



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**



TESIS MANCOMUNADA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR ZALCITABINA EN PLASMA MEDIANTE
CLAR ACOPLADO A UN DETECTOR DE MASAS Y SU
APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD EN
POBLACION MEXICANA.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTAN:

ZAINOS HERNÁNDEZ FRANCISCA DEL ROCIO
MOJICA REYES JOSÉ

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

| | | |
|---------------|---|-------|
| Presidente | Dra. Helgi Helen Jung Cook | _____ |
| Vocal | M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado | _____ |
| Secretario | M. en F. Luis Jesús García Aguirre | _____ |
| 1er. Suplente | M en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez | _____ |
| 2º. Suplente | M en C. Maria De Lourdes Mayet Cruz | _____ |

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica S.A. de C.V.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en F. Luis Jesús García Aguirre

M. en F. Liz Jannet Medina Reyes

SUSTENTANTES

Francisca del Rocio Zainos Hernández

José Mojica Reyes

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Rocío y Roberto † por su cariño, comprensión, por todo lo que me enseñaron, por sus sabios consejos los cuales fueron determinantes para elegir de entre todas la mejor decisión, las cuales me ayudaron a concluir una mas de las etapas de mi vida.

Gracias a *mi mamá* ya que es la persona mas maravillosa del mundo y a la que mas le debo por todo el esfuerzo que ha hecho siempre por sacar adelante a nosotros, sus hijos, por su fortaleza y ejemplo, por escucharme, por quererme tanto, por estar con migo en las buenas y en las malas, a ti mamá por haberme dado la vida, gracias.

A mis hermanos, Carlos, José Roberto y Dulce por todo el cariño que me han brindado, por apoyarme en todo, por hacerme ver mis aciertos y desaciertos, por compartir esta vida con migo, los quiero mucho, gracias por ser mis hermanos.

A mi tío padrino Julian, a la familia Quijano Zainos, a mi tía Rosalba, a mi tío Arellano, a mis primas Vero y Yuni y a toda la familia Zainos, ya que me brindaron su apoyo y afecto cuando más lo necesitaba.

A José Mojica R por ser el mejor de mis amigos, por escucharme y apoyarme en todo momento de manera incondicional, gracias por permitirme compartir con tigo esta experiencia maravillosa.

A mis amigos Lilian, Toño y a todos los telerines por ser como mi segunda familia ya que con ustedes compartí tristezas y alegrías y fueron un gran apoyo para salir adelante en los momentos difíciles.

Al Maestro Luis García y la maestra Liz Medina por su apoyo, confianza y amistad que me brindaron, a todos los que conforman el área analítica de IFaB (Araceli, Norma, Omar, Ely, Oly, Abraham, Manuel, Mago) que me brindaron su ayuda cuando lo necesité y por el excelente ambiente de trabajo y a IFaB por permitirme realizar esta tesis.

A la Facultad de Química y a la Universidad Nacional por brindarme una excelente educación y por permitirme pertenecer a ella.

Francisca del Rocío Zainos Hernández

A Dios, ciencia, esencia y concepto.

A mi Padre Gilberto Mojica, que con su trabajo, responsabilidad y apoyo incondicional, dieron motivación a mis actividades y un verdadero sentido a la palabra profesionalismo.

A mi Madre Margarita Reyes, por su aliento en los momentos de debilidad, consejos, por ser piedra angular de mi familia y enseñarme que aunque los tiempos cambian, el bien siempre estará vigente.

A mi hermana Carolina Mojica, por su sinceridad y carácter, que me enseñan la autenticidad y el preocurse por marcar la diferencia.

A los maestros Luis García y Liz Medina por su disposición, entrega, cordialidad y profesionalismo pero sobre todo por su amistad.

A Rocío Zaínos por su forma de ser, mi mejor amiga, por ayudarme a crecer y conformar el mejor de los equipos.

A todo el equipo de trabajo de IFaB, investigadores y coordinadores, por generar un excepcional ambiente de trabajo, de ayuda mutua y que sin lugar a dudas hacen de ésta empresa única y la más importante.

A Antonio Reyna y Lilian Angtuncio, por hacernos partícipes de sus proyectos, por su amistad, compañerismo y humildad.

A los telerines, por su gran ayuda, por las vivencias y hacer de las corcholatas un momento de desahogo, de risas, nuestra segunda casa.

A mi Universidad, la máxima casa de estudios del país y de la cual pienso dar testimonio como recompensa mínima de su legado, orgulloso de mi raza y de su espíritu.

José Mojica Reyes

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... | 3 |
| 3. GENERALIDADES..... | 5 |
| 3.1. Características del virus. ⁸⁻¹¹ | 5 |
| 3.2. La expresión de los genes y la replicación del virus. ^{8,10-12} | 7 |
| 3.3. Ciclo de vida del VIH. ^{8,10-15} | 9 |
| 3.4. Vías de transmisión. ¹⁶⁻¹⁸ | 13 |
| 3.4.1. Grupos de riesgo..... | 13 |
| 3.5. Evolución de la infección y la enfermedad. ^{8,10,11,15,17,18} | 14 |
| 3.6. Pruebas diagnóstico y detección de personas infectadas por el virus. ^{12,16-18} | 17 |
| 3.7. Manejo de la información. ¹⁶⁻¹⁸ | 19 |
| 3.8. Tratamiento farmacológico de la infección. ^{8,12,14,16-26} | 19 |
| 3.8.1. Consideraciones preeliminares..... | 22 |
| 3.8.2. Objetivo de la terapia antirretroviral..... | 23 |
| 3.9. Epidemiología del SIDA. ^{2,3,17} | 26 |
| 3.9.1. El SIDA en el mundo, América Latina y el Caribe..... | 26 |
| 3.9.2. El SIDA en México..... | 27 |
| 3.10. Medidas de prevención. ¹⁶⁻¹⁹ | 34 |
| 3.11. Zalcitabina. ^{18,19,24-26} | 35 |
| 3.11.1. Propiedades fisicoquímicas..... | 35 |
| 3.11.2. Propiedades farmacológicas..... | 35 |
| 3.11.3. Farmacocinética..... | 36 |
| 3.11.4. Distribución en Adultos..... | 36 |
| 3.11.5. Metabolismo y Eliminación en Adultos..... | 36 |
| 3.11.6. Contraindicaciones y precauciones..... | 37 |
| 3.11.7. Efectos secundarios..... | 37 |
| 3.11.8. Interacciones medicamentosas..... | 38 |
| 3.12. Validación de métodos analíticos. ²⁸⁻³⁰ | 39 |
| 3.13. Artículos reportados para análisis de Zalcitabina. ^{31,32} | 41 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL..... | 42 |
| 4.1. Material, equipos e instrumentos..... | 42 |
| 4.2. Reactivos y sustancias de referencia..... | 43 |
| 4.3. Desarrollo del método analítico..... | 44 |
| 4.3.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno..... | 44 |
| 4.3.2. Condiciones cromatográficas..... | 45 |
| 4.3.3. Método de extracción..... | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4. Validación del método..... | 48 |
| 4.4.1. Preparación de soluciones. | 48 |
| 4.4.2. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma. | 50 |
| 4.4.3. Preparación de los puntos control en agua (sistema)..... | 51 |
| 4.4.4. Adecuabilidad del sistema. | 52 |
| 4.4.5. Linealidad. | 52 |
| 4.4.6. Precisión del método | 53 |
| 4.4.6.1. Repetibilidad. | 53 |
| 4.4.6.2. Reproducibilidad | 53 |
| 4.4.7. Exactitud del método | 54 |
| 4.4.8. Recobro | 55 |
| 4.4.9. Límite de cuantificación y Límite de detección | 55 |
| 4.4.10. Selectividad. | 56 |
| 4.4.11. Estabilidad | 56 |
| 4.4.12. Tolerancia..... | 58 |
| 4.5. Etapa clínica..... | 60 |
| 4.5.1. Criterios de inclusión. | 60 |
| 4.5.2. Criterios de exclusión de voluntarios | 61 |
| 4.5.3. Retiro de voluntarios del estudio. | 62 |
| 4.5.4. Cronología del estudio..... | 63 |
| 4.5.5. Eventos adversos. | 64 |
| 4.5.6. Aplicación del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma. | 65 |
| 5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 66 |
| 5.1. Desarrollo del método analítico..... | 66 |
| 5.1.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno..... | 66 |
| 5.1.2. Condiciones cromatográficas. | 67 |
| 5.1.3. Método de extracción. | 68 |
| 5.2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN. | 71 |
| 5.2.1. Adecuabilidad del sistema. | 71 |
| 5.2.2. Linealidad del método..... | 72 |
| 5.2.3. Precisión del método. | 74 |
| 5.2.3.1. Repetibilidad y exactitud intradía. | 74 |
| 5.2.3.2. Reproducibilidad analista 1 y exactitud intralaboratorio. | 74 |
| 5.2.3.3. Reproducibilidad analista 2 y exactitud entre analistas..... | 76 |
| 5.2.4. Recobro..... | 77 |
| 5.2.5. Límite de detección y cuantificación. | 79 |

| | |
|---|------------|
| 5.2.6. Selectividad..... | 82 |
| 5.2.7. Estabilidad..... | 84 |
| 5.2.7.1. Ciclos de congelación-descongelación..... | 84 |
| 5.2.7.2. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración..... | 85 |
| 5.2.7.3. Estabilidad a largo plazo (congelación a -70°C)..... | 87 |
| 5.2.7.4. Estabilidad de la muestra procesada..... | 88 |
| 5.2.8. Tolerancia..... | 89 |
| 5.2.8.1. Cambio en el pH de la fase móvil..... | 89 |
| 5.2.8.2. Prueba de volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración)..... | 90 |
| 5.2.8.3. Prueba de volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración)..... | 90 |
| 5.2.8.4. Muestras lipémicas y hemolizadas..... | 91 |
| 5.3. Etapa clínica..... | 93 |
| 5.3.1. Estadística demográfica descriptiva..... | 93 |
| 5.3.2. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo..... | 94 |
| 5.3.3. Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica)..... | 95 |
| 5.3.4. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos..... | 96 |
| 5.3.4.1. Cálculo de parámetros farmacocinéticos..... | 96 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 99 |
| ANEXOS | |
| ANEXO I. Características de fármacos antirretrovirales..... | 100 |
| ANEXO II. Datos demográficos de los participantes del estudio..... | 103 |
| ANEXO III. Concentración de zalcitabina en plasma para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo..... | 104 |
| ANEXO IV. Gráficas de concentración plasmática en escala normal y semilogarítmica con respecto al tiempo para cada voluntario..... | 124 |
| ANEXO V. Parámetros farmacocinéticos de zalcitabina obtenidos para cada voluntario..... | 134 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 135 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de partículas virales..... 5

Figura 2. Estructura del virión del VIH. 6

Figura 3. Genes reguladores del VIH..... 7

Figura 4. La partícula viral se une a CD4 y correceptor en la célula T..... 9

Figura 5. Fusión del virus con la membrana celular e internalización del material genético..... 10

Figura 6. La transcriptasa reversa copia el genoma ARN viral en una doble cadena de ADN. 10

Figura 7. El ADN viral entra en el núcleo y se integra al ADN de la célula hospedera. 11

Figura 8. La activación de las células T inducen la transcripción del virus 11

Figura 9. Transcripción de genes, traducción y formación de nuevas partículas virales. 12

Figura 10. Depleción de células T CD4 y estadios de la infección. 16

Figura 11. Respuesta inmune frente al VIH. 16

Figura 12. Proceso de extracción sólido-líquido de muestras plasmáticas..... 70

Figura 13.Linealidad del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma. 73

Figura 14. Límite de detección y cuantificación. 81

Figura 15. Selectividad del método para el fármaco Zalcitabina..... 82

Figura 16. Selectividad del método para el estándar interno (Estavudina)..... 83

Figura 17. Perfil farmacocinético promedio de Zalcitabina + error estándar en escala normal..... 95

Figura 18. Perfil farmacocinético promedio de Zalcitabina en escala semilogarítmica. 96

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Genes reguladores del VIH y su función. | 8 |
| Tabla 2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales para comenzar el tratamiento. | 25 |
| Tabla 3. Personas infectadas por edad y género durante el 2005. | 26 |
| Tabla 4. Estadística del SIDA en América Latina, años 2003 y 2005. | 27 |
| Tabla 5. Casos de SIDA por sexo. | 28 |
| Tabla 6. Casos de SIDA por edad. | 28 |
| Tabla 7. Categorías de transmisión. | 29 |
| Tabla 8. Casos de SIDA por institución notificante. | 30 |
| Tabla 9. Casos de SIDA y personas viviendo con VIH (PVVIH). | 30 |
| Tabla 10. Casos acumulados de SIDA por entidad federativa. | 31 |
| Tabla 11. Incidencia acumulada de casos de SIDA por entidad Federativa. | 32 |
| Tabla 12. Preparación de curva de calibración y puntos control en plasma. | 51 |
| Tabla 13. Preparación de puntos control en agua. | 52 |
| Tabla 14. Preparación de muestras para las pruebas de estabilidad. | 57 |
| Tabla 15. Equipo cromatográfico. | 66 |
| Tabla 16. Condiciones del detector. | 66 |
| Tabla 17. Descripción de las condiciones cromatográficas. | 68 |
| Tabla 18. Adecuabilidad del sistema. | 71 |
| Tabla 19. Resultados de la linealidad del método (Relación de áreas). | 72 |
| Tabla 20. Concentraciones obtenidas al aplicar la ponderación 1/X. | 73 |
| Tabla 21. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar zalcitabina en plasma. ... | 74 |
| Tabla 22. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre días (analista 1). | 75 |
| Tabla 23. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre analistas (analista2). | 76 |
| Tabla 24. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre analistas. | 77 |
| Tabla 25. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma. | 78 |
| Tabla 26. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma (EI). | 79 |
| Tabla 27. Limite de detección y cuantificación del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma. | 80 |
| Tabla 28. Estabilidad ciclos congelación descongelación. | 84 |
| Tabla 29. Estabilidad a temperatura ambiente. | 85 |
| Tabla 30. Estabilidad en refrigeración. | 86 |
| Tabla 31. Estabilidad a largo plazo (-70°C). | 87 |
| Tabla 32. Estabilidad de la muestra procesada. | 88 |

| | |
|---|----|
| Tabla 33. Tolerancia del método analítico al cambio de pH de la fase móvil..... | 89 |
| Tabla 34. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma con volumen parcial de muestra (por encima de la curva de calibración)..... | 90 |
| Tabla 35. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma | 91 |
| Tabla 36. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma lipémico. | 91 |
| Tabla 37. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma hemolizado. | 92 |
| Tabla 38. Estadística descriptiva de las variables demográficas. | 93 |
| Tabla 39. Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de Zalcitabina con respecto al tiempo. | 94 |
| Tabla 40. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de Zalcitabina. | 98 |

1. RESUMEN.

Un estudio de biodisponibilidad nos permite evaluar el comportamiento farmacocinético del principio activo de un medicamento en el organismo, determinando la fracción que se absorbe a la circulación general después de su administración y el tiempo que requiere para hacerlo. Al realizar el estudio en diferentes poblaciones se han encontrado diferencias significativas debidas principalmente a la variabilidad genética existente entre razas, por lo que la dosis terapéutica puede ser efectiva para unas e inefectiva para otras, de ahí la conveniencia de llevar a cabo dicho estudio de manera regional.

