a una interferencia con el procesamiento antigénico de los macrófagos y otras células lo que disminuye la infectividad del virus, por lo que se postula como posible agente en contra del SIDA.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos generales

- Determinar los niveles de HCQ en estado estacionario en plasma y tejido linfoideo en pacientes infectados con el VIH.

1.2.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un método analítico para cuantificar HCQ en plasma y tejido linfoide
- Validar el método analítico para cuantificar HCQ en plasma
- Determinar la proporción de HCQ en plasma y tejido linfoide.

**"No se fracasa si existe un comienzo,
ser transparente te transporta ileso"**

Control

Capítulo 2 Generalidades

2. GENERALIDADES

2.1 Sistema Inmunitario (SI)

El término inmunidad tiene su origen en un vocablo romano que significa privilegio de exención o "estar libre de" y que hace referencia a la capacidad que poseen los seres vivos de no sufrir continuamente las enfermedades que ocasionan la agresión de los microorganismos.(Roitt, 1991).

El SI protege al organismo de una amplia variedad de agentes infecciosos, capaz de reconocer a los componentes del agente patógeno e iniciar una serie de respuestas encaminadas a eliminarlo. Sus características son la especificidad y la memoria. Se habla de inmunidad humoral cuando se trata de anticuerpos e inmunidad celular cuando intervienen células; las principales células que participan en la respuesta inmunitaria son los leucocitos ó glóbulos blancos , las células linfoides y las células fagocíticas. (Roitt, 1991) , (Abbas, 2002).

2.1.1 Sistema linfoide

El SI esta conformado además por órganos, conocidos como órganos linfoides. Este sistema se divide en órganos linfoides primarios en los cuales se produce casi en su totalidad el desarrollo de los linfocitos (timo, médula ósea) y órganos linfoides secundarios los cuales proporcionan a los linfocitos el entorno para su interacción, en estos se lleva a cabo la diseminación de la respuesta inmune (nódulos linfáticos, bazo y tejidos linfoides mucosales). (Abbas, 2002).

Los linfocitos son de dos clases principales, B o T, según donde se desarrollen; es decir las células B se desarrollan en la médula ósea y en hígado fetal y las células T en el timo, existe una tercera clase de linfocitos que no expresan receptores de antígenos y se denominan células asesinas naturales (NK Natural Killer). (Roitt, 1991) , (Rojas, 1996).

2.2 SIDA

El SIDA es una etapa avanzada de la infección por el VIH-1. Este virus deja sin defensas al organismo, concretamente mata a las células encargadas de la defensa contra las enfermedades; por lo tanto se puede definir al SIDA como un conjunto de síntomas y signos derivados de un debilitamiento importante del SI que ha contraído el enfermo durante su vida, y que no es congénito. (sexovida.com, 2005).

Una persona infectada puede permanecer durante muchos años sin síntomas. En esta fase se dice que el individuo es "seropositivo" o "portador". Durante este tiempo el VIH no permanece inactivo, sino que continúa multiplicándose activamente dentro de las células e infectando otras nuevas. Poco a poco las defensas del organismo se van debilitando. Aparecen entonces los signos y síntomas que definen el SIDA.

Cuando se llega a esta etapa avanzada de la infección aparecen las llamadas "enfermedades oportunistas", que se desarrollan aprovechando la caída de las defensas. Las más frecuentes son las afecciones pulmonares, de la piel, diversos tipos de cáncer. A ello se suman los efectos directos del virus en el organismo, que incluyen trastornos del sistema nervioso y el aparato digestivo. Cuando la persona que vive con VIH-1 desarrolla estas afecciones se la considera enferma de SIDA. (Pinching, 1992).

Tabla 1. Enfermedades oportunistas más frecuentes en los pacientes enfermos de SIDA. (Pinching, 1992)

Infecciones relacionadas a defecto inmune	Tumores debidos a defectos inmunes	Infecciones asociadas a defectos inmunes
Neumonía	Sarcoma de Kaposi´s	Neumonía (pneumococos)
Candidiasis oral o esofaríngea	Linfoma de células B (cerebral o diseminado)	Infección broncopulmonar (<i>Haemophilus influenzae</i>)
Ulceración mucocutánea (Herpes)	Linfoma de Hodgkin´s	Infección broncopulmonar (<i>Bramhanella catarrhalis</i>)
Infección extensiva de piel (<i>Trychophyton</i>)		Neumonía e infecciones de la piel (Estafilococos)
Abscesos cerebrales, encefalitis (<i>Toxoplasma gondii</i>)		

Las tres formas o vías de transmisión son:

- a) Transmisión sexual: intercambio de fluidos durante todo tipo de relación sexual con una persona infectada por el VIH-1 sin preservativo.
- b) Transmisión sanguínea: cuando la sangre de una persona infectada por el VIH se pone en contacto con la sangre de una persona sana.
- c) Transmisión madre-hijo: las mujeres infectadas pueden transmitir el virus a su hijo mientras está en el vientre, en el momento del parto, o durante la lactancia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado más de 40 millones de enfermos de SIDA en el mundo, cada día se producen 8500 infecciones en el mundo, de las cuales 1000 ocurren a niños, casi el 42% de los adultos infectados son mujeres; por lo tanto el SIDA es un problema de salud mundial. (OMS, 2005).

2.3 VIH

Los virus del SIDA pertenecen a una familia de virus, los retrovirus. Un retrovirus es un virus que tiene su genoma ubicado en el ARN y no en el ADN. Los retrovirus usan transcriptasas inversas para convertir el ARN en ADN. Contienen ARN como material genético. El ARN del virus se traduce a ADN, el cual se inserta a sí mismo dentro del ADN propio de la célula infectada. Los científicos pueden modificar genéticamente los retrovirus y usarlos en terapia génica como vectores.

El VIH agente causante del SIDA, es un retrovirus lentivirae, aparentemente no oncogénico. Fue descubierto y relacionado con el SIDA por Luc Montaigner en Francia en 1983. Es un virus esférico con varias capas proteicas. Su material genético se compone principalmente de ARN que debe copiarse en ADN para poder multiplicarse e integrarse en el núcleo de la célula que infectan. Los antígenos (proteínas) de la envoltura exterior, permiten al virus adherirse e infectar a los linfocitos.

El proceso de conversión de ARN en ADN es una característica principal de los retrovirus y se lleva a cabo mediante acciones enzimáticas de transcriptasa inversa. Con la demostración de la existencia de la transcriptasa inversa, se inició en la década de los 70's la búsqueda de retrovirus humanos, que permitió el aislamiento en 1980 del virus de leucemia de células T del adulto, HTLV-1. (Gallo y cols., 1980).

El VIH tiene un diámetro aproximadamente de 100 nanómetros. Su parte exterior es la "cubierta", en la que se encuentra una proteína del virus, la gp41 o "glicoproteína transmembrana". Conectada a la gp41 está la gp120, la cual puede unirse al receptor CD4 localizado en la superficie de los linfocitos T4 para penetrar en ellos. El núcleo tiene la "cápside", compuesta por la proteína p24. En su interior está el ARN, la forma de información genética de VIH. (sexovida.com, 2005).

Figura 1. VIH

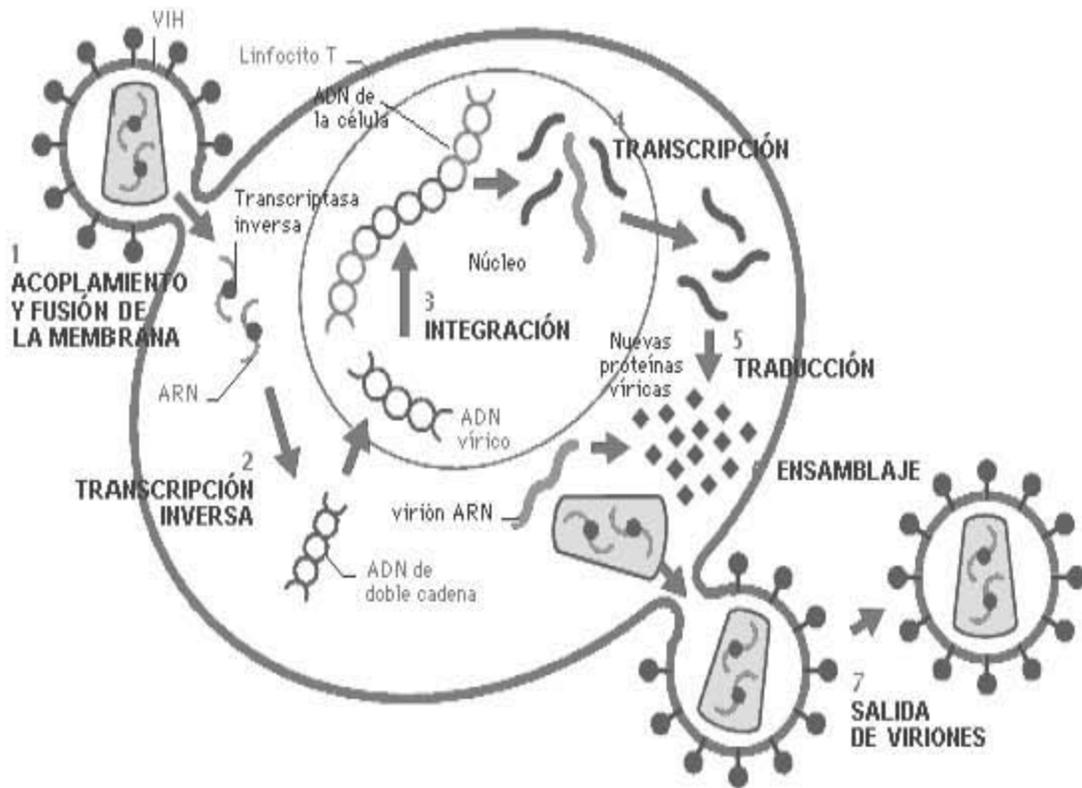


Figura 2. Ciclo vital y reproducción del VIH-1

En la Figura 1 se presenta el ciclo vital del VIH. Este puede ser tan corto como 1.5 días, desde el ensamblado en una célula infectada hasta la infección en una nueva célula. Dado que la vida del virus es corta, las copias de ADN son altamente variadas. Por la alta cantidad de errores de transcripción, existe una alta tasa de mutación, lo cual aprovecha el virus para resistir a las terapias con antiretrovirales. En la Figura 2 se muestra un esquema del VIH dentro de una célula. (sexovida.com, 2005).

2.4 El SI y el VIH

La interacción entre el VIH y el organismo es enormemente compleja y no conducida perfectamente a nivel de los mecanismos inmunopatogénicos de la infección. El VIH ocasiona cuando menos un cuadro paradójico ya que junto a la destrucción masiva y mantenida de linfocitos CD4 ocasiona fenómenos de activación linfocitaria en todos los estadios evolutivos de la infección (activación de linfocitos B, de linfocitos CD8+, producción anormal de mediadores solubles, etc.). (Abbas, 2002).