La necesidad de medicamentos de calidad a costos accesibles para la población, se ha convertido en un aspecto prioritario en el sistema de salud en México; por tal motivo una de las estrategias implementadas por la Secretaría de Salud es el programa de Medicamentos Genéricos Intercambiables que intenta dar una solución en esta materia a través de los estudios de biodisponibilidad comparativa o "bioequivalencia", lo cual tiene una doble connotación, ya que nos permite además conocer las características farmacocinéticas de los fármacos evaluados en la población mexicana.

Son pocas las enfermedades que interesan a la mayoría de los países debido al impacto económico, social y de seguridad que éstas representan, una de ellas es el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) que corresponde al estadio final de la infección causada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y que afecta a los países sin importar su nivel de desarrollo.

En la actualidad no se ha encontrado una cura a pesar de los esfuerzos por erradicar la enfermedad, por lo que el tratamiento se ha enfocado al control de la infección, para lo cual se utilizan fármacos llamados antirretrovirales, que actúan a diferentes niveles del ciclo de replicación del virus impidiendo su proliferación.

La Zalcitabina es un fármaco utilizado por su actividad antirretroviral, pertenece al grupo de los Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de Nucleósidos (ITRAN). La importancia de este trabajo de tesis radica en la obtención de un método analítico validado para cuantificar Zalcitabina en plasma y poder aplicarlo en un estudio de biodisponibilidad en la población mexicana.

Debido a las propiedades farmacocinéticas de Zalcitabina y su distribución en el organismo, el plasma sanguíneo resulta la matriz biológica ideal para su cuantificación, sin embargo, la sensibilidad requerida para tal efecto no se alcanza por métodos cromatográficos de detección convencionales, por lo que la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplada a un detector de Masas resulta ser la opción más viable para cumplir con estos fines.

Se desarrolló y validó una metodología bajo éste sistema de detección regida por la legislación mexicana vigente: "Norma oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998", mediante un método de extracción en fase sólida, utilizando una columna X-Terra MS C₁₈ (5 µm, 250 x 4.6 mm.), el método resultó lineal, preciso y exacto en el rango de 0.5 – 50 ng/mL, estableciendo como límite de detección 0.1 ng/mL.

Una vez que se obtuvo una metodología confiable, el estudio se propuso para muestras provenientes de voluntarios sanos mexicanos, a los que se les administró una dosis de 1.5 mg de Zalcitabina y se les tomaron muestras plasmáticas a diferentes intervalos de tiempo durante 10 horas en tubos con heparina como anticoagulante. Éstas se almacenaron a -70 ° C y fueron procesadas conforme al método analítico previamente validado.

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas con los parámetros farmacocinéticos reportados en la literatura, por lo que en este caso la raza no es una variable que modifique la biodisponibilidad del fármaco.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La pandemia más grande de la historia se atribuye al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), cuyas manifestaciones, vías de transmisión, crecimiento gradual y progresivo, atentan contra la seguridad de las naciones independientemente de su nivel de desarrollo ^[1]. Las últimas cifras al respecto ratifican el impacto de esta enfermedad, situándola dentro de las cuatro causas principales de mortalidad en el mundo ^[2]. Los programas para prevenir la proliferación e incidencia de la enfermedad han sido insuficientes, aunados a una deficiente infraestructura en materia de salud, que provocan, por tanto, un panorama no muy alentador en las medidas de erradicación de la enfermedad. Debido a esta situación y a la inexistencia de una cura, el tratamiento de las personas infectadas es preponderantemente de tipo farmacológico, con la finalidad de prolongar y elevar su nivel de vida. En este contexto, los países pobres y subdesarrollados son los menos favorecidos debido a los costos de los medicamentos implementados en la terapéutica, nuestro país en donde la enfermedad ocupa la décimo sexta causa de muerte ^[3] no es la excepción, pese al compromiso por parte de las autoridades en materia de salud, los costos se mantienen en un nivel poco accesible para la población.

Los compuestos más utilizados en los esquemas de tratamiento en cualquiera de sus fases, son los llamados Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de Nucleótidos (ITRAN). La Zalcitabina (ddC) forma parte de este grupo de compuestos que en combinación de dos o más dentro de este mismo grupo, presentan efectos sinérgicos apropiados según la etapa de tratamiento ^[4]. Un estudio de biodisponibilidad de Zalcitabina en población mexicana haciendo uso de una metodología analítica validada y con la sensibilidad necesaria, representa además de una herramienta de conocimiento, un apoyo para futuras aplicaciones en lo que a estudios de bioequivalencia se refiere, contribuyendo así en la búsqueda de alternativas de calidad y bajo costo, para la terapéutica farmacológica en enfermedades como el SIDA.

Atendiendo a esta problemática global el presente trabajo de tesis tiene como objetivos generales:

1. Desarrollar y Validar un Método Analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a un detector de Masas (CLAR-MS) para cuantificar Zalcitabina en plasma.

2. Aplicar dicho Método Analítico en un ensayo de biodisponibilidad en población mexicana.

3. GENERALIDADES.

3.1. Características del virus.⁸⁻¹¹

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece a la familia de los *retrovirus*, que se caracterizan por tener un genoma de ARN de cadena sencilla y propagarse a través de un intermediario intracelular (provirus) compuesto por ADN de doble cadena. Pertenece a la subfamilia de los *lentivirus*, constituida por retrovirus que producen infecciones crónicas de evolución lenta, se subdivide en VIH-1 y VIH-2 agentes etiológicos del SIDA distribuidos en todo el mundo y oriente de África respectivamente, por lo que de manera indistinta al referirnos al VIH como agente causal del SIDA asumiremos que se trata del tipo VIH-1.

El VIH tiene forma esférica, con diámetro alrededor de los 100nm, lo conforman dos cadenas idénticas de ARN (con una longitud aproximada de 9.2 Kb) empaquetadas en un núcleo de proteínas víricas y rodeadas por una envoltura de fosfolípidos en forma de bicapa lipídica procedente de la célula huésped en donde ha infectado y proteínas de membrana codificadas por el virus.

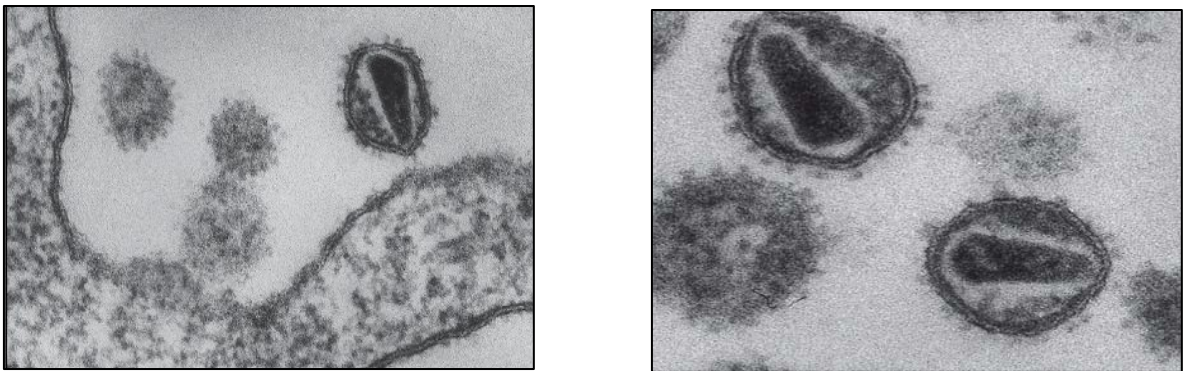


Figura 1. Micrografía electrónica de partículas virales.

Derecha. Partículas virales maduras con capacidad infectiva. Izquierda. Brote viral emergiendo de célula huésped.

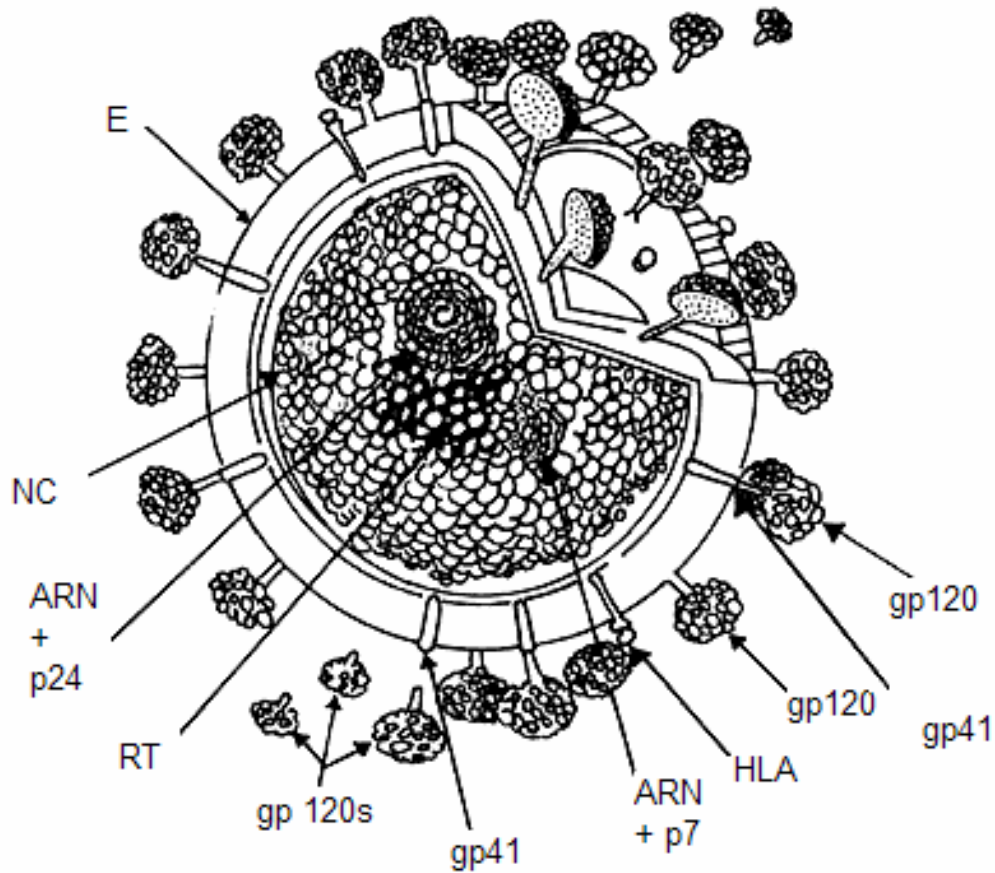


Figura 2. Estructura del virión del VIH.

E. Envoltura formada por una bicapa de lípidos derivada de la membrana de la célula hospedera. **gp120.** Glicoproteína mayor de superficie con peso molecular de 120 000 daltones. **gp120.** Forma soluble de la gp120. **gp41.** Glicoproteína transmembranal con peso molecular de 41 000 daltones. **HLA.** Antígeno de histocompatibilidad derivado de la membrana de la célula hospedera. **NC.** Subunidades de la nucleocápside viral formada por la proteína viral con peso de 17 000 daltones. **RT.** Moléculas de la enzima transcriptasa inversa viral. **ARN + p24.** ARN genómico viral rodeado de múltiples copias de la proteína mayor del centro viral que pesa 24 000 daltones. **ARN + p7.** ARN genómico viral cubierto por moléculas de la proteína menor del centro viral con peso de 7 000 daltones.

3.2. La expresión de los genes y la replicación del virus.^{8,10-12}

La conformación genética del VIH es relativamente sencilla, pero con la capacidad suficiente para llevar a cabo su regulación y expresión, que aunado a su alta capacidad para mutar, potencializa la virulencia y dificulta los esfuerzos en la obtención de una cura en función a sus determinantes antigénicos.

El genoma viral está delimitado por repeticiones terminales largas (RTL) en los extremos que regulan la integración del virus en el genoma de la célula huésped (figura 3).

Las secuencias *gag* codifican proteínas estructurales nucleares, las *env* codifican las glucoproteínas gp 120 y gp41 de la envoltura, necesarias para la infección de la célula, las secuencias *pol* codifican la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa del virus, todas ellas esenciales para su replicación. Además de estos genes típicos de los retrovirus, el VIH posee otros genes reguladores, *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu* (ver tabla 1)

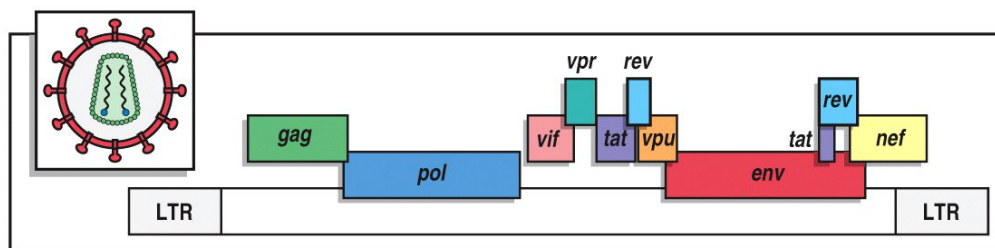


Figura 3. Genes reguladores del VIH.

Los genes situados a lo largo del genoma lineal se representan como bloques de colores diferentes. Algunos genes utilizan algunas de las mismas secuencias que otros, como demuestra la superposición de los bloques, pero la ARN polimerasa de la célula huésped los lee de manera diferenciada. De igual forma los genes *tat* y *rev* son genes cuyas secuencias de codificación están separadas en el genoma y que requieren el procesamiento del ARN para producir un ARN mensajero funcional.

Tabla 1. Genes reguladores del VIH y su función.

| Genes | | Producto del gen/función |
|------------|---------------------------------|--|
| Gag | Antígeno grupo específico | Proteínas del centro de la nucleocápside y de la matriz. |
| Pol | Polimerasa | Transcriptasa reversa, proteasa y enzimas integrasa. |
| Env | Envoltura | Glucoproteínas de la cubierta vírica, gp120; gp41 que intervienen en la unión con CD4 y el receptor de quimiocinas CCR5 y la fusión a la membrana. |
| Tat | Transactivador | Regulador positivo de transcripción. |
| Rev | Regulador de la expresión viral | Favorece la salida del ARN vírico no procesado o incompletamente procesado. |
| Vif | Infectividad viral | Incrementa la infectividad de la partícula vírica |
| vpr | Proteína R viral | Transportador de DNA al núcleo. Aumenta la producción del virión. Detención del ciclo celular en G2. |
| vpu | Proteína U viral | Degradación de promotores intracelulares de CD4 y del virus desde la membrana celular, Potencia la liberación del virus. |
| nef | Factor de regulación negativa | Aumenta la replicación viral in vivo e in vitro. Decrementa la expresión de CD4 y CPH clase I y II. |

3.3. Ciclo de vida del VIH.^{8,10-15}

Su ciclo de vida pueden citarse en una serie de eventos que se presentan a continuación, cabe señalar que el diseño de fármacos para el tratamiento de la infección tiene como objetivo, interferir en dichos eventos, deteniendo la continuidad del ciclo y por tanto disminuyendo la carga viral.

1. **Unión y fusión:** El virus se une a través de las subunidades gp 120 a la célula diana por medio de una molécula CD4, lo que significa una modificación en su configuración para facilitar la unión secundaria de gp 120 a un correceptor de la familia de los receptores de quimiocinas (CCR5 o CXCR4) [ver figura 4]. Los cuales son comunes en la superficie de la célula hospedera, la unión con el correceptor provoca cambios conformacionales en gp 41 en la que queda expuesta una región hidrófoba, denominada péptido de fusión, que se inserta a la membrana celular y permite así que la membrana del virus se fusione con la de la célula diana.