El VIH infecta fundamentalmente las células T CD4 que son esenciales en la respuesta inmunitaria y además presenta estrategias de escape que actúan con gran eficacia (variabilidad genética, latencia-reactivación, existencia en santuarios-reservorios, etc.). In vivo el VIH tienen dos células diana principales: los linfocitos CD4 y los macrófagos de los tejidos.

Desde una visión meramente descriptiva, frente al VIH se produce una respuesta humoral y una respuesta celular, ambas con efectores específicos e inespecíficos. La infección VIH induce una respuesta intensa de Anticuerpos (Ac) (inmunidad humoral específica) frente a las proteínas estructurales y reguladoras del virus. Algunos de los Ac tienen carácter neutralizante y se piensa que podrían ejercer un efecto protector frente a la evolución progresiva de la enfermedad (Ac frente a gp41 y gp120), pero, en

contraposición, también se ha descrito Ac frente a la envoltura del VIH que tendrían la misión de facilitar su fagocitosis por las células del sistema monocito-macrófago lo que paradójicamente contribuye a la infección de los macrófagos y a facilitar la infección de nuevas células por el VIH, por lo que se dice que la respuesta inmune es adecuada pero llega un minuto tarde.

2.5 Tratamientos actuales contra el SIDA

En la actualidad existen diferentes tratamientos los cuales, aun cuando no eliminan el virus, tienden a detener su multiplicación y a frenar la destrucción de las células productoras de defensas, retrasando el comienzo de las enfermedades. Estos fármacos reciben el nombre de antiretrovirales. (Wikipedia.com, 2005).

Diferentes antiretrovirales actúan en varias etapas del ciclo vital del VIH. Varias combinaciones de tres o cuatro fármacos se conocen como Terapia Antiretroviral Altamente Activa, (HAART, por sus siglas en ingles). Gracias a esta terapia miles de enfermos infectados llevan a cabo vidas productivas; sin embargo, la durabilidad de HAART aun no se ha establecido, además los problemas tóxicos de los medicamentos, así como aquellos problemas normales de la edad no han permitido establecer un tratamiento continuo de esta terapia. (Uy J, 2004).

Los regímenes antiretrovirales son complejos, con posibles efectos colaterales serios, dificultad con la adherencia y potencial desarrollo de resistencia viral a causa de la no adherencia o niveles subóptimos de los agentes antiretrovirales.

Las combinaciones de antiretrovirales actúan incrementando el número de obstáculos para la mutación viral, manteniendo bajo el número de copias virales. Los agentes antiretrovirales no suprimen la infección por VIH a largo plazo, por lo cual deben usarse en combinaciones; estas pueden ser de sinergismo positivo o negativo. Esto limita el número de combinaciones posibles.

Fármacos antiretrovirales

En la Tabla 2 se presentan los fármacos inhibidores de la Transcriptasa inversa utilizados para el tratamiento del SIDA mientras que en la Tabla 3 se muestran los fármacos inhibidores de proteasa. (Wikipedia.com, 2005).

Tabla 2. Fármacos inhibidores de transcriptasa inversa

Inhibidores de transcriptasa inversa		
Inhibidores análogos Nucleósidos	Inhibidores de transcriptasa no-nucleósidos	Inhibidores de transcriptasa análogos de nucleótido
Zidovudina (AZT, ZDV): aprobado por FDA es tóxico	Nevirapina: Uso pediátrico.	Tenofovir: presenta menos toxicidad
Didanosina (ddI): tóxica dosis una vez al día.	Delavirdina: aprobado por FDA en 1997	Adefovir (bis-POM ó PMPA): posible asociación con daño renal, no autorizado
Abacavir (ABC): muestra hipersensibilidad.	Efavirenz: aprobado en 1998	
Stavudina (d4T): tóxica dosis una vez al día		

Tabla 3. Fármacos inhibidores de proteasa e inhibidores de fusión.

Inhibidores de proteasa	Inhibidores de fusión
Saquinavir: Presenta baja biodisponibilidad.	Enfuvirtide (T-20): disponible sólo en presentación inyectable, muy costoso (péptido).
Ritonavir: Asociado a gran cantidad de Efectos adversos	
Atazanavir: presenta menos toxicidad.	

En la actualidad se continúa con la búsqueda de fármacos que presenten menor toxicidad, que sean efectivos por extensos períodos de tiempo, que además su acceso sea sencillo y su efectividad factible para combatir el SIDA. De esta manera se investigan agentes nuevos, así como con fármacos conocidos que puedan ser utilizados para el tratamiento del SIDA, entre los que se encuentra la Hidroxicloroquina (HCQ).

2.6 Antecedentes directos

2.6.1 Hidroxicloroquina

La HCQ es una 9-aminoquinolina que se utiliza en el tratamiento de las enfermedades reumáticas, especialmente en la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico, desde principios de los años cincuentas. Contiene un grupo hidroxietil en el nitrógeno terciario de la cadena lateral de la Cloroquina lo cual hace que sea menos tóxica debido a su mayor polaridad, ya que puede ser eliminada más fácil que la Cloroquina. Es la más prescrita en los Estados Unidos en el tratamiento del lupus eritematoso. Se utiliza también en artritis reumatoide y en el tratamiento de erupciones cutáneas fotosensibles. (Craig, 1997), (Derendorf, 1995).

Este fármaco se deriva de la corteza del árbol peruano Cincona o Quina. Los agentes activos, la cinconina y la quinina, fueron aislados por Pelletier y Caventau en 1820. Posteriormente se desarrollaron la Cloroquina y la HCQ con el interés de minimizar la toxicidad de los antimaláricos. En 1959 Hobbs y asociados reconocieron que el tratamiento con estos fármacos durante un período largo de tiempo inducía toxicidad retiniana, lo que condujo a una disminución importante de su uso. (Martindale, 2003).

Actualmente se han realizado estudios sobre la toxicidad de la HCQ en pacientes en donde se ha obtenido que los casos de toxicidad son muy poco probables, o muy aislados; sin embargo, debemos tomar en cuenta la cantidad de variables que pueden entrar en los casos reportados de toxicidad.

2.7 Nomenclatura

2.7.1 Nombre químico

(7-cloro-4-[4-(N-etil-N-2-hidroxiethylamino)-1-metilbutilamino]quinolina. (Clarke, 2004).

2.7.2 Formula condensada

$C_{18}H_{26}ClN_3O$ (Clarke, 2004).

2.7.3 CAS

118-42-3 (Merck, 2001).

2.7.4 Peso molecular

335.9 g/mol.

2.7.5 Estructura química

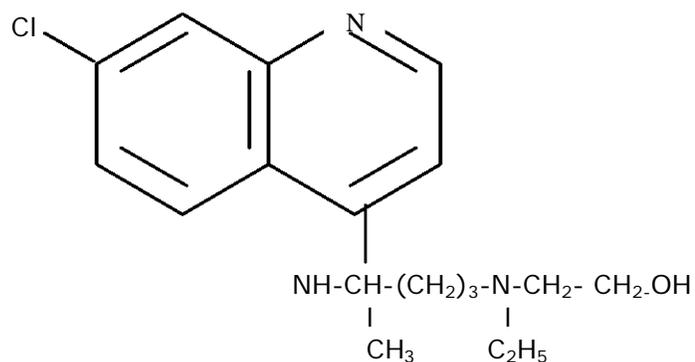


Figura 3. Estructura de la HCO (Clarke, 2004).

2.7.6 Descripción

Polvo cristalino blanco o casi blanco, inodoro o casi inodoro. Fácilmente soluble en agua; prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo y éter. Una solución acuosa al 1% tiene un pH entre 3.5 y 5.5. Proteger de la luz. (Martindale, 2003).

2.7.7 Coeficientes de disociación

pKa 8.4 y 10.2

2.7.8 Coeficiente de partición

LogP (Octanol/agua) = 3.0

2.8 Farmacocinética

Luego de su administración por vía oral, se absorbe a lo largo del tracto gastrointestinal, alcanzando niveles máximos de 2 a 4.5 horas con una media de 3.2 horas. Las concentraciones plasmáticas máximas del fármaco luego de la dosis oral (400 mg) oscilan entre 34 y 79 ng/mL.

La HCQ tiene una gran afinidad por tejidos, especialmente aquellos que contienen melanina, fijándose fuertemente a los mismos. Los enantiómeros de la HCQ y sus metabolitos se fijan de diferente forma a las proteínas plasmáticas. La vida media promedio de eliminación es de 32 días. La depuración de HCQ es de 96 mL/min. Después de la administración oral aproximadamente el 21% de HCQ se elimina en forma inalterada por vía renal. (Martindale, 2003).

2.9 Farmacodinamia

La HCQ presenta actividad antimalárica, también es efector en el tratamiento de lupus eritematoso (sistémico y discoide) y artritis reumatoidea aguda y crónica. El mecanismo de acción no se conoce, pero parece estar ligado a la elevación del pH intracitoplasmático, lo cual altera el ensamble de las cadenas y de las moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y de esta manera interfiere con el procesamiento antigénico y por tanto, disminuyen el estímulo autoinmune de la célula CD4+. Además inhibe la internalización y subsecuente degradación del complejo IL-2/IL-2R e inhibe la producción de IL-2 por interferir con la transcripción y liberación proteica. In vitro inhibe la producción de citocinas por células mononucleares de sangre periférica inducida por fitohemaglutinina y otros agentes. (Martindale, 2003).

2.10 Toxicidad

2.10.1 Signos y síntomas

La toxicidad retiniana de la cloroquina fue reportada inicialmente en 1957 por Cambiaggi, en un paciente con lupus eritematoso sistémico. Aunque inicialmente los hallazgos fundoscópicos fueron atribuidos al lupus eritematoso sistémico, los hallazgos histopatológicos reportados años más tarde, comprobaron la toxicidad; sin embargo, los casos de toxicidad por la ingestión de este fármaco son pocas en comparación con el número de personas que utilizan este medicamento durante períodos muy prolongados. Como se mencionó anteriormente la HCQ presenta mayor actividad y un riesgo de toxicidad mucho menor por lo que puede ser utilizado por largos períodos de tiempo, lo cual se demuestra en que actualmente la HCQ es uno de los fármacos de excelencia en el tratamiento de la artritis reumatoide y el lupus eritematoso. (Martindale, 2003).

El signo más temprano de toxicidad es la presencia asintomática de pigmento granular perifoleal asociado a pérdida del brillo foveal. Esto puede progresar a alteraciones pigmentarias más prominentes o a la configuración de "ojo de buey". La periferia de la retina también puede presentar una granularidad pigmentaria no específica asociada a una pérdida del reflejo foveal. En casos avanzados de toxicidad la apariencia de la retina puede parecer una degeneración tapetoretiniana avanzada con degeneración pigmentaria difusa, palidez del nervio óptico y atenuación vascular, dando una apariencia similar a la observada en pacientes con retinitis pigmentosa. (Martindale, 2003).