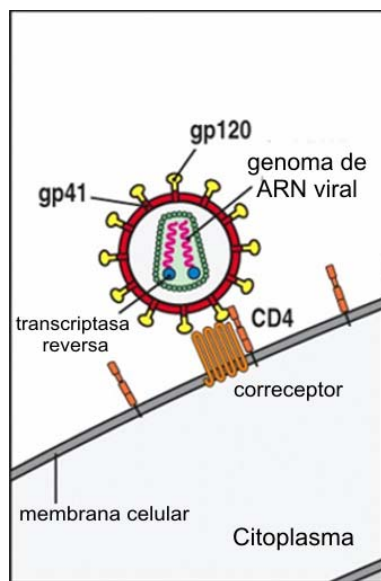


Figura 4. La partícula viral se une a CD4 y correceptor en la célula T.

2. **Infección:** Tras la absorción del virus prosigue la fusión de las membranas vírica y celular, lo que permite la internalización de los componentes del núcleo vírico (ver figura 5).

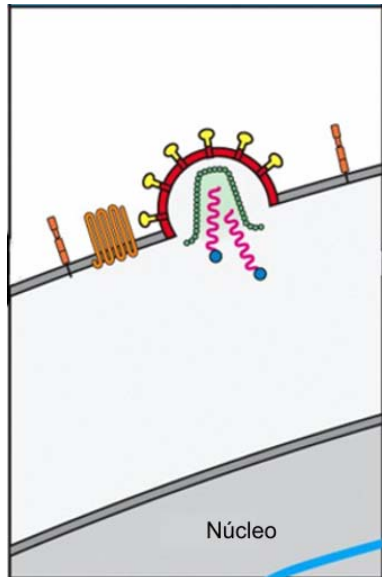


Figura 5. Fusión del virus con la membrana celular e internalización del material genético.

3. **Transcripción Reversa:** Las cadenas simples del ARN viral son convertidas en cadenas dobles de ADN por la enzima transcriptasa reversa (ver figura 6).

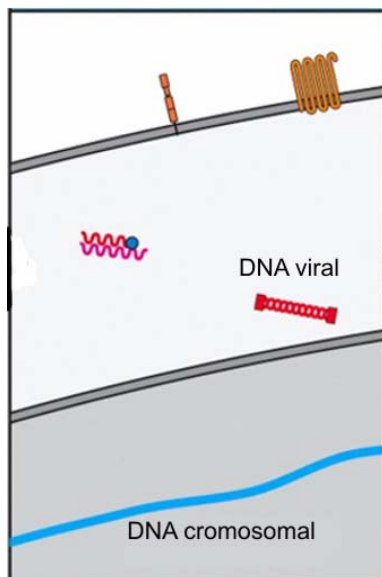


Figura 6. La transcriptasa reversa copia el genoma ARN viral en una doble cadena de ADN.

4. **Integración:** El ADN viral se combina con el ADN celular por la acción de la integrasa (ver figura 7).

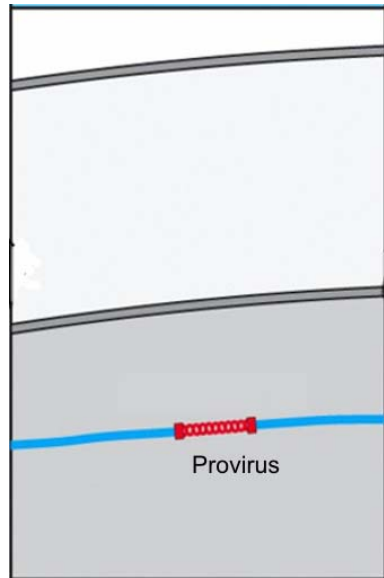


Figura 7. El ADN viral entra en el núcleo y se integra al ADN de la célula hospedera.

5. **Transcripción y traducción:** Las señales que en condiciones normales activan a células huésped estimulan la transcripción de los genes. Se lleva a cabo la síntesis de proteínas del VIH (proteínas del core, proteínas de envoltura, enzimas y proteínas esenciales par la replicación) [ver figura 8].

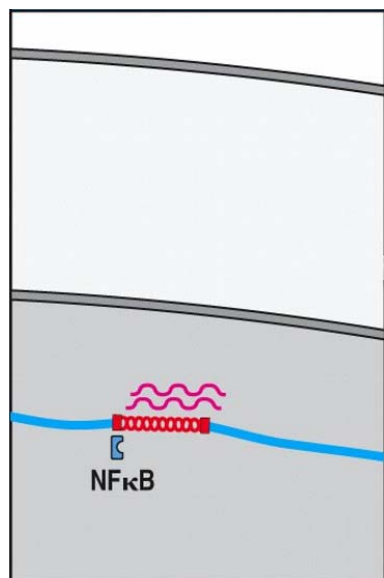


Figura 8. La activación de las células T inducen la transcripción del virus

6. **Ensamble:** Los grupos de cadenas de proteínas virales se agrupan.
7. **Brote y Liberación:** Un virus inmaduro sale de la célula, el cual expresa las proteínas gp 120 y gp 41 en la superficie celular, llevando con el parte de la membrana celular.
8. **Maduración:** La enzima proteasa corta las cadenas de proteína del VIH en proteínas individuales que se combinan para formar un nuevo virus funcional.

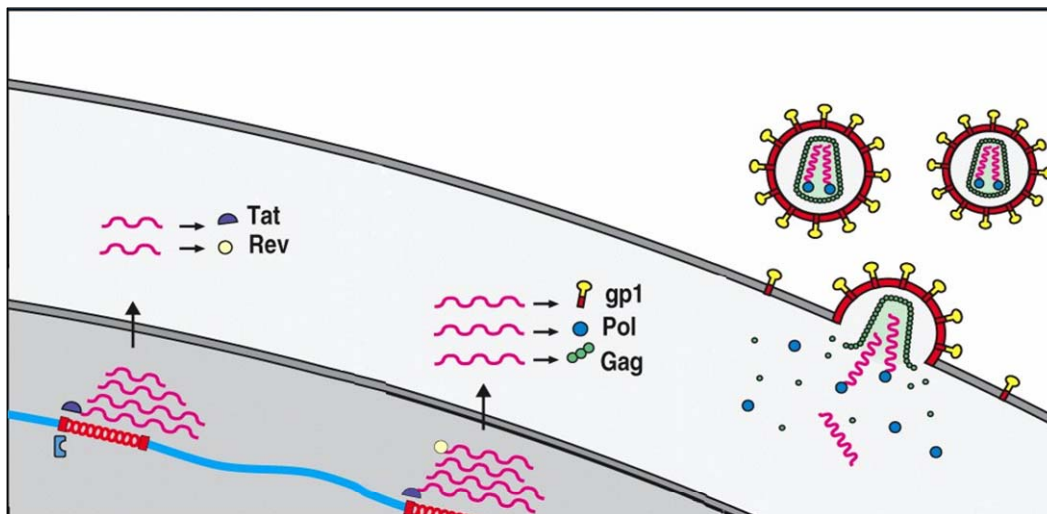


Figura 9. Transcripción de genes, traducción y formación de nuevas partículas virales.

Los transcritos de ARN son multiplicados permitiendo la traducción de los genes *tat* y *rev*. Tat amplifica la transcripción del ARN viral, Rev incrementa el transporte del ARN viral al citoplasma. Las últimas proteínas Gag, Pol y Env son traducidas y ensambladas dentro de las partículas virales las cuales brotan de la célula.

3.4. Vías de transmisión.¹⁶⁻¹⁸

Según estudios publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las causas oficiales de transmisión son las siguientes:

1. Contacto sexual no protegido con una persona afectada por el VIH.
2. Transfusión de sangre contaminada y sus componentes.
3. Uso de agujas y otros instrumentos punzo cortantes contaminados.
4. De una madre infectada a su hijo, durante el período perinatal por vía transplacentaria, contacto con sangre o secreciones en el canal del parto, o a través de la leche materna.
5. Trasplante de órganos y tejidos contaminados.

3.4.1. Grupos de riesgo.

1) Alto riesgo

Los grupos de individuos que presentan una mayor probabilidad de adquirir la infección son aquellos que:

- Realizan prácticas sexuales de alto riesgo en los que se encuentran: hombres y mujeres que tienen varios compañeros sexuales independientemente de su preferencia sexual.
- Utilizan drogas vía intravenosa y comparten agujas o jeringas contaminadas.
- Hemofílicos y transfundidos entre los años de 1980 y 1987 (en México).
- Personas transfundidas después de 1987 (en México) con sangre o hemoderivados que no hayan sido sometidos a prueba de VIH.
- Hijos nacidos de mujeres ya infectadas con VIH/SIDA.

2) Riesgo Laboral

- Personal de salud que presenta cortaduras y se expone a salpicaduras de sangre o secreciones.
- Personas que tengan punción con agujas potencialmente contaminadas por sangre, como las usadas en acupuntura y tatuajes.

3.5. Evolución de la infección y la enfermedad.^{8,10,11,15,17,18}

El curso de la infección puede identificarse mediante “estadios”, los cuales están directamente relacionados con la depleción de células T CD4 (ver figura 10), producción de anticuerpos contra proteínas de la envoltura y de la nucleocápside (p24), presencia del virus en plasma y la producción de Linfocitos T Citóxicos (LTC) específicos (ver figura 11)

Primo infección. Ocurre cuando el virus ingresa al individuo por medio de las vías antes citadas. Dependiendo de la vía de entrada del virus, las primeras células infectadas pueden ser linfocitos TCD4+ y monocitos de la sangre o linfocitos TCD4+ y macrófagos de las mucosas.

Infección aguda o primaria. Algunos días después de la primera exposición (2-6 semanas) se detecta una replicación abundante en los ganglios linfáticos que provocan una viremia con cantidades elevadas de partículas víricas en la sangre del paciente, acompañada de un síndrome agudo de signos y síntomas inespecíficos típicos de muchas enfermedades víricas, por ejemplo la de un cuadro gripal de resolución rápida.

Seroconversión. La viremia permite la diseminación, momento en el cual el sistema adaptativo inmunitario controla parcialmente la infección y producción del virus, disminuyendo la viremia hasta niveles muy bajos pero detectables, aproximadamente 12 semanas después de la exposición inicial, y evolucionando como una infección progresiva en los tejidos linfáticos periféricos. En este estadio, la evidencia es la producción de anticuerpos y el diagnóstico clínico se dictamina como seropositividad.

Periodo de latencia o asintomática. Es un estadio posterior a la seroconversión con una duración promedio de 10 años, tiempo en el que el sistema inmunitario erradica la mayoría de las infecciones causadas por microorganismo oportunistas por lo que las manifestaciones clínicas son escasas o nulas. Sin embargo existe un descenso progresivo del recuento de linfocitos T CD4+ en sangre.

Al comienzo de la enfermedad el organismo es capaz de mantener la producción de linfocitos TCD4 +, de tal modo que los linfocitos se forman casi con la misma rapidez con que se destruyen.

Fase clínica o sintomática. Ocurre cuando se pierde el equilibrio antes descrito y la destrucción de los linfocitos TCD4+ en los tejidos linfáticos progresa de forma constante experimentando de la misma manera una disminución de linfocitos TCD4 + circulantes, lo que provoca una fase progresiva crónica de la enfermedad por el VIH en la cual aumenta la susceptibilidad del paciente a otras infecciones, en la cual la respuesta inmunitaria puede estimular la producción de VIH y destrucción de tejidos linfáticos lo que acelera la disminución de los linfocitos TCD4, los intentos del sistema inmunitario por erradicar otros microorganismos lo conducen a su propia destrucción.

SIDA. Comprende el estadio final de la enfermedad, ocurre cuando el recuento de linfocitos TCD4 es inferior a 200 células / μL *. Las manifestaciones clínicas se presentan como inflamación de varios grupos de ganglios linfáticos (linfadenopatía), acompañada de la pérdida de peso, diarrea persistente y posteriormente, la presencia de una o varias infecciones causadas por agentes oportunistas (cuyos agentes etiológicos serían inofensivos en condiciones normales de salud) o la reactivación de antiguas infecciones latentes como la tuberculosis o el herpes, se pueden presentar tumores malignos como el sarcoma de Kaposi o ciertos linfomas, y manifestaciones neurodegenerativas que terminan en demencia. Estas manifestaciones clínicas son las causas principales del fallecimiento del paciente.

* El recuento total de linfocitos: Oscila entre los 1,000-4,800 células/ μL de las cuales 50-60% de las células en sangre son Linfocitos T CD4+ por lo que el valor normal medio se encuentra alrededor de las 1080células/ μL .

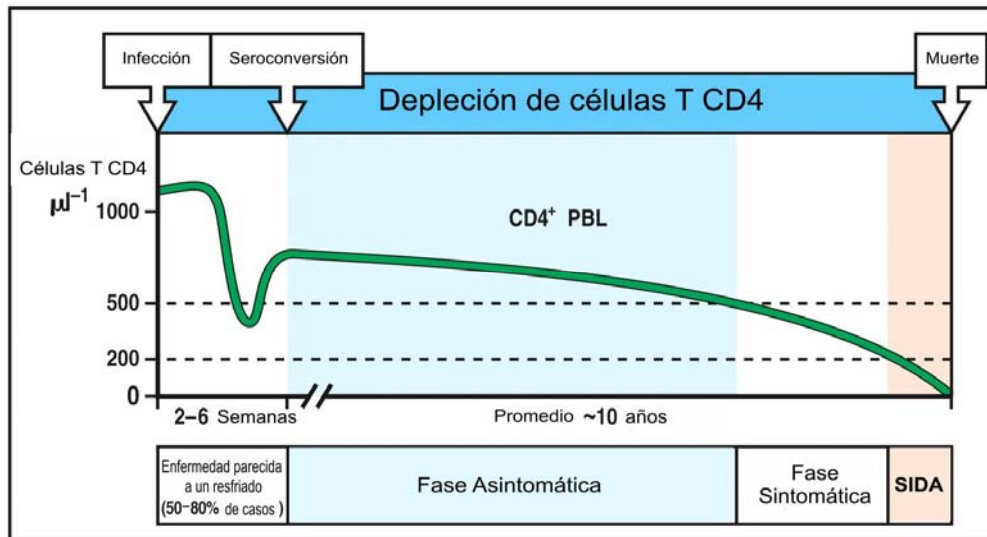


Figura 10. Depleción de células T CD4 y estadios de la infección.

Depleción de células T CD4 durante los estadios de la infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, la aparición del SIDA se presenta cuando la cuenta de linfocitos se encuentran por debajo de las 200 células / μL . El recuento de linfocitos T CD4 después de la infección encuentra una relación directa con los diferentes estadios.

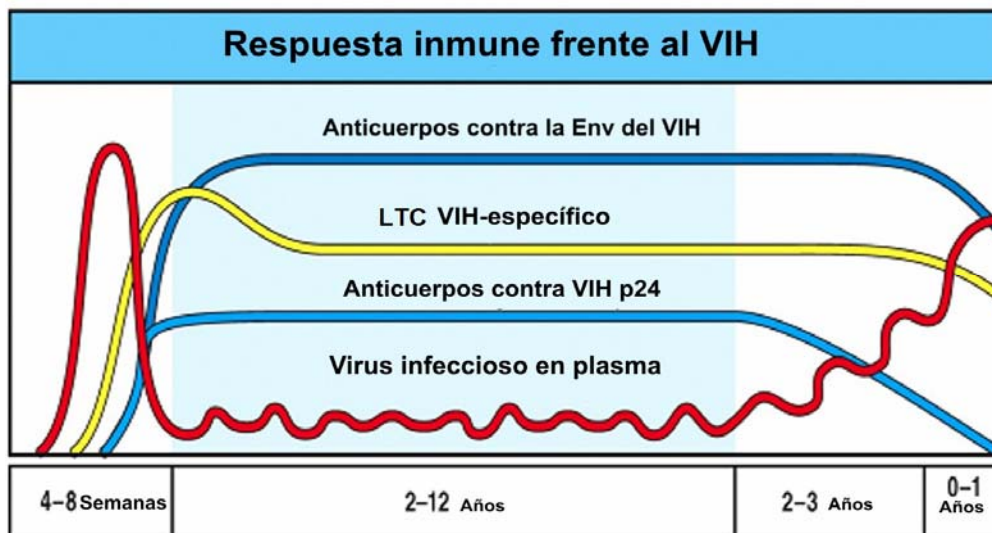


Figura 11. Respuesta inmune frente al VIH.

Respuesta inmune frente al VIH, los mayores niveles del virus en sangre ocurren dentro de las primeras 8 semanas posteriores a la primoinfección, decrece de forma considerable durante el estadio asintomático y reaparece de forma progresiva hacia los estadios clínicos y SIDA, la producción de anticuerpos y LTC alcanza su máximo nivel después de 8 semanas posteriores a la primoinfección.

3.6. Pruebas diagnóstico y detección de personas infectadas por el virus.^{12,16-18}

La detección del paciente portador del VIH, se realiza mediante las siguientes pruebas:

Pruebas de tamizaje: Tienen la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos (anti-VIH) en suero o plasma, mediante:

- ◆ Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).
- ◆ Aglutinación pasiva.

Los resultados deben interpretarse de acuerdo a la historia clínica del paciente y pruebas auxiliares de laboratorio como Biometría Hemática (BH), Química Sanguínea (QS), Examen General de Orina (EGO), carga viral para VIH, cuenta de células T CD4+ y subpoblaciones, serología para hepatitis B, C y toxoplasma, VDRL entre otras.

Pruebas específicas: Determinan la presencia del virus o algún componente, mediante:

- ◆ Cultivo de virus.
- ◆ Detección de antígeno viral.
- ◆ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** , para determinar el ARN viral o ADN proviral.

** A pesar de las técnicas con las que se cuentan para su detección existe un problema para detectar a un donador con VIH en el periodo entre la primoinfección y la formación de anticuerpos. Estos individuos solo pueden ser detectados mediante PCR. La importancia de la técnica radica en la detección de éste tipo de pacientes, que representan uno de los grupos transmisores más importantes, pues como se dijo anteriormente existe un estadio en que la infección es de forma silenciosa o asintomática.

Pruebas suplementarias: Tienen la finalidad de confirmar la presencia de anticuerpos contra el VIH en el suero o plasma, mediante:

- ◆ Inmunoelectrotransferencia (Prueba de Western blot).
- ◆ Inmunofluorescencia.
- ◆ Radioinmunoprecipitación (RIPA)

Interpretación de resultados de las pruebas diagnóstico.

1. Se considera persona infectada o seropositiva, a aquella que presenta dos resultados de pruebas de tamizaje y una suplementaria positivas, incluyendo pacientes asintomáticos que niegan factores de riesgo.
2. Una persona se considera no infectada cuando:
 - Sólo una de las pruebas de tamizaje realizadas resulta positiva.
 - Tiene dos resultados de pruebas de tamizaje positivas, pero las pruebas suplementarias son negativas.
3. En el caso de presentar dos resultados de pruebas de tamizaje positivos, pero la prueba suplementaria es indeterminada, debe considerarse como posiblemente infectado y así se debe informar, recomendándose repetir el diagnóstico de laboratorio (pruebas de tamizaje y suplementaria) tres meses después. Si persiste el Western blot indeterminado y la persona se mantiene asintomática a los 12 meses, se considerará como NO infectada.
4. En casos de niños menores de 18 meses, no se consideran infectados al presentar las pruebas de ELISA y Western blot positivas, ya que este resultado puede atribuirse a la presencia de anticuerpos maternos.

En estos casos, habrá de realizarse las pruebas de cultivo viral, antígeno viral o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con resultado positivo.

3.7. Manejo de la información.¹⁶⁻¹⁸

El SIDA es una enfermedad sujeta a vigilancia epidemiológica, por lo que es de carácter obligatorio la notificación inmediata a la autoridad sanitaria más cercana, misma que debe realizarse por el personal de salud involucrado (médico tratante o personal de salud de laboratorios públicos o privados y bancos de sangre), en formatos aprobados y referidos en las disposiciones aplicables para la Vigilancia Epidemiológica en el Sistema Nacional de Salud, asimismo; se utilizan en la notificación del infectado asintomático y, caso de SIDA, independientemente de los utilizados por cada institución. El estado de confidencialidad durante las pruebas, entrega de resultados y registros debe ser estrictamente obligatorio.

El objetivo de la notificación del caso es contar con la información necesaria para establecer las medidas, de prevención y control de enfermedades transmisibles, así como proteger al afectado contra daños a su honorabilidad y dignidad.

3.8. Tratamiento farmacológico de la infección.^{8,12,14,16-26}

Una vez diagnosticada la infección, los medicamentos contra el VIH (llamados también antirretrovirales) son usados para controlar la reproducción del virus y detener el progreso de la enfermedad.

Los medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos de Norte América (FDA) son clasificados en 4 grupos:

I. Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos de Nucleósidos (ITRAN).

Estos fármacos actúan sobre la enzima transcriptasa reversa alterando su función, dicha enzima es necesaria para que el virus convierta su material genético de ARN a ADN que posteriormente se insertará al ADN celular.

Los ITRAN necesitan ser fosforilados para luego interactuar con un sustrato en el sitio de unión de la enzima y cuando es incorporado, entonces termina la elongación de la cadena de ADN.

Dentro de este grupo encontramos los siguientes medicamentos con los principios activos aprobados por la FDA:

- Zidovudina (ZDV, AZT , Retrovir®, GlaxoSmithKline)
- Didanosina (ddl, Videx®, Bristol – Myers Squibb); Barr Laboratories (forma genérica)
- Zalcitabina (ddC, Hivid®, Roche)
- Estavudina (d4T, Zerit®, Bristol – Myers Squibb)
- Lamivudina (3TC, Epivir®, GlaxoSmithKline)
- Zidovudina/Lamivudina (AZT + 3TC , Combivir® , GlaxoSmithKline)
- Abacavir (1592U89, Ziagen®, GlaxoSmithKline)
- Zidovudina/Lamivudina/Abacavir (AZT + 3TC + Abacavir, Trizivir® GlaxoSmithKline)
- Tenofovir (TDF, bis-poc PMPA, Viread®, Gilead Sciences)
- Emtricitabina (FTC, Emtriva™, Gilead Sciences)
- Abacavir/lamivudina (Ziagen + 3TC, Epzicom™ , GlaxoSmithKline)
- Tenofovir /emtricitabina (Viread + Emtrivia, Truvada™ , Gilead Sciences)

II. Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Análogos de Nucleósidos (ITRNN).

Los ITRNNs en comparación con los ITRAN no necesitan conversión metabólica y bloquean directamente la reacción con la transcriptasa reversa, por una interacción específica con el sitio de unión "sin sustrato" de la transcriptasa reversa del virus.

Entre los medicamentos y sus principios activos avalados ante la FDA se encuentran:

- Nevirapina (NVP, BI-RG-578, Viramune®, Boehringer Ingelheim)
- Delavirdina (DLV, Rescriptor®, Pfizer/Agouron)
- Efavirenz (EFV, DMP-266, Sustiva®, Bristol-Myers Squibb)

III. Inhibidores de la Proteasa (IP).

Estos medicamentos actúan sobre la enzima proteasa, bloqueando el procesamiento de las proteínas precursoras del virus a proteínas maduras de la cápside y del núcleo vírico. No se realiza el corte de las cadenas largas de proteínas y enzimas en trozos más cortos que el virus que necesita para reproducirse en nuevas copias de sí mismo. Aunque las cadenas largas de proteínas no hayan sido cortadas correctamente, las nuevas copias del VIH aún se construyen y continúan empujando a través de la membrana de la célula infectada. Pero estas nuevas copias del VIH son "defectuosas" (ya que no han sido formadas completamente, por lo tanto no pueden continuar la infección a otras células).

Dentro de este grupo encontramos los siguientes medicamentos aprobados por la FDA:

- Saquinavir (SQV, Invirase®, Roche)
- Ritonavir (RTV, Norvir®, Abbott)
- Indinavir (IDV, Crixivan®, Merck)
- Nelfinavir (NFV, Viracept®, Pfizer/Agouron)
- Amprenavir (APV, 141W94, Agenerase®, Glaxo Smith Kline)

-
- Lopinavir (LPV, ABT-378/r, Kaletra®, Abbott)
 - Atazanavir (ATV, BMS-232632, Reyataz®, Bristol-Myers Squibb)
 - Fosamprenavir (FPV, GW433908, 908, Lexiva™, Glaxo Smith Kline)
 - Tipranavir (PNU140690, Aptivus®, Boehringer Ingelheim)
 - Darunavir (TMC114, Prezista™, Tibotec)

IV. Inhibidores de la fusión y de la unión.

Estos bloquean la etapa en que el virus se une a una célula para infectarla. Un inhibidor de fusión ha sido aprobado:

- Enfuvirtida (T-20, Fuzeon®, Trimeris y Roche)

3.8.1. Consideraciones preliminares.

Para iniciar con el tratamiento antirretroviral, es necesario considerar los siguientes factores:

- 1) Manifestaciones clínicas.
 - 2) Deseo y compromiso de la persona que vive con el VIH/SIDA de iniciar y mantener por tiempo indefinido el tratamiento.
 - 3) Grado de inmunodeficiencia existente, determinado por la cuenta de CD4.
 - 4) Riesgo de progresión de la enfermedad, que se observa con la determinación de la carga viral en plasma.
 - 5) Beneficios y riesgos potenciales de los fármacos con el uso a largo plazo.
- Se debe iniciar el tratamiento profiláctico de las infecciones oportunistas, en aquellos pacientes con una cuenta de células CD4 iguales o menores de 200 células/ μ l.

3.8.2. Objetivo de la terapia antirretroviral.

Reducir la carga viral*** hasta un nivel no detectable (empleando técnicas moleculares actuales menos de 50 copias/ml), y mejorar la inmunidad mediante el aumento en la cuenta de células CD4+ (reconstitución inmune) o al menos mantener las cifras de CD4 estables, ambos durante el mayor tiempo posible, con el fin de mejorar las expectativas y calidad de vida de los pacientes.

La terapia farmacológica ideal cumple con los siguientes aspectos (los cuales deben ser procurados preferentemente al inicio de la misma):

- ◆ Potente: Basado en estudios clínicos en donde el porcentaje de respuesta sea elevada.
- ◆ Bien Tolerado: Pocos efectos colaterales a corto y largo plazo.
- ◆ Simple de Administrar: Esquema con un número bajo de dosis por día, que se administre una o dos veces como máximo al día y no presente restricciones alimenticias de ningún tipo.
- ◆ Sin interacciones medicamentosas o que no sean clínicamente significativas.
- ◆ Que permita preservar opciones futuras en caso de falla.
- ◆ Con elevada barrera genética para el desarrollo de resistencia.
- ◆ Sin efectos teratogénicos.
- ◆ Accesible desde el punto de vista económico.

*** **Carga viral:** Corresponde al porcentaje de células blanco (células hospederas) que contienen información viral (como provirus o como ARN viral), pero sin importar si dicha información viral está siendo utilizada para producir nuevas partículas virales infectantes o solamente corresponde a una infección latente en la cual no se expresa la información viral presente en la célula hospedera.

Los esquemas de tratamiento en pacientes mexicanos se encuentran sujetos a lineamientos establecidos por la Secretaría de Salud a través de la "Guía para la *Atención Médica de Pacientes con Infección por VIH/SIDA en Consulta Externa y Hospitales*"^[17]. En dichos esquemas se indican los medicamentos apropiados de acuerdo a la historia clínica y evolución de la infección.

La aparición de resistencia por parte del virus, debido a la monoterapia (administración de un solo tipo de fármaco), ha orientado a la terapéutica hoy en día a la combinación de dos o más antirretrovirales. Esta nueva metodología recibe el nombre de TARGE (Tratamiento Antirretrovírico de Gran Eficacia) o TAAE (Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficacia) y provee una importante disminución de ARN vírico presente en el plasma. El TARGE combina tres o más medicamentos contra el VIH en un régimen diario (ejemplos, ver tabla 2), retrasando la progresión clínica, morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados, así como la disminución de costos en la atención médica.

Para determinar la resistencia existen pruebas genotípicas y fenotípicas que permiten detectar la resistencia a cada fármaco, permitiendo de esta manera la disposición de un método complementario el cual ayuda a tomar cambios en el tratamiento.

Tabla 2. Combinaciones de fármacos antirretrovirales para comenzar el tratamiento.

| ITRAN | TERCER FÁRMACO |
|--------------------------|------------------------|
| Combinaciones posibles | |
| Estavudina + didanosina | Abacavir |
| Estavudina+ lamivudina | Efavirenz |
| Didanosina +lamivudina | Indinavir |
| Zidovudina + didanosina | Nelfinavir |
| Zidovudina+ lamivudina | Nevirapina |
| Zidovudina + Zalcitabina | Ritonavir |
| | Ritonavir + amprenavir |
| | Ritonavir + indinavir |
| | Ritonavir + lopinavir |
| | Ritonavir + saquinavir |
| NO se recomienda | |
| Estaviduna + zidovudina | Saquinavir –CGD |
| Zalcitabina + estavudina | |
| Zalcitabina + didanosina | |
| Zalcitabina + lamivudina | |

Nota: Los fármacos y combinaciones listados en esta tabla siguen un orden alfabético y no de preferencia.

Una más de las opciones de tratamiento es el desarrollo de una vacuna efectiva contra el VIH, desafortunadamente las esperanzas de tener una vacuna o cura definitiva a corto plazo es mínima, los investigadores estiman 25 años para que esto suceda, la causa principal es la velocidad con la que el virus muta en los genes responsables de las principales determinantes antigénicas como gp120 y gp41, dando por resultado anticuerpos poco efectivos no protectores.

3.9. Epidemiología del SIDA. ^{2,3,17}

El SIDA como último estadio de la infección es el más devastador y el que de manera directa es objeto de estadística para las instituciones gubernamentales en materia de salud, pues es hasta la aparición de las manifestaciones clínicas cuando el paciente se percata de la infección y se convierte en un indicador indirecto pero muy superficial de la proliferación de la enfermedad.



3.9.1. El SIDA en el mundo, América Latina y el Caribe

A finales del 2005, ONUSIDA estimó que a nivel mundial existen 40.3 millones de personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de los cuales 38 millones eran adultos, 17.5 millones mujeres, y 2.3 millones menores de 15 años. Estos valores involucran a los 4.9 millones de personas que contrajeron el VIH en el 2005 y que cobró la vida de 3.1 millones durante el mismo año.