2.10.2 Mecanismos de toxicidad

El mecanismo por el cual estos fármacos producen toxicidad es desconocido. La cloroquina y la HCQ se unen a la melanina y por lo tanto se concentran en la uvea y el epitelio pigmentario. Los factores que pueden influir en el desarrollo de la toxicidad podrían incluir inhibición enzimática e interferencia con funciones metabólicas de las células del epitelio pigmentario de la retina y/o fotorreceptores.

La retención prolongada del fármaco en estos tejidos, probablemente es la responsable de la progresión de la retinopatía o a la aparición de la retinopatía de inicio tardío a pesar de haberse suspendido el consumo del fármaco. Pequeñas cantidades de estos fármacos pueden ser detectadas hasta cinco años después de ser suspendidas. (Martindale, 2003).

**" Sueño con los ojos abiertos,
puede que pienses que estoy loco
porque me creo lo que sueño"**

Jarabe de palo.

Capítulo 3

Parte experimental

3. Parte experimental

3.1 Sustancia de referencia

Sulfato de Hidroxicloroquina USP ; 100 mg de sulfato de HCQ equivalen a 77 mg de HCQ base libre.

3.2 Reactivos

- ◆ Acetonitrilo HPLC Mallinckrodt
- ◆ Metanol HPLC Mallinckrodt
- ◆ Fosfato de potasio monobásico RA Baker
- ◆ Ácido fosfórico RA Fisher scientific
- ◆ Cloroformo HPLC J. T. Baker
- ◆ Agua HPLC obtenida de un equipo Milli-Q Waters system

3.3 Equipo

- Centrífuga Eppendorf modelo 5416
- Sonicador Fisher scientific modelo Transonicc 700/H
- Balanza analítica Sartorius modelo A210P
- Potenciómetro Orion Research 410 A PLUS
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu consistente en:
 - Bomba Shimadzu LC-10AS modelo 40351A
 - Automuestreador Shimadzu SIL-10AL modelo 70042G
 - Detector UV-VIS Shimadzu SPD-10AV modelo 40071D
 - Controlador Shimadzu SCL-10 modelo 60058ER
 - Software Class VP
- Columna Spherisorb C-18 de 4.5 x 250 mm de longitud con tamaño de partícula interna 5 µm. Waters.

3.4 Soluciones

- ❑ Hidróxido de sodio 1.0 N
- ❑ Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 3.0
- ❑ Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.5
- ❑ Solución de ácido fosfórico 1:100

3.5 Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 3.0

Pesar con exactitud 13.61 g de fosfato monobásico de potasio, transferirlo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar al matraz aproximadamente 300 mL de agua desionizada, agitar vigorosamente para solubilización del fosfato, posteriormente llevar a volumen con agua desionizada, filtrar la solución de fosfatos con membrana para solventes acuosos de 0.45 μ m. Dividir esta solución en dos porciones de 500 mL cada una aproximadamente, ajustar el pH de las soluciones de la siguiente forma:

Solución A de fosfatos: Ajustar el pH de la solución a un valor de 3.0 con la solución de ácido fosfórico 1:100.

Solución B de fosfatos: Ajustar el pH de la solución a un valor de 2.5 unidades con la solución de ácido fosfórico 1:100.

3.6 Fase móvil ACN: Solución amortiguadora de fosfatos (0.1M pH 3.0) (25:75 v/v).

Para preparar un litro de fase móvil se requieren 250 mL de ACN grado HPLC previamente filtrado y 750 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 3.0.

Agregar siempre el ACN a la solución amortiguadora de fosfatos.

Desgasificar la solución durante 15 minutos por cada litro de fase móvil.

3.7 Preparación de la curva patrón de HCQ

Solución de HCQ 1 [200µg/mL]

Pesar con exactitud lo equivalente a 0.020 g HCQ previamente secado durante dos horas a 105° C, transferirlo cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL disolverlo con agua desionizada y aforar con el mismo disolvente.

Solución stock de HCQ [2 µg/mL]

Tomar 1 mL de la solución HCQ 1 y transferirlo cuantitativamente a un matraz de 100 mL, disolverlo en buffer de fosfatos pH 2.5 0.1 M llevar a volumen con la misma solución amortiguadora.

Preparación de la curva en plasma

Concentración 1 [200 ng/ml]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 1 mL de la solución stock de HCQ y llevar volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

Concentración 2 [400 ng/mL]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 2 mL de la solución stock de HCQ y llevar a volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

Concentración 3 [600 ng/mL]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 3 mL de la solución stock de HCQ y llevar a volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

Concentración 4 [800 ng/mL]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 4 mL de la solución stock de HCQ y llevar a volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

Concentración 5 [1000 ng/mL]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 5 mL de la solución stock de HCQ y llevar a volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

Concentración 6 [1200 ng/mL]: Depositar en un matraz volumétrico de 10 mL, 6 mL de la solución stock de HCQ y llevar a volumen con plasma, tapar el matraz y agitar en vortex para homogeneizar la solución.

3.8 Obtención de muestras

3.8.1 Sangre periférica

Se procedió a limpiar el área del pliegue del brazo con la torunda con alcohol. Se colocó una liga y se localizó la vena a puncionar. Se puncionó la vena con una jeringa de 10 mL con aguja del número 21 y se obtuvieron dos frascos de sangre con anticoagulante EDTA de 5mL de capacidad. Se retiró la liga y se retiró la jeringa. Se colocó apósito y se dobló el brazo durante 5 minutos. Estos 2 tubos con la muestra de sangre fueron llevados al laboratorio para centrifugarlos y obtener únicamente el plasma, para posteriormente colocarlo en otros tubos y congelarlo inmediatamente en

nitrógeno líquido en espera de ser llevadas al laboratorio para su determinación de concentración de HCQ.

3.8.2 Tejido adenoide

Se realizó una rinoscopía anterior a cada paciente para comprobar la permeabilidad de la fosa nasal para realizar endoscopia rígida. Se colocó al paciente en decúbito supino y se procedió a colocar anestesia en cada cavidad nasal con taponamiento nasal anterior con algodones embebidos en oximetazolina y lidocaína al 2%. Con esto se logró vasoconstricción de los cornetes y la anestesia local se dejó por 5 minutos y luego se retiró.

Se realizó una revisión endoscópica rígida de nasofaringe para comprobar la presencia de tejido adenoideo. Se realizó la endoscopia con un endoscopio de 4 mm a 0° (Kart Storz/Hopkins II/BWA 28721). Luego se introdujo endoscópicamente un hisopo impregnado con lidocaína al 2% sobre el tejido adenoideo para aplicarlo tópicamente y permanece por 3 minutos concluidos estos se retira. Se procedió a tomar la biopsia guiada por endoscopio de tejido adenoideo con una pinza para biopsia endoscópica de copas de 3 mm (Xomed-Treace 18-80213). Luego de la toma de biopsia se comprobó que no hubiera sangrado y en caso de dolor se dejó antiinflamatorio por 3 días posteriores a la toma de la biopsia. El tejido obtenido se colocó en pequeños contenedores plásticos a los cuales previamente se les había determinado el peso exacto en una báscula especial, y luego ya con el tejido nuevamente se volvieron a pesar y al obtener la diferencia entre los dos se pudo obtener el peso exacto del tejido adenoideo biopsiado. Estos contenedores plásticos fueron congelados inmediatamente después en nitrógeno líquido en espera de ser enviados para su determinación de concentración de hidroxycloquina.

3.9 Método de extracción

En la Figura 4 Se presenta el método de extracción empleado para la cuantificación de las muestras plasmáticas.

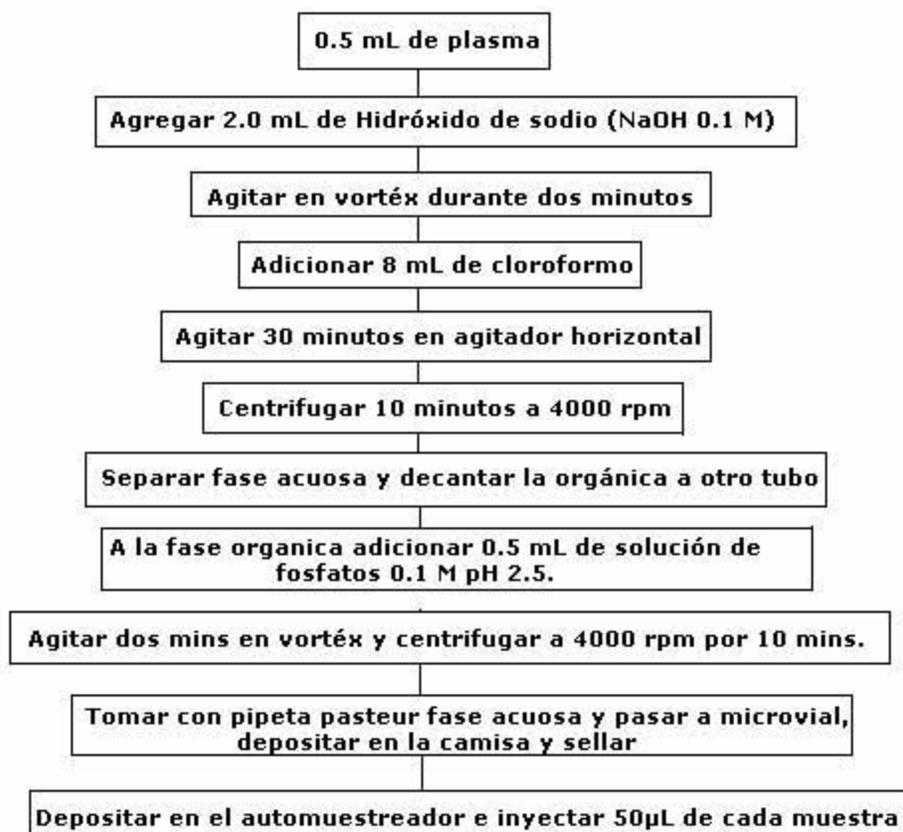


Figura 4. Procedimiento de extracción de HCQ del plasma

Este proceso tiene como paso crítico la decantación de la fase orgánica cuando se retira la fase acuosa pues en el tubo permanecen proteínas inherentes al plasma que deben ser retiradas para evitar su interferencia con la extracción; es decir la fase orgánica se transfiere a otro tubo dejando en el tubo anterior la capa protéica.

3.9 Método de extracción de HCQ en tejido linfoide.

Para el procesamiento de muestras de tejido linfoide fue necesario homogeneizar la muestra con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 2.5 para posteriormente seguir el procedimiento utilizado para las muestras de plasma. La fase orgánica se decanta para evitar la interferencia de las proteínas del plasma. Posteriormente de la homogeneización se realiza la extracción que se describe en el apartado **3.8**.

3.9.1 Homogenado de tejido adenoideo.

Se le adiciona a cada biopsia de tejido (cuyo peso oscila entre 2-20 mg) 200 μ L de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 3.0 y se homogeniza durante 5 minutos en homogenizador Fisher Scientific con pistilo para tubo eppendorf, la muestra de tejido debe estar dentro de un recipiente con hielo para evitar el calentamiento del tubo contenedor.