Tabla 3. Personas infectadas por edad y género durante el 2005.

| GRUPO | EDAD | CANTIDAD (MILLONES) |
|---|--------------------|---------------------------|
| Personas que vivían con el VIH en 2005 | Total | 40.3 (36,7 – 45.3) |
| | Adultos | 38 (34.5 – 42.6) |
| | Menores de 15 años | 2.3 (2.1 – 2.8) |
| Nuevas infecciones por el VIH en 2005 | Total | 4.9 (4.3 – 6.6) |
| | Adultos | 4.2 (3.6 – 5.8) |
| | Menores de 15 años | 0.7 (0.63 – 0.82) |
| Defunciones causadas por el SIDA en 2005 | Total | 3.1 (2.8 – 3.6) |
| | Adultos | 2.6 (2.3 – 2.9) |
| | Menores de 15 años | 0.57 (0.51 – 0.67) |

Fuente: ONUSIDA/OMS 2005

A pesar de los avances generados en el área de la terapia antirretroviral en América Latina el número de infecciones por VIH llegó a la cifra de de 1.8 millones de casos mismo año en el que se reportaron 66 000 defunciones debidas a la enfermedad y siendo reportados 200000 nuevos casos de infección. Cabe hacer resaltar que Brasil es el que tiene mas de una tercera parte de los 1.8 millones de personas que viven hasta el momento con el virus del VIH.

Tabla 4. Estadística del SIDA en América Latina, años 2003 y 2005.

| Año | Adultos y niños que vivían con el VIH (millones) | Mujeres que vivían con el VIH (millones) | Nuevos casos de infección por el VIH en adultos y niños (millones) | Prevalencia del VIH en adultos (%) | Defunciones de adultos y niños a causa del SIDA (millones) |
|-------------|---|---|---|---|---|
| 2005 | 1.8 (1.4- 2.4) | 0.58 (0.42-0.77) | 0.2 (0.13 -0.36) | 0.6 (0.5-0.8) | 0.066 (0.052-0.086) |
| 2003 | 1.6 (1.2-2.1) | 0.51 (0.37-0.68) | 0.17 (0.12-0.31) | 0.6 (0.4-0.8) | 0.059 (0.046-0.077) |

Fuente: ONUSIDA/OMS 2005

3.9.2. El SIDA en México.

México ocupa el tercer lugar en el continente americano por lo que la enfermedad se ha convertido en un problema prioritario de salud pública al igual que en otros países, debido al impacto social y económico, ya que éste repercute en la seguridad nacional. La epidemia se concentra en la población de entre 15–44 años que representan el 78.8% de los casos de SIDA diagnosticados (tabla 6), de los cuales el 83.2 % son hombres (tabla 5).

Tabla 5. Casos de SIDA por sexo.
(31 de diciembre del 2005)

| Sexo | Número | Porcentaje (%) |
|--------------|----------------|-----------------------|
| Hombres | 85,307 | 83.2 |
| Mujeres | 17,268 | 16.8 |
| Total | 102,575 | 100 |

Tabla 6. Casos de SIDA por edad.
(31 de diciembre del 2005)

| Edad | Número | Porcentaje |
|---------------|----------------|-------------------|
| < 15 años | 2,495 | 2.4 |
| 15-44 años | 79,984 | 78.8 |
| 45 años o más | 19,083 | 18.8 |
| Se desconoce | 1,013 | (1.0) |
| Total | 102,575 | 100 |

Fuente: Registro Nacional de Casos de SIDA. Nota: La categoría "Se desconoce" se excluyó del cálculo de los porcentajes, sin embargo, dicha cifra se muestra entre paréntesis para conocer su magnitud.

Los datos estadísticos del 2005 muestran que en México la vía de transmisión mas frecuente es la sexual, misma que ha sido la causante del 92.1% de los casos acumulados de SIDA en México, de los cuales 47.3% corresponden a hombres homosexuales (HHS) y el 44.8% a heterosexuales.

El 5.3% se originaron por vía sanguínea, de los cuales 3.5% corresponden a transfusión sanguínea, 0.7% están asociados al consumo de drogas inyectables, 0.6% a donadores, 0.4% a hemofílicos, y menos del 0.1% a la categoría exposición ocupacional. La transmisión perinatal representa el 2.3% del total de casos; y la categoría combinada de hombres que tienen sexo con otros hombres y usuarios de drogas inyectables (HHS/UDI) el 0.3%. En uno de cada tres casos (37.9%) se desconoce el factor de riesgo asociado (tabla 7).

**Tabla 7. Categorías de transmisión.
(31 de diciembre del 2005)**

| Categorías | Porcentaje (%) |
|-----------------------------|-----------------------|
| Sexual | 92.1 |
| HHS | 47.3 |
| Heterosexual | 44.8 |
| Sanguínea | 5.3 |
| Transfusión sanguínea | 3.5 |
| Hemofílico | 0.4 |
| Donador | 0.6 |
| Drogas I.V | 0.7 |
| Exposición ocupacional | < 0.1 |
| Perinatal | 2.3 |
| Otras (Homo –Drogas) | 0.3 |
| Se desconoce | (37.9) |

Fuente: Registro Nacional de Casos de SIDA .**Nota:** La categoría "Se desconoce" se excluyó del cálculo de los porcentajes, sin embargo, dicha cifra se muestra entre paréntesis para conocer su magnitud.

En México ha disminuido la mortalidad por SIDA como resultado del crecimiento en la cobertura del tratamiento ARV, anteriormente las instituciones de seguridad social (IMSS e ISSSTE) proporcionaban este tipo de medicamentos a los pacientes con SIDA de todo el país. Posteriormente la Secretaría de Salud inició la cobertura de la población no asegurada, ofreciendo tratamiento ARV gratuito a todos los menores de 18 años y mujeres embarazadas que lo necesitaran, así como a varones adultos no asegurados.

Actualmente las instituciones que ofrecen atención a los pacientes son; SSA, IMSS, ISSSTE, privadas y otras, de las cuales la secretaria de salud (SSA) es la institución que ha notificado el 55.9 % del total de casos (ver tabla 8).

Tabla 8. Casos de SIDA por institución notificante.
31 de diciembre del 2005

| Institución | Número | Porcentaje (%) |
|--------------------|----------------|-----------------------|
| SSA | 57,317 | 55.9 |
| IMSS | 32,485 | 31.7 |
| ISSSTE | 5,559 | 5.4 |
| OTRAS | 6,447 | 6.3 |
| PRIVADO | 767 | 0.7 |
| Total | 102,575 | 100.0 |

Fuente: Registro Nacional de Casos de SIDA.

Gracias a la atención médica que brindan las instituciones públicas se ha incrementado el acceso al tratamiento (180,000 personas), se estima que 4,382 casos fueron registrados oportunamente (ver tabla 9), las personas que viven actualmente con el VIH/SIDA reciben tratamiento antirretroviral gratuito incrementando de manera significativa su calidad de vida.

Tabla 9. Casos de SIDA y personas viviendo con VIH (PVVIH).
31 de diciembre del 2005

| | |
|---|----------------|
| Casos de SIDA notificados | 102,575 |
| PVVIH | 180,000 |
| Casos de SIDA registrados en el 2005 | 8,720 |
| Casos de SIDA registrados oportunamente en el 2005 | 4,382 |

La epidemia en México se encuentra concentrada en grupos de población bien definidos, por lo que se requieren estrategias focalizadas a aquellos grupos con prácticas de riesgo y mayor vulnerabilidad.

La promoción de la salud sexual, el auto cuidado y la prevención, siguen siendo las formas más eficaces para evitar la transmisión del VIH/SIDA, de aquí la importancia de fortalecer su prevención, detección y tratamiento oportunos.

Las estadísticas por entidad federativa se muestran a continuación (ver tabla 10 y 11)

**Tabla 10. Casos acumulados de SIDA por entidad federativa.
(31 de diciembre del 2005)**

| Lugar | Entidad Federativa | Casos Acumulados |
|-------|--------------------|------------------|
| 1 | Distrito federal | 20,113 |
| 2 | México | 10,787 |
| 3 | Veracruz | 9,159 |
| 4 | Jalisco | 8,830 |
| 5 | Puebla | 5,000 |
| 6 | Baja California | 4,785 |
| 7 | Guerrero | 3,703 |
| 8 | Chiapas | 3,249 |
| 9 | Oaxaca | 3,087 |
| 10 | Michoacán | 2,815 |
| 11 | Nuevo León | 2,733 |
| 12 | Guanajuato | 2,531 |
| 13 | Yucatán | 2,486 |
| 14 | Chihuahua | 2,410 |
| 15 | Morelos | 2,353 |
| 16 | Tamaulipas | 2,251 |
| 17 | Sinaloa | 1,656 |
| 18 | Sonora | 1,517 |
| 19 | Tabasco | 1,400 |
| 20 | Coahuila | 1,361 |
| 21 | Quintana Roo | 1,323 |
| 22 | Nayarit | 1,177 |
| 23 | San Luis Potosí | 1,150 |
| 24 | Hidalgo | 1,028 |
| 25 | Durango | 879 |
| 26 | Querétaro | 871 |
| 27 | Tlaxcala | 724 |
| 28 | Campeche | 696 |
| 29 | Aguascalientes | 572 |
| 30 | Colima | 553 |

| Lugar | Entidad Federativa | Casos Acumulados |
|-------|---------------------|------------------|
| 31 | Zacatecas | 533 |
| 32 | Baja California Sur | 500 |
| | Extranjeros | 310 |
| | Se desconoce | 53 |
| | Nacional | 102,575 |

Notas: Ordenado por casos acumulados.

Fuentes: DGE. Registro Nacional de Casos de SIDA.

Datos al 31 de diciembre del 2005. Secretaría de Salud.

CONAPO. Proyecciones de población por sexo, grupos de edad y entidad federativa 2000-2010. Versión 2002.

**Tabla 11. Incidencia acumulada de casos de SIDA por entidad Federativa.
(31 de Diciembre de 2005)**

| Lugar | Entidad federativa | Incidencia acumulada |
|-------|--------------------|----------------------|
| 1 | Distrito Federal | 228.2 |
| 2 | Baja California | 162.3 |
| 3 | Yucatán | 137.5 |
| 4 | Morelos | 137.0 |
| 5 | Jalisco | 129.6 |
| 6 | Veracruz | 125.5 |
| 7 | Quintana Roo | 121.2 |
| 8 | Nayarit | 118.0 |
| 9 | Guerrero | 113.6 |
| 10 | Baja California S | 99.5 |
| 11 | Puebla | 90.3 |
| 12 | Colima | 90.1 |
| 13 | Campeche | 89.7 |
| 14 | Oaxaca | 83.1 |
| 15 | Chiapas | 73.6 |
| 16 | México | 73.5 |
| 17 | Tamaulipas | 71.1 |
| 18 | Chihuahua | 70.2 |

| Lugar | Entidad federativa | Incidencia acumulada |
|-------|--------------------|----------------------|
| 19 | Tabasco | 67.6 |
| 20 | Tlaxcala | 67.5 |
| 21 | Michoacán | 66.6 |
| 22 | Nuevo León | 64.4 |
| 23 | Sonora | 61.0 |
| 24 | Sinaloa | 59.8 |
| 25 | Durango | 56.5 |
| 26 | Aguascalientes | 54.8 |
| 27 | Querétaro | 54.4 |
| 28 | Coahuila | 53.5 |
| 29 | Guanajuato | 50.0 |
| 30 | San Luis Potosí | 47.7 |
| 31 | Hidalgo | 43.0 |
| 32 | Zacatecas | 37.6 |
| | Extranjeros | - |
| | Se desconoce | - |
| | Nacional ** | 96.0** |

Notas: Ordenado por tasa de incidencia acumuladas

* Tasa por 100000 habitantes.

** La tasa nacional acumulada no incluye a los extranjeros y a la categoría se desconoce.

Fuentes: DGE Registro Nacional de Casos de SIDA. Datos al 31 de Diciembre de 2005.

Secretaría de Salud. CONAPO. Proyecciones de población por sexo.

Grupos de edad y entidad federativa 2000 – 2010 versión 2002.

3.10. Medidas de prevención.¹⁶⁻¹⁹

Deben estar orientadas a toda la población, haciendo énfasis en los grupos clasificados como de mayor riesgo.

Los encargados de difundir la información serán los órganos competentes apoyándose en los siguientes aspectos:

a) Educación para la salud:

Desarrollando modelos educativos orientados a adoptar conductas preventivas para disminuir el riesgo de infección, mismos que serán transmitidos a la población previa capacitación de personal docente y de salud.

b) Promoción de la salud:

Informando a la población la magnitud y trascendencia de la infección como de la enfermedad, haciendo notar el problema de salud pública que representa, la importancia de adoptar medidas preventivas y conductas responsables, con énfasis en los grupos vulnerables, especialmente los adolescentes.

c) Participación social.

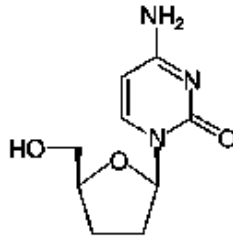
Sensibilizar a la población para que permita el desarrollo de acciones preventivas y de control, para que con la ayuda de personal de salud, maestros, padres de familia, organizaciones, y otros grupos de la comunidad, colaboren en actividades educativas y de promoción.

Una vez revisados los aspectos generales de la infección que involucran al VIH, su constitución, evolución y epidemiología, se describirá al fármaco Zalcitabina el cual solo o en combinación representa una opción más en el tratamiento de ésta enfermedad.

3.11. Zalcitabina.^{18,19,24-26}

3.11.1. Propiedades fisicoquímicas.

- Estructura química:



- Nombre químico: 4-amino-1-β-D-2',3'-dideoxiribofuranosil-2-(1H)-pirimidona
- Sinónimos: 2',3'-dideoxicitidina (ddC)
- DCI: Zalcitabina
- Fórmula condensada: C₉H₁₃N₃O₃
- Peso Molecular: 211.22 g/mol
- Solubilidad en agua: 76.4 mg/mL.
- pKa: 4.2
- Punto de fusión: 215-217 ° C
- Máximos UV: en HCl 0.1N 280 nm; en NaOH 0.1N 270 nm

3.11.2. Propiedades farmacológicas.

La Zalcitabina es un agente antirretroviral. Es un análogo nucleósido sintético del nucleósido natural 2'-deoxicitidina en el que el grupo 3'-hidroxil es reemplazado por hidrógeno. En las células, la Zalcitabina se convierte en su metabolito activo, la dideoxicitidina -5'-trifosfato (ddCTP) mediante enzimas celulares.

La dideoxicitidina-5'-trifosfato actúa como un sustrato alternativo del trifosfato de deoxicitidina (dCTP) para la retrotranscriptasa del VIH e inhibe la replicación *in vitro* del VIH por inhibición competitiva de la síntesis del ADN viral debido a la terminación

prematura de la cadena. En cultivos celulares, la Zalcitabina ha demostrado actuar sinérgicamente con diversos agentes anti-VIH, en particular con la zidovudina y el interferón alfa, en su capacidad inhibitoria de la replicación del VIH.