3.10 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma.

3.10.1 Linealidad del método

Se prepararon tres curvas patrón independientes de HCQ a las siguientes concentraciones 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 ng/mL.

Se calculó la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

Criterio de aceptación: La linealidad del método debe tener un coeficiente de regresión mayor o igual a 0.99.

3.10.2 Precisión del método

3.10.2.1 Repetibilidad del método

Este parámetro se evaluó con 3 puntos control con las concentraciones de 300, 700 y 1100 ng/mL analizándolos por quintuplicado, obteniendo el coeficiente de variación para cada punto.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15% para análisis cromatográficos.

3.10.2.2 Reproducibilidad del método

Este parámetro se evaluó con 3 puntos control con las concentraciones de 300, 700 y 1100 ng/mL analizándolos por duplicado durante tres días, obteniendo el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe exceder el 15%.

3.10.3 Exactitud del método

Con los datos de precisión (reproducibilidad y repetibilidad) se obtuvo el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración, a partir de estos datos se obtuvo el porcentaje con respecto al valor nominal de concentración.

Criterio de aceptación: El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de precisión deben estar dentro del 15% del valor nominal de concentración.

3.10.4 Recobro absoluto

Se preparó una curva patrón de HCQ en solución a las siguientes concentraciones 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 ng/mL. Así mismo se prepararon tres curvas patrón en plasma y se empleó el método descrito en la sección 3.8. Las muestras se inyectaron al cromatógrafo y se determinó la respuesta empleando áreas. Para cada nivel de concentración se calculó el % de recuperación absoluta empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recobro absoluto} = \text{promedio Rp} / \text{promedio Rs} * 100$$

Donde Rp = Respuesta plasma (área) y Rs = Respuesta en solución (área)

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no debe variar en $\pm 15\%$ para cada nivel evaluado en plasma con respecto a los valores obtenidos de las muestras en solución, excepto para el punto más bajo en donde el porcentaje de recobro no debe variar en $\pm 20\%$. El CV % del área para cada nivel no debe ser mayor al 15%.

3.10.5 Estabilidad

Para evaluar la estabilidad, se prepararon puntos control por quintuplicado a las siguientes concentraciones 300, 700 y 1100 ng/mL. Las muestras se cuantificaron el primer día de análisis y se sometieron a congelación cuatro muestras de cada nivel. Dos de ellas se cuantificaron a los quince días posteriores al primer día de análisis y las dos restantes a los treinta días después del primer día de análisis.

Criterio de aceptación: El fármaco es estable si para cada nivel de concentración el promedio de las concentraciones obtenidas a cada tiempo no difieren de 15% del valor obtenido al tiempo cero y si el coeficiente de variación no es mayor al 15%.

3.10.6 Límite de cuantificación

Para esta prueba se analizó por triplicado un blanco de plasma; se calculó la respuesta del ruido que presentaba cada muestra y se obtuvo un valor promedio que debe ser multiplicado por cinco veces para interpolarlo en una curva recién preparada y obtener el valor mínimo cuantificable en nuestro método.

3.11 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en tejido linfoide.

La obtención de tejido linfoideo se realiza a partir de una biopsia; para realizar este procedimiento se requiere de la aprobación del paciente pues involucra el uso de un anestésico y una pinza quirúrgica; sin embargo, este método es muy complicado, por lo cual no se logro contar con las muestras necesarias de pacientes sanos como para llevar a cabo una validación de un método analítico, así que se determinó realizar la linealidad de una curva patrón de tejido linfoide para demostrar que la respuesta presenta cambios de acuerdo al cambio de concentraciones, se obtuvo la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación.

Es necesario acotar que en el análisis de muestras de tejido adenoideo no se completaron los requerimientos mínimos para llevar a cabo una validación, pero se analizaron las muestras con un solo objetivo, observar los niveles de concentración de la HCQ en tejido linfoide; pues como se menciona al inicio de este trabajo se propone la posibilidad de utilizar este fármaco como un posible agente inmunomodulador para lo cual se requiere una evidencia de la presencia o ausencia de la HCQ en este tejido pues esta prueba permitirá especular sobre su uso en el tratamiento del SIDA.

3.12 Estudio in vivo

3.12.1 Análisis de muestras de pacientes bajo tratamiento con HCQ

Población de estudio: se encuentra conformada por un grupo de pacientes pertenecientes al Centro de }investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) y a la clínica de infectología del INER con diagnóstico de VIH positivos documentados por ELISA y Western Blot que fueron referidos durante el período entre Abril y Agosto del 2005 de acuerdo con los criterios de inclusión establecidos por el Departamento de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del INER y por la clínica de infectología del INER.

Se manejaron los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes VIH positivos
- Mayores de 18 años de edad
- Ambos géneros
- Sin HAART (Terapia Antiretroviral de Alta Eficiencia)
- Sin criterios de infección de nariz y senos paranasales
- Sin infecciones oportunistas activas o neoplasias
- Sin interrupción del tratamiento con Hidroxicloroquina

Criterios de exclusión:

- Que tengan diagnóstico de SIDA

Criterios de eliminación:

- ◆ Que retiren su consentimiento informado
- ◆ Que no cumplan con el tratamiento

Consideraciones éticas

Este protocolo fue sometido a revisión y aprobación por el Comité Científico de la Dirección de Investigación y por el Comité de Bioética del INER. Se les explicó a los sujetos legibles acerca de los procedimientos de rutina a realizar y de la toma de biopsia de adenoides y fueron informados de la justificación y objetivos de la investigación. Todos aceptaron y firmaron el consentimiento informado y así pudieron participar en el estudio y se les proporcionó una hoja con la Declaración de los Derechos de las Personas en Experimentación.

Metodología

A los 10 pacientes seleccionados se les entregó un consentimiento informado. Al haber aceptado este se procedió a aleatorizar en dos grupos diferentes con el mismo número de individuos para recibir una de las dos dosis de HCO. Los pacientes tomaron los medicamentos durante siete días consecutivos a dosis de 400 mg diarios; el primer grupo y 800 mg diarios el segundo grupo. Al finalizar la semana se procedió a tomar una biopsia de tejido adenoideo y una muestra de sangre periférica para cuantificar en ambas las concentraciones del medicamento y luego compararlas. Todos los pacientes fueron evaluados por un mismo médico y cada paciente por separado en el área de la consulta externa del Departamento de Otorrinolaringología. Una enfermera estuvo presente durante la valoración para asistir al médico, además se verificó que el material utilizado fuera adecuadamente organizado y desinfectado, de acuerdo a las normas universales para la prevención de la transmisión de enfermedades infectocontagiosas. Se utilizaron todas las medidas de protección recomendadas para el manejo de estos pacientes (guantes desechables, mascarilla, lentes protectores y campos limpios para cada paciente).

Las muestras se cuantificaron siguiendo el procedimiento descrito en 3.8 y 3.9.

**"Shine on you people of the earth,
try to make it right,
love is the way"**

Zoé.

Capítulo 4

Resultados

4. Resultados

En la Figura 6 se muestra un blanco obtenido en plasma y en la Figura 7 se muestra el cromatograma típico obtenido para la cuantificación de HCQ en plasma, se muestran ambos para comparar la respuesta de la muestra cuando tiene HCQ (muestra) y cuando no (blanco).

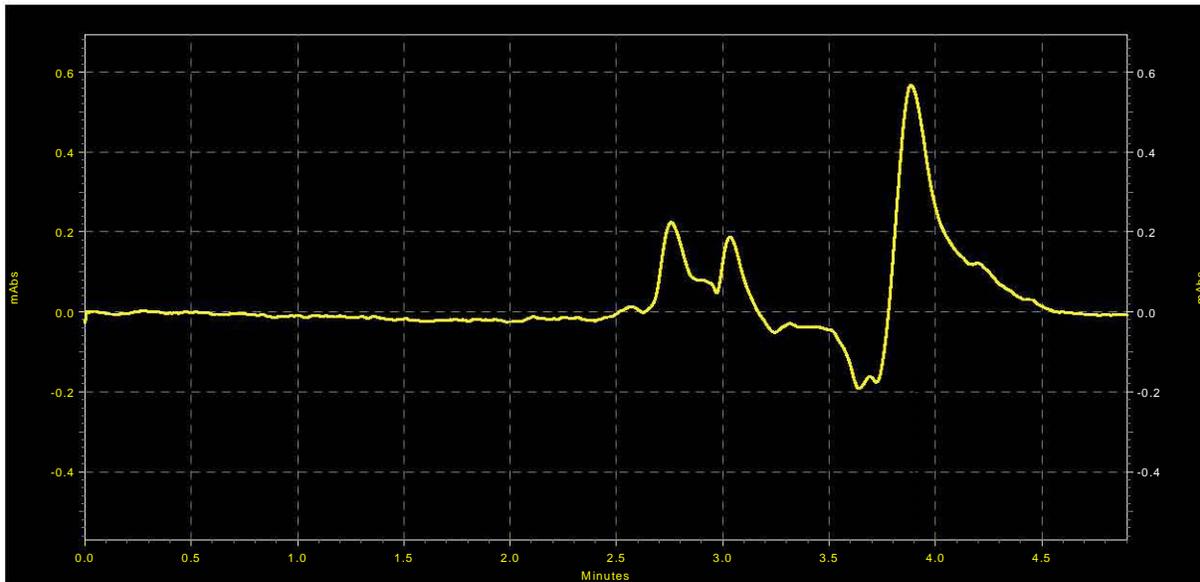


Figura 6. Cromatograma blanco de plasma.

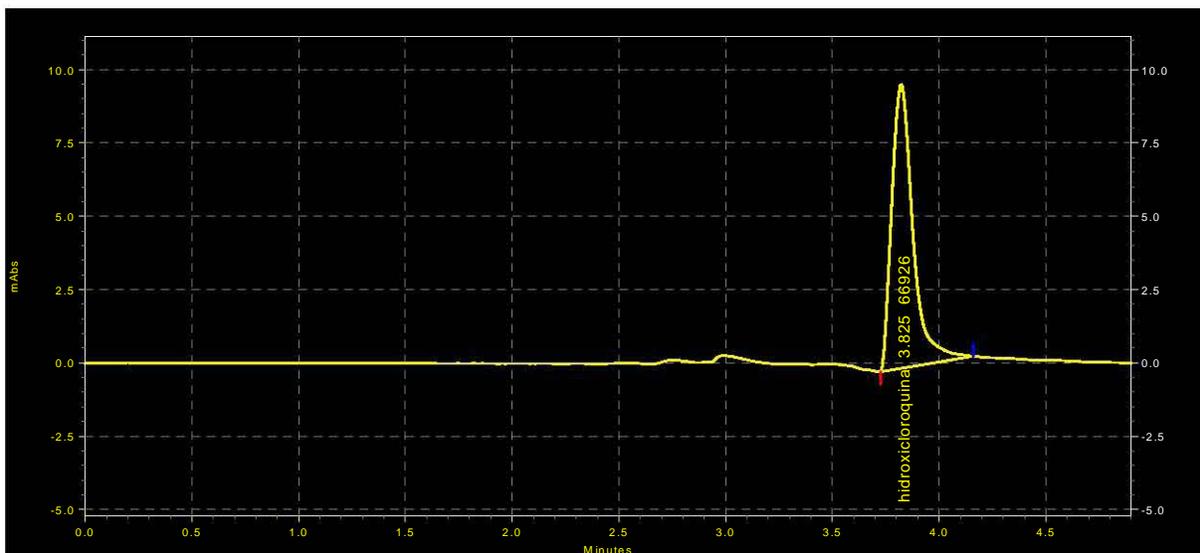


Figura 7. Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en plasma.

En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido para un blanco en tejido adenoide, mientras que en la Figura 9 se muestra un cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en tejido adenoideo.

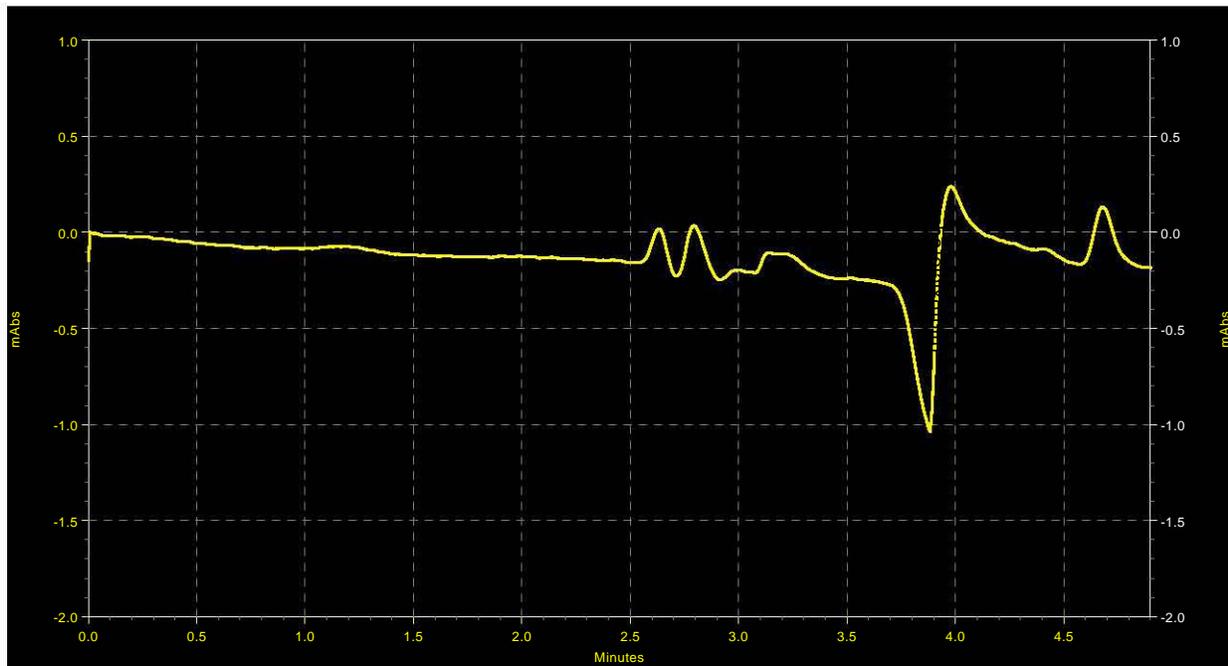


Figura 8 Blanco de tejido adenoide.

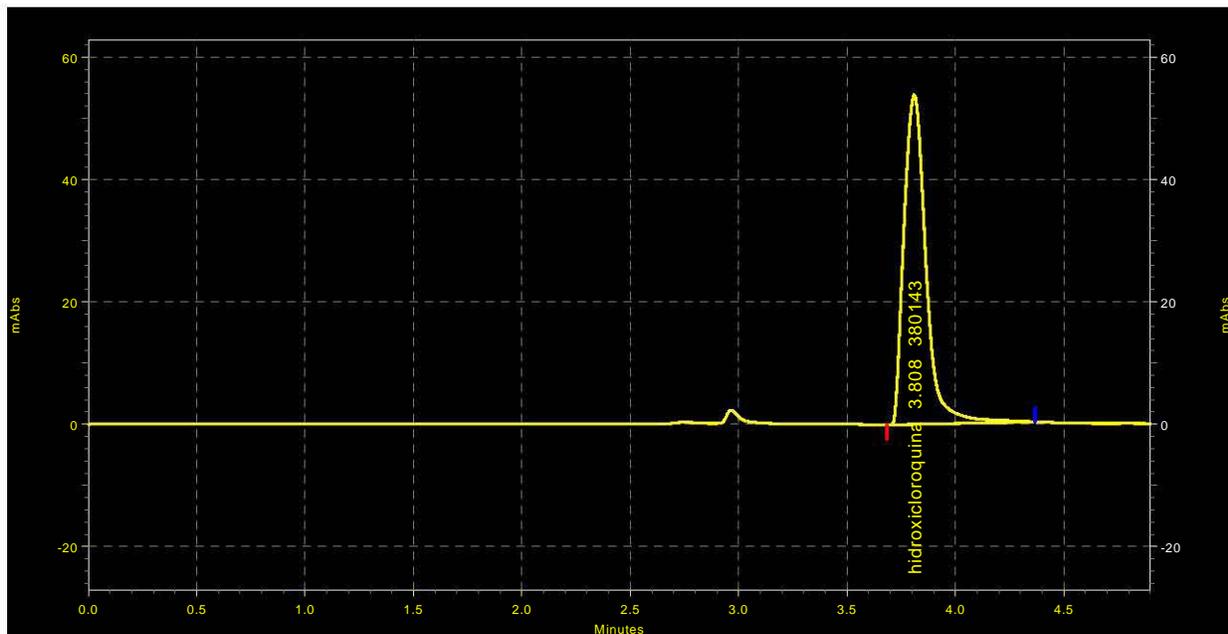


Figura 9. Cromatograma típico para la cuantificación de HCQ en tejido linfoide.

4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma.

4.1.1 Linealidad, Precisión y Exactitud

En la Tabla 4 se presentan los resultados de la linealidad del método; con sus valores respectivos de pendiente, intercepto y coeficiente de correlación. La Figura 7 muestra las curvas obtenidas. En la Tabla 5 se muestran los valores de precisión del método, medido como coeficiente de variación por ciento. Los valores de reproducibilidad se muestran en la Tabla 6 determinado como coeficiente de variación por ciento.

Tabla 4. Linealidad del método de cuantificación de HCQ en plasma.

Punto	Concentración ng/mL	Respuesta Curva 1	Respuesta Curva 2	Respuesta Curva 3	Promedio Respuestas
1	200	33593	32666	32513	32924
2	400	60731	61592	62683	61669
3	600	97507	96527	95947	96660
4	800	118512	120004	103275	113930
5	1000	143977	147575	147944	146499
6	1200	183524	163840	176082	174482
Pendiente (m)		145.8	133.9	140.1	139.9
Ordenada al origen		4267.5	9971.1	4978.4	6405.7
Coeficiente de correlación		0.997	0.995	0.991	0.998

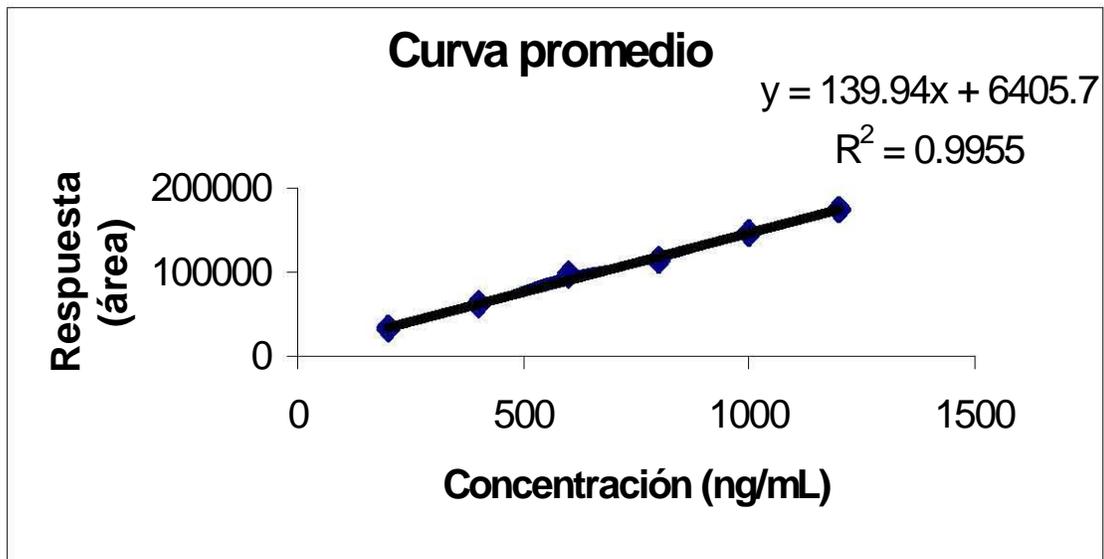


Figura 10. Curva promedio obtenido para linealidad del método en muestras plasmáticas.

Precisión del método

Tabla 5. Repetibilidad del método para la cuantificación de HCO en pla

Punto	Concentración (ng/mL)	Respuesta Curva 1	Respuesta Curva 2	Respuesta Curva 3	Promedio	Desv. Est.	C.V.
1	200	33593	32666	32513	32924	584.4	1.8
2	400	60731	61592	62683	61669	978.3	1.6
3	600	97507	96527	95947	96660	788.5	0.8
4	800	118512	120004	103275	113930	9257.9	8.1
5	1000	143977	147575	147944	146499	2191.6	1.5
6	1200	183524	163840	176082	174482	9939.1	5.7

Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar HCQ en plasma.

	Tiempo	Replica	Concentración Interpolada	% Diferencia relativa	
	Punto control 1 300 ng/mL	Primer Día	1	308	2.67
2			303	1.00	
Segundo Día		1	308	2.67	
		2	307	2.33	
Tercer Día		1	298	0.67	
		2	303	1.00	
Resultados globales		Promedio		305	
		Desv. Est		3.94	
		C.V.		1.29	

Punto control 2 700 ng/mL	Primer Día	1	708	1.14	
		2	700	0	
	Segundo Día	1	707	1.00	
		2	700	0	
	Tercer Día	1	706	0.86	
		2	685	2.14	
	Resultados globales	Promedio		701	
		Desv. Est		8.58	
		C.V.		1.22	
	Punto control 3	Primer Día	1	1100	0
2			1042	5.27	
Segundo Día		1	1100	0	
		2	1042	5.27	
Tercer Día		1	1023	7	

1100 ng/mL	Día	2	1002	8.9
	Resultados globales	Promedio	1051.5	
		Desv. Est	40.36	
		C.V.	3.8	

4.1.2 Exactitud y Recobro

La exactitud del método medido como porcentaje de diferencia relativa, se presenta en la Tabla 7, los valores promedio de recobro absoluto se presentan con su respectiva desviación estándar se presentan en la Tabla 8.