3.11.3. Farmacocinética.

Después de la administración oral de Zalcitabina a pacientes infectados con VIH, se observó una biodisponibilidad >80%. La velocidad de absorción después de la administración de una dosis oral única de 1.5 mg (n=20), disminuyó con la administración concomitante de alimentos. Esto resultó en una reducción del 39% en la concentración plasmática máxima del fármaco (C_{max}) de 25.2 ng/mL a 15.5 ng/mL, y en un incremento en la Tmax de 0.8 horas en condiciones de ayuno a 1.6 horas cuando el fármaco se administró con alimentos, en estas condiciones, el grado de absorción (ABC) disminuyó en un 14%, de 72 ng·hr/mL a 62 ng·hr/mL.

3.11.4. Distribución en Adultos.

La Zalcitabina presenta un bajo grado de unión a proteínas plasmática (4%). En estado estable el volumen de distribución después de la administración IV de una dosis de 1.5 mg de Zalcitabina es en promedio 0.534 (± 0.127) L/kg. La Zalcitabina se detecta en líquido cefalorraquídeo, demostrando así la penetración del fármaco a través de la barrera hematoencefálica. Sin embargo, la relevancia clínica de este hecho no ha sido evaluada

3.11.5. Metabolismo y Eliminación en Adultos.

La Zalcitabina es fosforilada intracelularmente a trifosfato de Zalcitabina, el sustrato activo para la transcriptasa reversa del VIH. Las concentraciones del trifosfato de Zalcitabina son muy bajas para su cuantificación después de la administración de dosis terapéuticas en humanos.

La Zalcitabina no sufre metabolismo hepático en grado significativo. El metabolito primario de la Zalcitabina que ha sido identificado tanto en orina como en heces es la dideoxiuridina (ddU), que corresponde a menos del 15% de una dosis oral. Aproximadamente un 10% de una dosis oral marcada aparece en las heces en forma

inalterada. La excreción renal es la vía primaria de eliminación del fármaco y corresponde a aproximadamente un 80% de las dosis IV y del 60% de las dosis administradas por vía oral. La vida media de eliminación de la Zalcitabina es de aproximadamente 2 horas, con un rango de 1 a 3 horas.

En pacientes con insuficiencia renal la eliminación se ve retardada, así pacientes con depuración de creatinina <55 mL/min la vida media puede ser hasta 8.5 horas.

3.11.6. Contraindicaciones y precauciones.

Hipersensibilidad a la Zalcitabina o a cualquier componente de la formulación.

Se deberá administrar con precaución en pacientes con antecedentes de pancreatitis, alcoholismo, alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático, pacientes con nutrición parenteral, insuficiencia renal, hiperfosfatemia y pacientes con neuropatía periférica.

3.11.7. Efectos secundarios.

- > 10%: Sistema Nervioso Central: Fiebre (5-17%), malestar general (2-13%).
- Neuromusculares y esqueléticos: Neuropatía periférica (28%).
- 1-10%: Sistema Nervioso Central: Cefalea (2%), mareo (1%), fatiga (4%), convulsiones (1.3%).
- Dermatológicos: Rash (2-11%) prurito (2-5%).
- Endocrinos y metabólicos: Hipoglicemia (2-6%), hiponatremia (4%), hiperglicemia (1-6%).
- Gastrointestinales: Náusea (3%), disfagia (1-4%), anorexia (4%) dolor abdominal (3-8%), vómito (1-3%), diarrea (1-10%), pérdida de peso, úlceras orales (3-7%), incremento de la amilasa (3-8%).

Hematológicos: anemia (después de 2-4 semanas de tratamiento), granulocitopenia (después de 6-8 semanas de tratamiento).

Hepáticos: Pruebas de funcionamiento hepático alteradas (9%), hiperbilirrubinemia (2-5%).

Neuromusculares y esqueléticos: Mialgias (1-6-%).

Respiratorios: faringitis (2%), tos (6%), rinorrea (4%).

< 1% Anafilaxia, constipación, falla hepática, hepatitis, hipocalcemia, ictericia, acidosis láctica, pancreatitis, redistribución de grasa corporal, síncope.

3.11.8. Interacciones medicamentosas.

Incremento del efecto/toxicidad: La anfotericina, el foscarnet y los aminoglucósidos pueden incrementar el riesgo de neuropatía periférica al interferir con la eliminación renal de Zalcitabina. Otros fármacos asociados a neuropatía periférica como cloranfenicol, cisplatino, dapsona, disulfiram, etionamida, hidralazina, iodoquinol, isoniazida, metronidazol, nitrofurantoina, fenitoína, ribavirina y vincristina pueden aumentar el riesgo de dicha condición.

El uso concomitante de Zalcitabina con didanosina no es recomendable. El riesgo de acidosis láctica puede incrementarse con el uso concomitante de adefovir, didanosian, lamivudina, estavudina y zidovudina.

Disminución del efecto: La fosforilación de Zalcitabina disminuye con la administración concomitante de doxorubicina y lamivudina. Los antiácidos que contienen magnesio y aluminio y la metoclopramida disminuyen la absorción y por lo tanto el efecto de la Zalcitabina.

3.12. Validación de métodos analíticos.²⁸⁻³⁰

Las pruebas y procedimientos para la validación de métodos analíticos se encuentran estipuladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, la importancia de esta norma radica en el establecimiento de criterios y parámetros para los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Las definiciones utilizadas en validación son las siguientes:

Validación, Evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado;

Para llevar a cabo la validación, una vez establecidas las condiciones analíticas como la matriz biológica en la que se encuentra el analito, es necesario incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

Exactitud; Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Linealidad. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

Límite de detección. Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación. Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Precisión; Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad; Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

Reproducibilidad intralaboratorio; Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

Muestras control; Muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método, estas debe estar comprendidas en el rango de concentraciones de la curva de calibración pero no formar parte de ella.

Rango; Intervalo definido de un método analítico, se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

Recuperación absoluta; Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

Selectividad; Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Sustancia de referencia; Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación.

Tolerancia; Capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

Estabilidad de la muestra, Propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

3.13. Artículos reportados para análisis de Zalcitabina.^{31,32}

Bezy Vincent y colaboradores ^[31] reportaron un análisis simultáneo de siete nucleósidos antirretrovirales entre los que se encontraban Zalcitabina (ddC), estavudina (d4T) y zidovudina (AZT) utilizando CLAR. Los fármacos se extrajeron de plasma de rata, mediante extracción en fase sólida en cartuchos Oasis[®] HLB (3 mL, 60 mg) con ayuda de un sistema manifold acoplado a una bomba de vacío. Los cartuchos fueron acondicionados con 3 mL de metanol seguido de 3 mL de agua, la muestra plasmática (200 μ L) se pasó por el cartucho aplicando un vacío de 5 mm Hg, después fue lavado con 1 mL de agua. Los nucleósidos anti-HIV retenidos fueron eluidos con 1.5 mL de metanol, posteriormente se evaporó hasta sequedad bajo atmósfera de nitrógeno a 40°C. El residuo remanente fue reconstituido en 100 μ L de agua inyectando 20 μ L en el sistema cromatográfico. La separación se llevó a cabo en una columna Atlantis[™] dC₁₈ con solución amortiguadora de ácido acético- hidroxilamina (fuerza iónica 5 mM, pH 7) – acetonitrilo aplicando un gradiente de elución. La curva de calibración resultó lineal en el rango de concentraciones plasmáticas 30-10 000 ng/mL. El coeficiente de correlación (r^2) fue de 0.992 obtenido mediante regresión por mínimos cuadrados y el límite de cuantificación entre el rango de concentración de 30–90 ng/mL.

Hemant K. Jajoo y colaboradores ^[32] por medio de análisis termospray en cromatografía de líquidos acoplado a un detector de masas, cuantificaron Zalcitabina en muestras plasmáticas de humanos en el que un isótopo análogo de ddC ($[^{15}\text{N}_2, ^2\text{H}_2]$ ddC) fue utilizado como estándar interno. A 1 mL de plasma se le adicionaron 5 ng de estándar interno, los fármacos fueron extraídos por una separación en fase sólida (SPE) con cartuchos supelclean (LC – 18 , 3 mL), los cuales fueron acondicionados con 2 mL de metanol seguido de 2 mL de agua, la muestra plasmática fue lavada con 2 mL de metanol-agua (20/80 v/v), el eluyente fue evaporado a sequedad y el residuo fue resuspendido en 50 μ L de metanol-agua (10:90 v/v), de los cuales 25 μ L fueron analizados por termospray LC –MS, la curva de calibración fue lineal en el rango de 0.25 – 20 ng / mL, estableciendo como límite de detección 50 pg en columna.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas:

1. Desarrollo y validación del método analítico.
2. Aplicación del método en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de voluntarios sanos en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.

4.1. Material, equipos e instrumentos.

Material

Matraces volumétricos calibrados: 10, 20, 100 y 1000 mL.

Pipetas volumétricas: 1 y 2 mL.

Puntas para pipeta repetidora.

Membranas de filtración de nylon, de 0.45 μm y 47 mm de diámetro.

Viales para automuestreador 2777.

Tubos de vidrio de 13 x 100 mm.

Tubos Axigen de 2 mL.

Cartuchos Bond Elut 1mL y HLB 1mL

Perillas de succión.

Vasos de precipitados de polipropileno: 100, 250 y 1000 mL.

Frascos de vidrio y polipropileno con tapa rosca de: 50, 250, 1000 y 2000 mL.

Guantes.

Gradillas.

Equipos e instrumentos.

Cromatógrafo que consta de:

Bomba binaria 1525 μ de Waters.

Automuestreador 2777 con modulo refrigerante.

Detector de masas Micromass ZQ.

Horno para columnas TSM Waters.
Columna Zorbax C₁₈ 4.6 x 50 mm 1.8 µm.
Columna Zorbax agilent SB C₁₈ 4.6x 50 mm 1.8 µm.
Columna X –Terra MS C₁₈ 250 x 4.6 mm 5 µm.
Columna Simmetry 0.44 C₁₈ 3.5µm 4.6 x 75 mm.
Balanza analítica marca Ohaus EP214C.
Agitador vórtex marca Thermolyne, Maxi Mix II.
Ultracongelador marca REVCO ULT2186-5-A36.
Sistema de purificación de agua Barnstead.
Centrifuga Centra CL5.
Pipeta repetidora electrónica Eppendorf, Repeater plus.
Pipeta repetidora manual Eppendorf.
Pipeta de volumen variable 10-100 µL Eppendorf, Research.
Pipeta de volumen variable 100 – 1000 µL Eppendorf, Research.
Sistema de extracción sólido-líquido Manifold Waters.
Baño de agua Lab-Line.
Potenciómetro Oakton, pH 1000.
Sistema de procesamiento de datos MassLynx.

4.2. Reactivos y sustancias de referencia.

Reactivos

Acetato de amonio, Merck.
Acetonitrilo, J.T. Baker.
Acido fórmico, Merck.
Agua desionizada, grado CLAR.
Fosfato dibásico de sodio heptahidratado J.T. Baker.
Hidróxido de amonio J.T. Baker.
Metanol grado cromatográfico, J.T, Baker.
Plasma humano proveniente de sujetos sanos, acompañada de la documentación que ampare su bioseguridad.

Sustancias de referencia.

Zidovudina. Estándar de referencia secundario. Proveedor Arlex de México lote:

GZIC1140022. Potencia 99.5%

Zalcitabina. Estándar primario, USP, potencia 100%, lote F

Estavudina. Estándar secundario, Arlex de México, potencia 99.47%, lote ST0291104

Como se mencionó en la página 41 se han reportado metodologías para la cuantificación de Zalcitabina, sin embargo presentan en mayor o menor grado limitantes e inconvenientes. Hemant K. Jajoo empleó un isótopo análogo como estándar interno, al que en nuestro país no se tiene un fácil acceso debido a la inexistencia de laboratorios encargados al marcaje de este tipo de compuestos y a su adquisición costosa. En el artículo de Vincent Bezy, la metodología no es específica para Zalcitabina, se realizaron gradientes de elución, se utilizó un detector UV y por tanto rangos de cuantificación muy altos en comparación a los requeridos en nuestro estudio

4.3. Desarrollo del método analítico.

Las principales variables consideradas en el desarrollo del método analítico fueron: condiciones del detector, condiciones cromatográficas y método de extracción de las muestras plasmáticas.

4.3.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno.

Las condiciones óptimas de detección para Zalcitabina y un posible Estándar Interno (EI) Zidovudina ó Estavudina, se determinaron mediante un ajuste de parámetros (tuning). Para tal efecto, se prepararon soluciones estándar de las sustancias antes citadas a concentraciones de 1 µg/mL en agua con las cuales se buscaron las relaciones masa/carga (m/z) en donde una vez ajustadas las condiciones del detector se obtuvo el mejor nivel de respuesta para Zalcitabina y para el estándar interno.

4.3.2. Condiciones cromatográficas.

Una vez encontradas las condiciones de detección, se buscaron las condiciones cromatográficas que permitieran la adecuada separación e identificación de los analitos.

Los parámetros cromatográficos estudiados fueron:

a) Fase móvil.

En la elección de la fase móvil es necesario considerar los componentes, proporción y pH ya que estos factores determinan la solubilidad y afinidad que el analito presenta hacia la fase estacionaria en función a sus propiedades fisicoquímicas (ej. pKa, polaridad)

Las fases estudiadas fueron mezclas a diferentes proporciones de ACN: AcONH₄, ACN: NH₄OH, MeOH: AcONH₄, ACN: Ac. Fórmico 0.1%, MeOH: Ac. Fórmico 0.1% (todos sales y disolventes recomendados para espectrometría de masas).

b) Fase estacionaria.

La fase estacionaria en CLAR está constituida por columnas y al igual que la fase móvil, desempeña un papel importante en cromatografía, ya que la competencia entre ambas nos permite establecer las condiciones óptimas de análisis.

Se probaron las siguientes columnas cromatográficas: Zorbax C₁₈ 4.6 x 50 mm 1.8 µm, Zorbax Agilent, X Terra MS C₁₈, Symmetry 0.44 C₁₈ 3.5 µm 4.6 x 75 mm.

c) Volumen de inyección y velocidad de flujo

Tanto el volumen de inyección (10-20 µL) como la velocidad del flujo (0.4-0.6 mL/min) fueron seleccionadas tomando en cuenta las características de la señal producida en el cromatograma.