Tabla 7. Exactitud del método de cuantificación de HCQ en plasma.

Día	Replica	Identificación de la muestra		
		PC1	PC2	PC3
		Concentración teórica de HCQ (ng/mL)		
		300	700	1100
		Concentración cuantificada de HCQ		
1	1	320	708	1100
	2	308	700	1042
	3	307	700	1034
	4	307	701	1038
	5	316	677	1015
	Promedio	312	697	1046
	Desv. Est.	6.02	11.78	32.02
	C.V.	1.93	1.69	3.06
	% Diferencia relativa	4.0	0.43	4.91

Día	Replica	Identificación de la muestra		
		PC1	PC2	PC3
		Concentración teórica de HCQ (ng/mL)		
		300	700	1100
		Concentración cuantificada de HCQ		
2	1	308	706	1112
	2	312	703	1121
	Promedio	310	705	1117
	Desv. Est.	2.83	2.12	6.36
	C.V.	0.9	0.3	0.57
	% Diferencia relativa	3.3	0.7	1.55

3	1	305	735	1098
	2	308	702	1065
	Promedio	307	719	1082
	Desv. Est.	2.12	23.33	23.33
	C.V.	0.69	3.25	2.16
	% Diferencia relativa	2.33	2.71	1.64
Resultados Globales	Promedio	310	704	1069
	Desv. Est.	4.94	14.81	39.05
	C.V.	1.59	2.10	3.65
	% Diferencia relativa	3.3	0.57	2.82

Tabla 8. Recobro absoluto de HCO en plasma

Recobro 1	Recobro 2	Recobro 3	Promedio	Desv. Est.	C.V.
91.6	89.0	88.6	89.8	1.59	1.77
84.0	85.2	86.7	85.3	1.35	1.59
97.6	96.6	96.0	96.7	0.79	0.82
91.4	92.6	79.7	87.9	7.14	8.13
87.1	89.3	89.5	88.67	1.33	1.50
91.7	81.9	88.0	87.17	4.97	5.70

4.1.3 Estabilidad de HCO en plasma

En la Tabla 9 se muestran los resultados de estabilidad a 30 días, a una temperatura de -20° C.

Tabla 9. Estabilidad de HCO en plasma a 30 días.

	Tiempo	Replica	Concentración	% Diferencia relativa
Punto control 1 300 ng/mL	0 días	1	308	-----
		2	307	-----
	15 días	1	308	0.02
		2	303	1.16
	30 días	1	285	6.75
		2	250	17.03
Punto control 2 700 ng/mL	0 días	1	708	-----
		2	700	-----
	15 días	1	706	0.25
		2	685	2.03
	30 días	1	651	7.63
		2	600	13.78
	0 días	1	1100	-----
		2	1042	-----

Punto control 3 1100 ng/mL	15 días	1	1024	6.75
		2	1002	3.77
	30 días	1	967	11.80
		2	935	10.08

4.1.4 Límite de cuantificación

En la Tabla 10 se muestran los valores de respuesta obtenidos de las muestras blanco. Al interpolar el valor de la curva de calibración, el límite de cuantificación encontrado fue de 141 ng/mL.

Tabla 10. Límite de cuantificación.

	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3	Promedio
Respuesta (área)	5528	4428	4928	4961.33

4.1.5 Análisis de muestras de pacientes

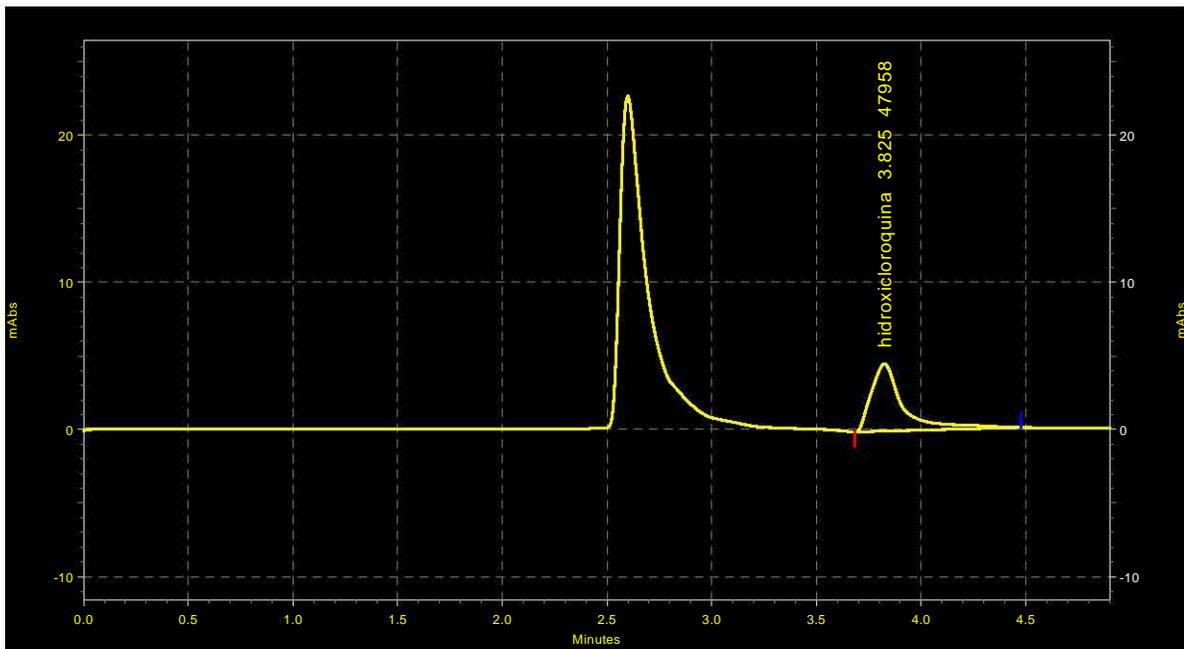
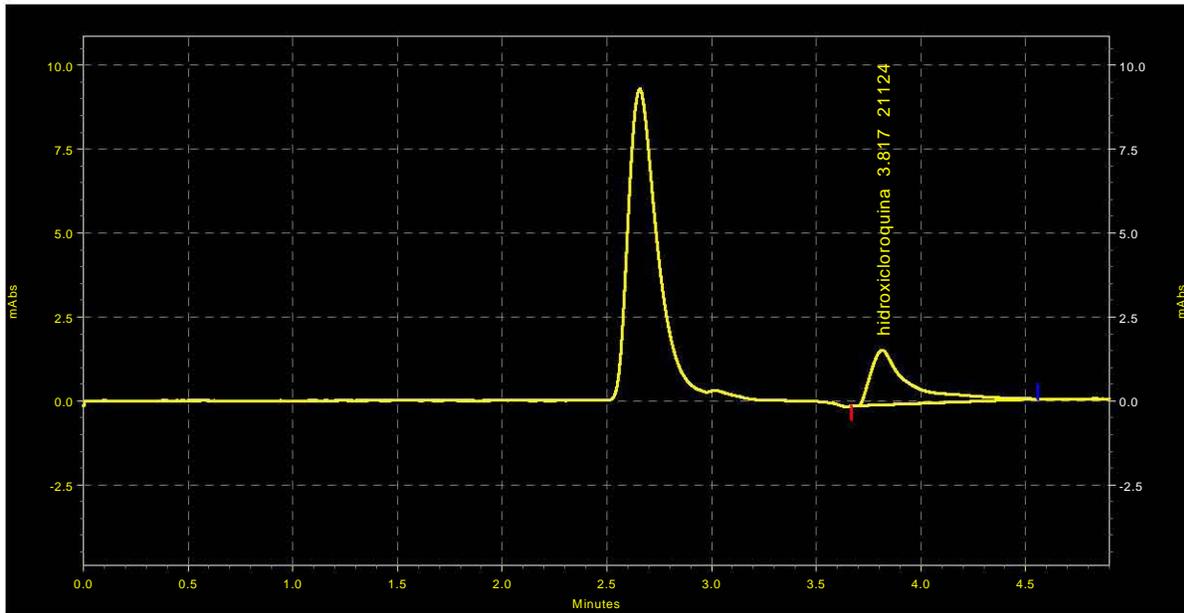
En la Tabla 11 se muestran los valores de concentración plasmática de los pacientes que participaron en el estudio. Los valores de concentración en el tejido linfoide se presentan en la Tabla 12. La relación tejido linfoide/plasma se presentan en la Tabla 13.

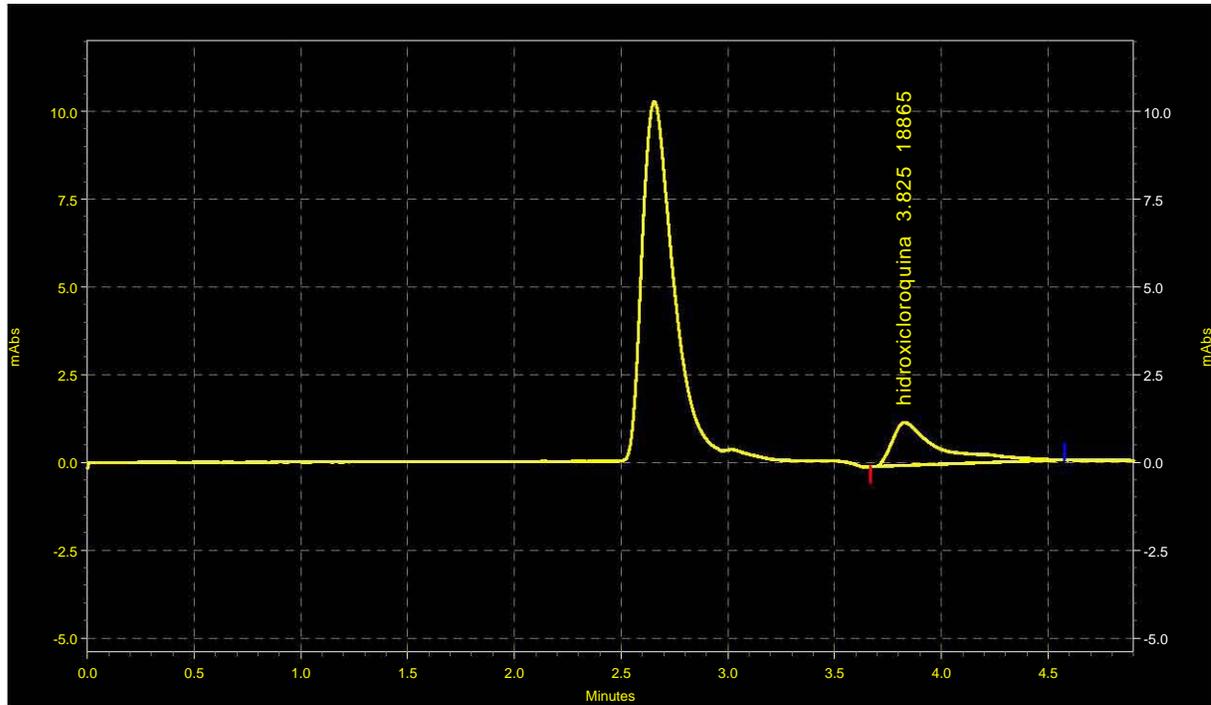
Tabla 11. Concentración plasmática de HCQ en pacientes con VIH

Identificación de la muestra	Área	Concentración Interpolada
HCQ-11	39760	370
HCQ-16	38140	354
HCQ-21	47958	456
HCQ-27	27987	248
HCQ-31	21124	176
HCQ-36	28157	249
HCQ-41	18865	153
HCQ-46	33083	300

A continuación se muestran cromatogramas de la cuantificación de muestras plasmáticas

Figura 11, 12 y 13 Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de muestras plasmáticas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.



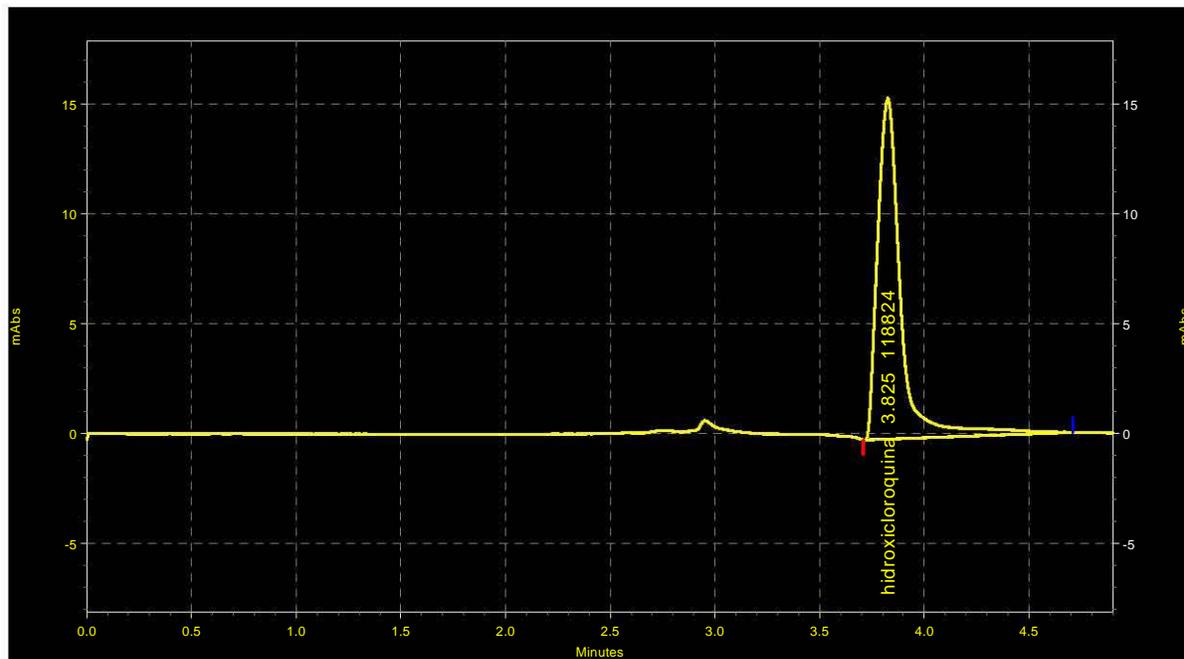
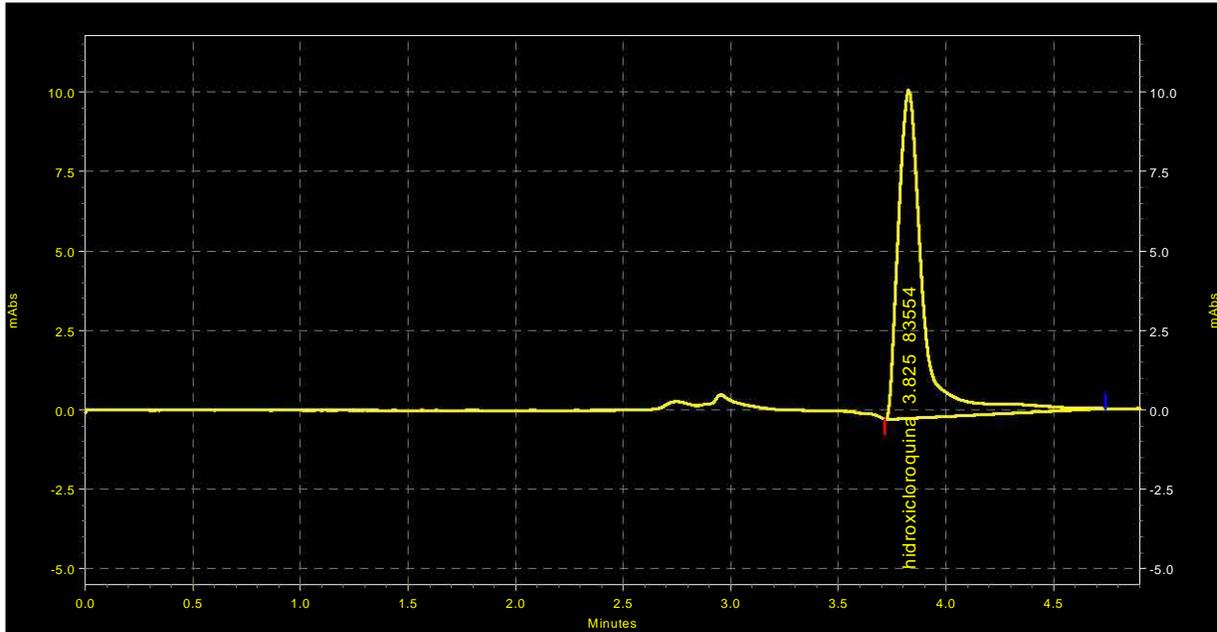


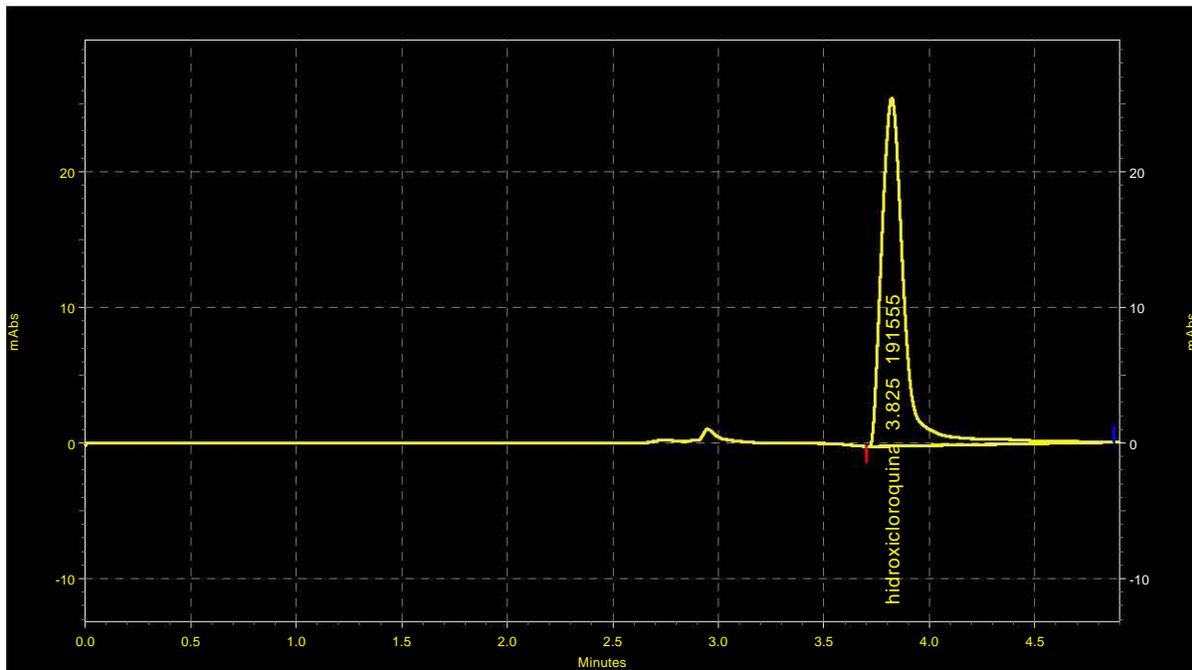
Resultado de la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide proveniente de pacientes enfermos de VIH-1.

Tabla 12. Resultado de la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide.

Identificación de la muestra	Área	Concentración Interpolada (g de HCQ/g tejido)
HCQ-01	3448	1.067
HCQ-03	1073	0.778
HCQ-05	852	0.979
HCQ-06	827	0.140
HCQ-11	4975	2.827
HCQ-13	1195	0.715
HCQ-15	1752	0.727
HCQ-17	2014	1.060
HCQ-19	1953	2.034

En las Figuras 14,15 y 16 se muestran los cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide.





Figuras 14, 15 y 16 Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide.

Tabla 13. Relación de HCQ en sangre y tejido linfoide de los pacientes bajo estudio.

Paciente	Dosis (mg/d)	HCQ plasma (ng/mL)	HCQ Adenoides ng/g	Proporción en niveles
LMGC	400	394	106743	1:271
GJG	400	475	97883	1:206
VMGC	400	152	71534	1:471
LSJCH	400	328	72678	1:222
JCDO	800	378	77784	1:206
JGG	800	277	282693	1:1021
CHCB	800	279	105993	1:380
JAAR	800	209	203419	1:973

**“ Y así podrán pasar lo años; y yo tomar mil
direcciones, se que he dejado un mundo
atrás siguiendo siempre un ideal,
como un valiente cazador de las estrellas”**

Capítulo 5.

Discusión de resultados

5. Discusión de resultados

5.1 Sistema cromatográfico.

Se desarrolló un método para la cuantificación de HCQ basado en la absorción de la molécula al UV. Para ello se probaron diferentes fases móviles hasta encontrar aquella que no interfería con la absorción de la molécula, la cual consistió en ACN : solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 2.5 (75:25), en la Figura **11,12 y 13** se muestran cromatogramas típicos de la cuantificación de HCQ; en los cuales se observa un coleo, el cual es característico de las bases (como la HCQ). Para disminuir el coleo era posible añadir, un modificador de fase, sin embargo dado que esto tenía un efecto sobre la vida útil de la columna se decidió después de varias pruebas no utilizarlo.