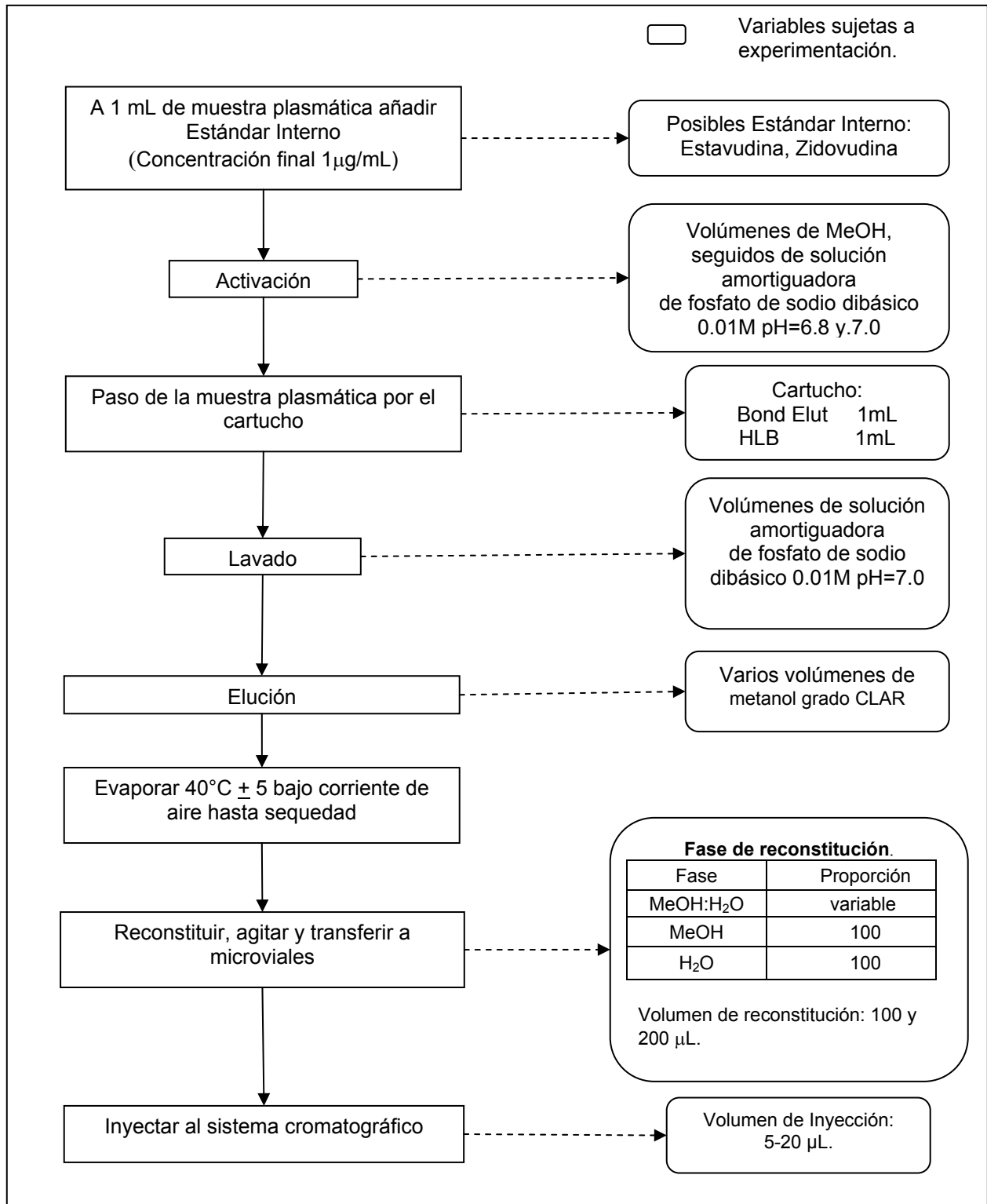
Los parámetros considerados en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

- ◆ Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- ◆ Seguimiento de la presión.
- ◆ Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).
- ◆ Sensibilidad.
- ◆ Resolución entre picos.
- ◆ Ancho del pico.
- ◆ Simetría de los picos.

Se probaron diferentes concentraciones del fármaco de interés en solución, a fin de corroborar que la señal producida era causada en efecto por éste último, y no por los componentes de la matriz biológica en la que se encontraba (ruido).

4.3.3. Método de extracción.

Basándonos en la revisión bibliográfica de métodos de extracción de compuestos que pertenecen a los análogos de base ^[31] y a la Zalcitabina como tal ^[32], se propuso un método de extracción en fase sólida mismo que debe ser útil para el estándar interno seleccionado y que se describe en el siguiente diagrama:



El método de extracción seleccionado fue aquel en el que se obtuvo la muestra libre de impurezas para la cuantificación de Zalcitabina y del estándar interno.

4.4. Validación del método.

El método analítico fue validado de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a la validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas en pruebas de bioequivalencia.

4.4.1. Preparación de soluciones.

Solución de acetato de amonio 10 mM pH 6.5

Se pesaron 0.79 g de acetato de amonio se transfirieron a un matraz volumétrico de 1 L se disolvió con agua grado CLAR y se llevó a volumen con el mismo disolvente. Esta solución tiene un pH aproximado de 6.5, de no ser así, se ajustó el pH con la solución adecuada.

Solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio 0.01 M pH 7.0.

Se pesaron 2.68 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado, se transfirieron a un matraz volumétrico de 1 L, se disolvió con agua CLAR y llevó a volumen con el mismo disolvente. Ajustar el pH a 7.0 con ácido fosfórico concentrado.

Solución de referencia de Zalcitabina, 100 µg/mL.

Se pesó con exactitud el equivalente a 10 mg de sustancia referencia de Zalcitabina y transfirieron a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvieron con agua grado cromatográfico y llevó a volumen con el mismo disolvente.

Solución de referencia de Zalcitabina, 10 µg/mL.

Utilizando pipeta volumétrica, se transfirió 1 mL de la solución de 100 µg/mL de Zalcitabina a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución de referencia de Zalcitabina, 1000 ng/mL.

Utilizando pipeta volumétrica, se transfirió 1 mL de la solución de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Zalcitabina a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución de referencia de Zalcitabina, 100 ng/mL.

Utilizando pipeta volumétrica, se transfirieron 2 mL de la solución de 1000 ng/mL de Zalcitabina a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución de referencia de Zalcitabina, 10 ng/mL.

Utilizando pipeta volumétrica, se transfirieron 2 mL de la solución de 100 ng/mL de Zalcitabina a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución de referencia de Estavudina (E.I.), 100 $\mu\text{g/mL}$.

Se pesó con exactitud el equivalente 10 mg de sustancia referencia de Estavudina y transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió con agua grado cromatográfico y llevó a volumen con el mismo disolvente.

Solución de referencia de Estavudina, 20 $\mu\text{g/mL}$.

Utilizando pipeta volumétrica, se transfirieron 2 mL de la solución de 100 mg/mL de Estavudina a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua grado cromatográfico.

Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema.

Se transfirieron 2.5 mL de la solución de referencia de Zalcitabina de 1000 ng/mL y 1 mL de la solución de Estavudina 100 µg/mL a un matraz volumétrico de 20 mL, se llevó a volumen con agua CLAR. Esta solución contiene 125 ng/mL de Zalcitabina y 5 µg/mL de EstavudinaG.

Fase móvil

Las soluciones ocupadas como fase móvil fueron grado cromatográfico, la mezcla de proporción variable se filtró a través de una membrana de nylon de 0.45 micras de diámetro y se desgasificó por 15 min.

4.4.2. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.

Se prepararon cada uno de los puntos de la curva patrón y los controles (ver tabla 12) utilizando pipeta repetidora electrónica Eppendorf para tomar las alícuotas correspondientes.

Tabla 1. Preparación de curva de calibración y puntos control en plasma.

| Solución de referencia de Zalcitabina 10 ng/mL (μL) | Solución de referencia de Zalcitabina 100 ng/mL (μL) | Solución de referencia de Zalcitabina 1000 ng/mL (μL) | Volumen de agua (μL) | Concentración final Zalcitabina (ng/mL) |
|--|---|--|-----------------------------------|---|
| 10 | | | 40 | 0.1** |
| 30 | | | 20 | 0.3** |
| 50 | | | - | 0.5** |
| | 10 | | 40 | 1* |
| | 20 | | 30 | 2 |
| | 50 | | - | 5 |
| | | 10 | 40 | 10 |
| | | 20 | 30 | 20 |
| | | 25 | 25 | 25* |
| | | 35 | 15 | 35 |
| | | 40 | 10 | 40* |
| | | 50 | - | 50 |

*Puntos control de calidad bajo, medio y alto.

** Puntos para determinar el límite de cuantificación y límite de detección.

Se depositaron las alícuotas anteriores (50 μL de volumen final) en tubos Axigen de 2 mL, se añadieron 950 mL de plasma a cada tubo y se agitaron en vórtex durante 30 segundos.

4.4.3. Preparación de los puntos control en agua (sistema).

Se prepararon cada uno de los puntos (ver tabla 13) utilizando pipeta repetidora electrónica Eppendorf para tomar las alícuotas correspondientes y depositarlas en tubos Axigen de 2 mL.

Tabla 2. Preparación de puntos control en agua.

| Solución de Zalcitabina (1000 ng/mL) (μ L) | Solución de Zalcitabina (100 ng/mL) (μ L) | Solución de Estavudina (20 μ g/mL) (μ L) | Agua grado CLAR (μ L) | Concentración final de Zalcitabina (ng/mL) | Concentración equivalente en plasma (ng/mL) |
|---|--|---|----------------------------|--|---|
| - | 50 | 250 | 700 | 5 | 1 |
| 125 | - | 250 | 625 | 125 | 25 |
| 200 | - | 250 | 550 | 200 | 40 |

4.4.4. Adecuabilidad del sistema.

Con el fin de evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico y de llevar un monitoreo de la columna cromatográfica, se preparó una solución de 125 ng/mL de Zalcitabina y 5 μ g/mL de Estavudina en agua, dicha solución se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenaron en congelación a -70°C . Previo a cada corrida analítica, se descongeló una de las alícuotas y se realizaron mínimo 6 inyecciones consecutivas de 10 μ L, mismas que fueron procesadas de acuerdo al método de integración empleado para cuantificar las muestras plasmáticas

El sistema se consideró adecuado si cumplía con cada uno de los parámetros:

- Repetibilidad (área de pico y/o relación de áreas) con un C.V. $\leq 10\%$
- Repetibilidad (tiempo de retención) con un C.V. $\leq 2.0\%$

4.4.5. Linealidad.

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de pesadas independientes, se procesaron mediante el método de extracción establecido, se analizaron y se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste, en cada una de ellas se obtenía un $r \geq 0.99$ y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al 15% en todos los

puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al 20%.

4.4.6. Precisión del método

4.4.6.1. Repetibilidad.

A partir de una solución de referencia se procesó y cuantificó por quintuplicado, muestras plasmáticas de Zalcitabina de 1, 25 y 40 ng/mL, estas muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones de cada nivel. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15%.

4.4.6.2. Reproducibilidad

a) Reproducibilidad del método

Se evaluó la reproducibilidad entre días durante tres días empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente, a partir de la curva de calibración de Zalcitabina en plasma y los puntos de control de calidad (1, 25 y 40 ng/mL) por quintuplicado, se procesó y cuantificó mediante el método establecido.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), para cada día. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

b) Reproducibilidad entre analistas.**Analista 1.**

Se prepararon por quintuplicado, concentraciones de 1, 25 y 30 ng/mL de Zalcitabina en plasma, se cuantificaron mediante el método establecido, este proceso se realizó durante tres días.

Analista 2

Se prepararon por quintuplicado, concentraciones de 1, 25 y 30 ng/mL de Zalcitabina en plasma, se cuantificaron mediante el método establecido, este proceso se realizó durante tres días.

Se evaluó la reproducibilidad del método y exactitud interdía correspondiente a cada analista y entre los analistas determinando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), para cada día. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

4.4.7. Exactitud del método

Se evaluó tomando en cuenta el valor promedio en cada nivel de concentración de las determinaciones realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad de los puntos control éstos deben estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente.

El valor se determinó haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv Abs \%} = 100 \times \frac{|\text{Concentración nominal} - \text{Concentración Recuperada}|}{\text{Concentración nominal}}$$

4.4.8. Recobro

Se preparó y procesó por quintuplicado los puntos de control de calidad de Zalcitabina en plasma (1, 25 y 40 ng/mL) y se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas, contra las respuestas obtenidas en muestras de los analitos en solución a las mismas concentraciones, pero que no fueron sometidas al proceso de extracción.

El recobro no necesariamente debe ser del 100%, pero debe ser constante y suficiente para poder cuantificar el nivel mas bajo de concentración de la curva de calibración.

En el caso del recobro del estándar interno (E.I), éste se debe determinar haciendo uso de los valores obtenidos en las muestras plasmáticas para la evaluación de la precisión (15 en total) y compararlos con respecto a los obtenidos en solución respectivamente.

Para la zalcitabina y el estándar interno los valores promedio individuales no deben desviarse del promedio total en más del 15%.

4.4.9. Límite de cuantificación y Límite de detección

Se prepararon por quintuplicado, muestras de Zalcitabina en plasma a las concentraciones de 0.1, 0.3 y 0.5 ng/mL, las cuales fueron procesadas e inyectadas en el sistema cromatográfico correspondiente

El Limite de Cuantificación (LC) es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no se desvía mas del $\pm 20\%$ del valor nominal (concentración adicionada), con un $CV \leq 20\%$; mientras que el Límite de Detección (LD) es la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente tres veces mayor) y el CV de la concentración recuperada (precisión) y/o la desviación absoluta por ciento (exactitud) son mayores al 20%.

4.4.10. Selectividad.

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras de plasma provenientes de 6 voluntarios sanos diferentes (de forma individual y en mezcla) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como ácido salicílico (300 µg/mL), paracetamol (20µg/mL), naproxeno (100 µg/mL), Zidovudina (un fármaco que se administra en conjunto con Zalcitabina (2000 ng/mL) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Zalcitabina y el E.I.

4.4.11. Estabilidad

Esta prueba se llevó a cabo con el fin de determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto de interés (Zalcitabina) permaneció estable en la matriz biológica y en solución, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta (concentración) del compuesto en la matriz biológica.

a) Ciclos de congelación-descongelación, temperatura ambiente, refrigeración y estabilidad a largo plazo (congelación a -70°C).

Se evaluó el efecto de los cambios de temperatura sobre la estabilidad del fármaco, registrando los cambios en la concentración plasmática de Zalcitabina después de su exposición a tres ciclos de congelación/descongelación (dejando las muestras un periodo mínimo de 12 horas a -70°C entre cada ciclo), así como su estabilidad en plasma bajo condiciones de congelación a -70°C (estabilidad a largo plazo), temperatura ambiente y refrigeración, la cual se documentó de manera que por lo menos se cubriera el tiempo en el cual las muestras extraídas de los voluntarios permanecieron bajo éstas condiciones.

Para ello, se prepararon tres series de muestras de control de calidad conteniendo Zalcitabina a las siguientes concentraciones: 1, 25 y 40 ng/mL, procesándolas de acuerdo al método de extracción establecido, almacenándolas y analizándolas de acuerdo a la tabla 14.

Tabla 3. Preparación de muestras para las pruebas de estabilidad.

| Concentración (ng/mL) | Muestra | Condiciones de almacenamiento | Día de análisis | Cantidad de muestras a preparar |
|-------------------------|---------|--|--|---------------------------------|
| 1 | 1 | Tiempo cero o inicial | Inmediatamente después de su preparación | 3 |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 25 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 40 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 1 | 1 | Tres ciclos congelación-descongelación a -70°C | 24, 48 y 72 horas | 9 |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 25 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 40 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 1 | 1 | Largo plazo (congelación a -70°C) | 30 días | 3 |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 25 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 40 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 1 | 1 | Temperatura ambiente y refrigeración | 24 y 48 horas | 12 |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 25 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| 40 | 1 | | | |
| | 2 | | | |
| | 3 | | | |
| Total muestras 1 ng/mL | | | | 27 |
| Total muestras 25 ng/mL | | | | 27 |
| Total muestras 40 ng/mL | | | | 27 |

Los valores de concentración interpolada promedio obtenidos de las determinaciones en cada nivel de concentración, deben cumplir con el límite de $\pm 15\%$ del valor original (tiempo cero) para considerar que son estables bajo esas condiciones durante determinado tiempo.

b) Estabilidad de la muestra procesada en refrigeración a 10°C.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración, se prepararon por triplicado las muestras de control de calidad de Zalcitabina en plasma (nivel bajo medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción establecido y se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24, 48 y 72 horas después de su preparación.