5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en plasma

5.2.1 Cromatogramas típicos para la cuantificación de HCQ en plasma y tejido linfoide.

En la Figura **6** se puede observar que no existe interferencia de las proteínas del plasma en la respuesta de HCQ. El tiempo de retención se encontró entre 3.5-3.7 minutos lo cual ayudó a que los tiempos de corrida fueran cortos y también disminuyó el gasto de fase móvil. En la Figura **7** se presenta la respuesta en el tejido adenoide en la que se observa un pequeño pico a los 3.0 minutos, sin embargo este no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de interés.

5.2.2 Linealidad del método en plasma

En la Tabla **4** se muestran los resultados obtenidos para la linealidad del método; como se puede observar las curvas presentan un coeficiente de correlación mayor al 0.98%; en las Figuras **8** se observa que la respuesta es lineal en el rango de concentraciones, 200, 400, 600, 800, 1000 y 1200 ng/mL.

5.2.3 Precisión del método

En la Tabla 5 se puede observar que ninguna concentración excede el 15% de coeficiente de variación lo que indica que el método presenta concordancia entre los valores obtenidos y los valores reales; con lo que se demuestra que el método es preciso.

5.2.4 Reproducibilidad del método

En la Tabla 6 se presentan los resultados para la reproducibilidad del método; en ellos se observa que el C.V. para cada día de análisis y para cada nivel probado no excede el 15% de variación, por lo que método es reproducible en diferentes días. Así mismo se puede ver que los porcentajes de diferencia relativa obtenidos para cada día de análisis también son bajos por lo que comprueba que el método es capaz de cuantificar estas concentraciones de una forma precisa.

5.2.5 Exactitud del método

En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas realizadas durante tres días distintos. En ella se puede observar que el porcentaje de diferencia relativa no excede el 15% al valor nominal, lo que indica que el método es exacto.

5.2.6 Recuperación absoluta

En la Tabla 8 se muestran los resultados de recuperación absoluta; para esta prueba se analizaron tres curvas distintas preparadas de manera independiente en plasma y se comparo con aquella encontrada en solución, a los mismos niveles de concentración . como se puede observar los valores de recobro para cada nivel de concentración son mayores al 75% y son reproducibles para cada nivel probado, por lo que el método de extracción es adecuado.

5.2.7 Estabilidad de la muestra en plasma.

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la estabilidad de muestras plasmáticas almacenadas a una temperatura de **-20° C**. En ella se observa que la muestra es estable a 15 y 30 días pues no excede el 15% de diferencia con respecto al valor nominal para las muestras entre un rango de 300 a 1100 ng/mL.

5.2.8 Límite de cuantificación

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para tres muestras blanco; el valor promedio fue extrapolado en una curva de calibración recién preparada y se obtuvo el valor mínimo cuantificable para nuestro método analítico.

Para la curva cuantificada en esta sesión se obtuvieron:

$$m = 145.77 ; b = 4267.5$$

$$x = (y - b) / m; \quad x = (4961.33 - 4267.5) / 145.77 = 4.79 \text{ ng/mL}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos para los blancos podemos observar que límite de cuantificación es de 141 ng/mL. Dado que este es un valor muy cercano al punto más bajo de la curva de calibración (200 ng/mL) se recomienda mantener el rango de concentraciones empleadas en la validación del método.

5.3 Estudio in vivo

5.3.1 Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.

En la Tabla **11** se encuentran los niveles de HCQ presentes en el grupo de pacientes. En ella se puede observar que existen diferencias significativas en los niveles plasmáticos al estado estacionario. En el grupo 1 se encuentran concentraciones plasmáticas en el estado estacionario entre 152 – 475 ng/mL, mientras que en grupo 2 oscilan entre 209 – 308 ng/mL de tal manera que la dosis administrada es significativa, así que se recomienda complementar el estudio con más pacientes y probando otras dosis, cabe mencionar que en estos resultados se debe considerar una cantidad grande de variables por individuo que pueden interferir en los resultados obtenidos, así que se recomienda un grupo más representativo.

5.3.2 Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.

En las Figura 11 se muestran algunos de los cromatogramas resultantes de la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas. En ellas se puede notar la presencia de un pico más grande que no interfiere con el de HCQ; dado que el tiempo de retención es muy corto, se puede especular que puede ser un metabolito de la HCQ, otra opción podría ser el anestésico administrado a los pacientes antes de llevar a cabo la biopsia del tejido linfoide.

5.3.3 Cuantificación de HCQ en tejido adenoideo

Debido a que el tejido linfoide se obtiene a partir de biopsias de pacientes enfermos, es difícil obtener muestras en gran cantidad, por lo que no fue posible llevar a cabo la validación completa en este tipo de tejido, por ello solamente se realizó una prueba de linealidad consistente en 6 niveles de concentración.

5.3.4 Resultados de la cuantificación de HCQ en muestras de tejido adenoide provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.

Los niveles de HCQ al estado estacionario en tejido adenoideo resultaron muy altos, en la Tabla 12 se presentan en las unidades de g de HCQ/ g de tejido como puede observarse son niveles considerablemente altos, en el grupo 1 los niveles van 0.71 – 1.07 g de HCQ / g de tejido adenoideo; mientras que en grupo 2 los niveles alcanzados se encuentran en un rango de 0.78 – 2.82 g de HCQ / g de tejido adenoideo, basándonos en estos datos tenemos que el tejido adenoideo es un reservorio para la HCQ debido a su alta afinidad por esta clase de tejidos, lo que es bueno pues si se encuentra presente puede llevar a cabo su actividad inmunomoduladora en el Sistema Inmune.

5.3.5 Cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas provenientes de pacientes enfermos de VIH-1.

En la Figura 12 se muestran algunos de los cromatogramas obtenidos en la cuantificación de HCQ a partir de muestras de tejido adenoideo, en estas se puede observar la respuesta alta que se presenta en este tipo de tejido, debido a la alta concentración de HCQ en este, debemos puntualizar que las muestras manejadas de tejido no excedían los 20 mg, así que estos cromatogramas nos demuestran la gran afinidad de la HCQ al tejido adenoideo.

5.3.6 Resultados de la relación de HCQ en sangre y tejido linfóide de los pacientes bajo estudio.

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la comparación de los niveles de HCQ encontrados en sangre y en tejido adenoideo, como se puede notar los niveles encontrados en tejido adenoideo son al menos 200 veces más grandes que los niveles encontrados en sangre periférica, de tal manera que la HCQ es absorbida rápidamente

y se deposita en el tejido adenoideo lo cual es ideal pues se espera que la HCQ permanezca en el tejido adenoide la mayor parte de su vida media de tal manera que impida la infectividad de las células del Sistema Inmune protegiéndolas y permitiendo su funcionamiento normal.

**“Busca hacia adentro, todo el universo
esta en cuerpo”**

La Lupita

Capítulo 6.

Conclusiones

6. Conclusiones

- El método analítico para la cuantificación de HCQ en muestras plasmáticas es lineal, preciso, reproducible, exacto por lo que es apropiado para llevar a cabo estudios de biodisponibilidad o farmacocinética clínica.

- La HCQ se encuentra en plasma en concentraciones bajas que oscilan entre los 152-475 ng/ mL

- La HCQ es más afín al tejido linfoide que al plasma y tiene una proporción estimada de 1:250.

- La HCQ presenta una alta afinidad al tejido linfoide. Ello aunado a su prolongada vida media y a su baja toxicidad, permite especular que la HCQ podría tener un gran potencial como posible agente para el tratamiento del SIDA. Su fuerza radicaría en que podría proteger el sistema Inmune durante mucho tiempo aumentando la expectativa de vida de los pacientes enfermos de VIH-1, lo cual les permitiría desarrollar sus actividades y tener una mejor calidad de vida.

**“Que tengas suertecita, que te conceda la vida,
de cada día lo que mereces,
que no te falte nada, que no te de
la espalda la esperanza”**

Capítulo 7 Bibliografía

7. Bibliografía

- ✓ Pinching A., Acquired Immunodeficiency and the acquired Immunodeficiency Syndrome. (AIDS). En: McGree J, Isaacson P y Wright N; Oxford Textbook of pathology, Oxford University Press, 1992, pp. 285-293.
- ✓ McVan B; "Índice de medicamentos"; Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V.; México 1995; pp.810-812.
- ✓ Clarke, "Isolation and identification of drugs"; London the pharmaceutical Press, 2004, pp. 374-375.
- ✓ "The Merck index"; Merck and Co., Inc., 1996; pp. 4866.
- ✓ Martindale, "Guía completa de consulta farmacoterapéutica", Barcelona España, 2003.
- ✓ Remington, "Farmacia"; Ed. Medica Panamericana, Argentina, 2000.
- ✓ Mutschler E., "Drug actions basic principles and therapeutic aspect"; Medpharma scientific Publisher, 1995 pp. 177 y 714.
- ✓ Craig C., Stitzel. E, "Modern pharmacology with clinical applications"; USA ; pp. 466, 526, 530, 643, 644.
- ✓ Goodman and Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica"; Ed. Medica Panamericana", 1996; pp. 956-958.
- ✓ Rojas, W. "Inmunología"; Ed. Fondo educativo Interamericano"; 1996; pp. 75-80 y 87-94.
- ✓ Roitt M, Brostoff J y Male D. "Inmunología"; Ed. Salvat; 1991, pp. 1.1-1.3 y 3.1-3.9,
- ✓ Abbas A, "Inmunología celular y molecular", Ed. Mc-Graw Hill interamericana; 2002, pp 3-14 y 17-39.
- ✓ Minzi y cols. "High performance liquid chromatographic method for determination of amodiaquine, chloroquine and their monodesethyl metabolitos in biological simples". Journal of Chromatography B 2003: 783; 473-480.
- ✓ Tapanes R, Ramos A, Avila J, "Contribution to the determination of chloroquine in biological fluids". Journal of chromatography 1989: 493; 196-201.
- ✓ Dwivedi, "HPLC and HPTLC assays for the antimalarial agents, Chloroquine, Primaquine and Bulaquine". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2003: 33(4); 851-858.

- ✓ Houze P.and cols. "Simultaneous determination of chloroquine and its three metabolites in human plasma, whole blood and urine by ion.pair high performance liquid chromatography". Journal of Chromatography 1992: 574; 305-312.
- ✓ Mantra, 2005. "¿Qué es el SIDA?, 05-09-2005, www.mantra.com.ar
- ✓ Restrepo F, Guzmán M, Iglesias G, "Antimaláricos como drogas inductoras de remisión en la artritis reumatoide". 2003.
- ✓ VIH, 2005 "VIH", 10-03-2005, www.vih.varge.htm.
- ✓ Gallo RC, Montagnier L. Prospects for the future. Science 2002; 298: 1730-1
- ✓ Romanelli F, Smith KM. Chloroquine and hydroxychloroquine as inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV-1) activity. Current Pharmaceutical 2004; 10 (21).
- ✓ NOM177SSA
- ✓ OMS, 2005, "SIDA en el mundo"; www.OPS.com