Para que el compuesto de interés se considere estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio obtenidos para cada nivel de concentración deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido al tiempo cero.

4.4.12. Tolerancia

Durante la corrida experimental es necesario considerar variaciones de tipo sistemático producto de la propia experimentación mismas que podrían afectar en poca o en gran medida la confiabilidad de los resultados, por tal motivo se evaluó el impacto de:

1. Cambio en el pH de la fase móvil.

Se prepararon por triplicado, muestras de Zalcitabina en plasma a las concentraciones de 1, 25 y 40 ng/mL. Se evaluó la tolerancia del método modificando el pH de la mezcla de la fase móvil en ± 0.5 . El coeficiente de variación y desviación absoluta con respecto a la concentración nominal debe ser menor o igual al 15% en todas las concentraciones evaluadas.

2. Volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración).

Se preparó por triplicado una muestra del analito en plasma a una concentración de 80 ng/mL, se tomaron 500 μ L de ésta última y se completó el volumen a 1000 μ L con mezcla de plasma, se aplicó el proceso de extracción y posteriormente se determinó la concentración del analito en las mismas. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del 15% con respecto al valor nominal con un C.V menor o igual al 15%.

3. Volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración).

Se preparó por triplicado una muestra del analito en plasma, a una concentración de 25 ng/mL se tomaron 500 μ L de ésta última y se completó el volumen a 1000 μ L con mezcla de plasma, se aplicó el proceso de extracción y posteriormente se determinó la concentración del analito en las mismas. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del 15% respecto al valor nominal con un C.V menor o igual al 15%.

4. Tolerancia con muestras hemolizadas y lipémicas.

Se prepararon por triplicado muestras plasmáticas hemolizadas y lipémicas de Zalcitabina de 1, 25 y 40 ng/mL. La concentración recuperada debe mostrar un C.V. menor o igual al 15% y la desviación absoluta con respecto a la concentración nominal no debe ser mayor al 15%.

4.5. Etapa clínica

Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos señalados en la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

4.5.1. Criterios de inclusión.

La participación de los sujetos en el estudio de Zalcitabina fue de manera Voluntaria.

Se incluyeron solamente voluntarios sanos, de entre 18 y 40 años de edad.

- ◆ El índice de masa corporal de los sujetos fue para los voluntarios sanos del sexo masculino entre 19 y 30 y para el sexo femenino entre 18.5 y 29 según Quetelet.
- ◆ Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mm Hg la sistólica y de 60 a 90 mm Hg la diastólica, frecuencia cardiaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.
- ◆ El estado de salud de los voluntarios, se determinó por medio de la historia clínica y pruebas de laboratorio y gabinete.

Los exámenes de laboratorio y gabinete que se efectuaron para la inclusión de los sujetos al estudio fueron:

1. Hematología: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
2. Química sanguínea de 24 elementos
3. Marcadores para hepatitis B y C.
4. Detección de VIH.
5. Examen general de orina.

6. Prueba de embarazo al inicio del estudio.
7. Prueba de abuso de drogas al inicio del estudio.
8. Determinación de niveles de glucosa plasmática al inicio del estudio.
9. Electrocardiograma.

Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad para los valores de laboratorio fueron de +/- 10% del intervalo de lo normal, a menos que a criterio de la coordinación médica la desviación no fuese clínicamente significativa. Se anotaron estos valores en el expediente clínico del voluntario y se documentó la decisión de incluir al sujeto.

4.5.2. Criterios de exclusión de voluntarios

- ◆ Sujetos a los que se les encontró alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- ◆ Voluntarios que no cumplieron con los criterios de inclusión propuestos.
- ◆ Voluntarios con antecedentes de padecimientos cardiovasculares, renales, hepáticos, musculares, metabólicos, gastrointestinales incluyendo estreñimiento, neurológicos, endócrinos, hematopoyéticos o cualquier tipo de anemia, asma, enfermedad mental u otras anormalidades orgánicas. Así como aquellos que presentaron traumatismo muscular dentro de los 21 días previos al estudio.
- ◆ Voluntarios que requirieron de cualquier medicamento durante el curso del estudio, aparte de Zalcitabina.
- ◆ Voluntarios con antecedentes de dispepsia, gastritis, esofagitis, úlcera duodenal o gástrica.
- ◆ Voluntarios que estuvieron expuestos a medicamentos conocidos como inductores o inhibidores enzimáticos hepáticos o que tomaron medicamentos potencialmente tóxicos dentro de los 30 días previos al inicio del estudio.

- ◆ Voluntarios que recibieron cualquier medicamento, durante 14 días o 5 vidas medias (cualquiera que sea más largo) previos al inicio del estudio.
- ◆ Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- ◆ Sujetos que recibieron fármacos en investigación dentro de los 60 días previos al estudio.
- ◆ Sujetos alérgicos a cualquier antibiótico y/o a los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.
- ◆ Sujetos que ingirieron alcohol o bebidas que contenían xantinas (café, té, cocoa, chocolate, mate, refrescos de cola), alimentos asados al carbón. jugo de toronja dentro de las 72 horas previas al inicio del periodo de hospitalización, o sujetos que fumaron tabaco dentro de las 72 horas previas al inicio del estudio.
- ◆ Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 60 días previos al inicio del estudio.
- ◆ Sujetos con antecedentes de abuso de drogas y alcoholismo
- ◆ Voluntarias que resultaron positivas a la prueba cualitativa de embarazo.
- ◆ Voluntarios que presentaron concentraciones de glucosa $\geq 120\text{mg/dL}$

4.5.3. Retiro de voluntarios del estudio.

Los sujetos fueron retirados del estudio por no cumplir con el protocolo o en opinión del investigador por razones médicas (eventos adversos), estos sujetos no fueron reemplazados. Cualquier sujeto pudo en cualquier momento, dejar de participar en el estudio si así lo requería.

Todos los datos y muestras para biodisponibilidad, si las había, de los voluntarios que fueron retirados fueron enviados a la valoración analítica y se anexo la razón del porqué se retiraron del estudio.

4.5.4. Cronología del estudio.

Los voluntarios del estudio fueron informados con relación al protocolo de estudio, se aclararon sus dudas y se emitió su consentimiento en forma escrita. El estado de salud de los voluntarios se determinó mediante historia clínica, examen físico, electrocardiograma y pruebas de laboratorio.

Los voluntarios sanos fueron admitidos en IFaB, siendo hospitalizados entre las 6:00 y 6:30 horas del día indicado. Permanecieron internados alrededor de 12 horas y recibieron desayuno y comida. Una vez ingresados se les asignó su lugar dentro del estudio, se verificó su adecuado estado de hidratación, signos vitales y se realizó la prueba de embarazo, de abuso de drogas, se determinó el nivel de glucosa plasmática. Posteriormente los voluntarios fueron canalizados mediante un catéter en alguna de las venas del brazo y se tomó la muestra correspondiente al tiempo 0.

Se inició el tratamiento administrando por vía oral dos comprimidos de Zalcitabina de 0.750 mg (HIVID, Hecho en Estados Unidos por Hoffmann-La Roche Inc. para su distribución en México por Productos Roche, S.A. de C.V.),

El medicamento se ingirió después de por lo menos 10 horas de ayuno y cuatro horas antes del desayuno con 250 mL de agua.

El medicamento se administró a todos los voluntarios el día del estudio en grupos de dos a seis, dejando un tiempo de 3 a 10 minutos entre cada grupo.

Se tomaron muestras de sangre de 7 mL, con el sistema vacutainer en tubos estériles que contenían heparina como anticoagulante. Inmediatamente después las muestras se centrifugaron a 4500 r.p.m. durante 5 minutos. El plasma así obtenido, se transfirió a un criotubo debidamente etiquetado.

Las muestras se obtuvieron con una frecuencia temporal a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, y 90 minutos y 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 10 horas después de la administración. Las muestras blanco de cada voluntario se obtuvieron antes de la administración del medicamento.

La tolerancia para la toma de muestras fue de ± 1 minuto. La sangre se centrifugó para obtener el plasma que se mantuvo a -70 °C hasta su entrega al área Analítica. Se efectuó registro de signos vitales a los 30, y 90 minutos y a las 3, 8 y 10 horas después de la administración del fármaco, estas tomas pudieron variar en ± 5 minutos de lo establecido o dejar de tomarse ante cualquier eventualidad directamente relacionada con el estado de salud del voluntario.

La dosificación y muestras de sangre entre los sujetos, se mantuvo de manera que los tiempos para estas actividades fuesen los mismos. La hora exacta en la que se tomó la muestra se registró con las iniciales de la persona que la realizó y la forma de Reporte de Caso correspondiente.

Los voluntarios desayunaron cuatro horas después de la administración del medicamento.

4.5.5. Eventos adversos.

Todos los signos y síntomas de eventos adversos que ocurrieron durante el estudio se registraron en detalle en las formas de registro de eventos adversos correspondientes del sitio de Investigación Clínica. Cualquier reacción inusual o severa fue reportada dentro de las primeras 24 horas a las autoridades correspondientes.

En todo momento la seguridad de los sujetos fue el factor prioritario, en caso de reacciones adversas estas se atendieron sin importar que no se tomase la muestra correspondiente.

4.5.6. Aplicación del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma.

Se recibieron 639 muestras para su procesamiento correspondiente.

El análisis de muestras se llevó a cabo utilizando el método de cromatografía de alta resolución acoplado a un detector de masas previamente validado. En cada corrida se analizaron las muestras correspondientes a cinco voluntarios (80 muestras por cada corrida analítica)

Durante todas las corridas analíticas se evaluó la adecuabilidad del sistema mediante inyecciones consecutivas de una solución conteniendo Zalcitabina y Estavudina (E.I.) a concentraciones de 125 ng/mL y 5 µg/mL respectivamente, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 10% para el área (y/o relación de áreas) y para el tiempo de retención un CV% ≤ 5.0.

Adicionalmente cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias con el pico de interés de la solución con la que se eluyen las muestras (blanco de reactivos), ni con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma).

Las muestras del estudio se analizaron junto con una curva de calibración y 6 muestras de control de calidad (1, 25, 40 ng/ mL por duplicado), para evaluar la validez de la corrida analítica, colocando las muestras de control de calidad siguiendo el esquema control bajo-medio-alto intercaladas cada 16 muestras de voluntarios.

Los resultados de las muestras de voluntarios fueron generados por el paquete computacional Mass Lynx®

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Desarrollo del método analítico.

El equipo utilizado durante el desarrollo, validación y análisis de muestras se describe a continuación.

Tabla 1. Equipo cromatográfico.

| | Características. |
|---------------------|--|
| Cromatógrafo | Bomba binaria 1525 μ de Waters. Automuestreador 2777 con módulo refrigerante. |
| Detector | Masas Micromass ZQ. |
| Horno | TSM Waters. |

5.1.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno.

Las condiciones óptimas del detector para la cuantificación de Zalcitabina se muestran en la tabla 16.

Tabla 2. Condiciones del detector.

| Parámetro | Valor | Parámetro | Valor |
|------------------|--------------|----------------------|--------------|
| Electrospray | Positivo | Desolvation Gas Flow | 700 |
| Capillary (kv) | 0.54 | LM1 Resolution | 9 |
| Cone (v) | 26 | HM1 Resolution | 11 |
| Extractor | 1 | Ion energy | 0.6 |
| RF Lens | 0.5 | Multiplier | 750 |
| Source Temp | 140 | Zalcitabina (m/z) | 111.99 |
| Desolvation Temp | 400 | Estavudina (m/z) | 126.96 |
| Cone Gas Flow | 6 | | |

Se eligió a estavudina como estándar interno ya que de las dos posibles moléculas (estavudina y zidovudina) ésta presentó relaciones masa carga (m/z) con niveles de respuesta óptimos para su cuantificación mismas que no interfirieron en la cuantificación de Zalcitabina, presentó un tiempo de retención adecuado (8-9 minutos) y permitió, por tanto que el método analítico resultara selectivo para ambos fármacos.

5.1.2. Condiciones cromatográficas.

Los criterios establecidos en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

- ◆ Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- ◆ Seguimiento de la presión.
- ◆ Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).
- ◆ Sensibilidad.
- ◆ Resolución entre picos.
- ◆ Ancho del pico.
- ◆ Simetría de los picos.

1) Fase móvil, fase estacionaria y temperatura de trabajo

La fase móvil (componentes, proporción y pH), fase estacionaria (columna cromatográfica) y temperatura de trabajo que cumplieron con los criterios anteriormente mencionados se muestran en la tabla 17.

2) Volumen de inyección y velocidad de flujo.

Al experimentar con volúmenes mayores a $20\mu\text{L}$ se observaron distorsiones del pico de interés mientras que con volúmenes de $5\mu\text{L}$ se perdía precisión en el análisis. Por otra parte velocidades de flujo menores a $0.6\ \mu\text{L}/\text{min}$ provocaban distorsiones en la forma de pico y obviamente tiempos de retención mas prolongados.

De lo anterior el volumen de inyección y velocidad de flujo que cumplieron con los criterios de aceptación previamente establecidos fueron los siguientes.

Tabla 3. Descripción de las condiciones cromatográficas.

| | Descripción |
|-----------------------------|---|
| Fase Móvil | Acetato de amonio 10 mM pH 6.5: Metanol (80:20 v/v) |
| Velocidad de Flujo | 0.6 mL/min |
| Columna | X-Terra MS C18, 5 μ m, 250 x 4.6 mm |
| Temperatura columna | 40° C |
| Volumen de inyección | 10 μ L |
| Velocidad de flujo | 0.6 mL/min |

Una vez determinados los parámetros cromatográficos los tiempos de retención de Zalcitabina y estavudina fueron:

- Zalcitabina: 5.5 -6 minutos.
- Estavudina: 8-9 minutos.

5.1.3. Método de extracción.

El método de extracción se determinó en función de un recobro constante en el rango de concentraciones de trabajo, así como de la selectividad del método.

Al probar la técnica con los cartuchos Bond Elut C18 (Varian) y OASIS HLB (Waters), no se observaron diferencias significativas en cuanto a recobro y pureza de la muestra una vez analizada, por lo que el criterio de selección fue estrictamente de tipo económico, optando por los cartuchos Bond Elut C18 (Varian).

Durante la evaluación de la fase de activación se determinó que volúmenes de 2 mL de metanol seguidos de 2mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 0.01M pH=7.0 nos permitieron obtener un recobro constante en el rango de trabajo.

En cuanto al volumen de lavado se estudiaron volúmenes de 1 y 2 mL de solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico 0.01M pH=7.0, obteniendo menores impurezas sin pérdida de recobro de los analitos (Zalcitabina y estavudina) con un volumen de 2 mL.

Para la reconstitución de muestras se utilizaron mezclas de soluciones orgánico-acuosas en varias proporciones y se observó que las impurezas aumentaban al incrementar la proporción de fase orgánica, por lo que se eligió agua grado CLAR al 100%. Con lo que respecta al volumen de reconstitución de la muestra, se evaluar 100 y 200 μ L (muestra concentrada 10 y 5 veces respectivamente), observándose un incremento de impurezas al concentrar la muestra, razón por la cual se decidió utilizar 200 μ L como volumen de reconstitución.

De los resultados anteriores se estableció un método de extracción que minimiza la cantidad de impurezas y permite un recobro aceptable del analito en la muestra y que se describe a continuación:

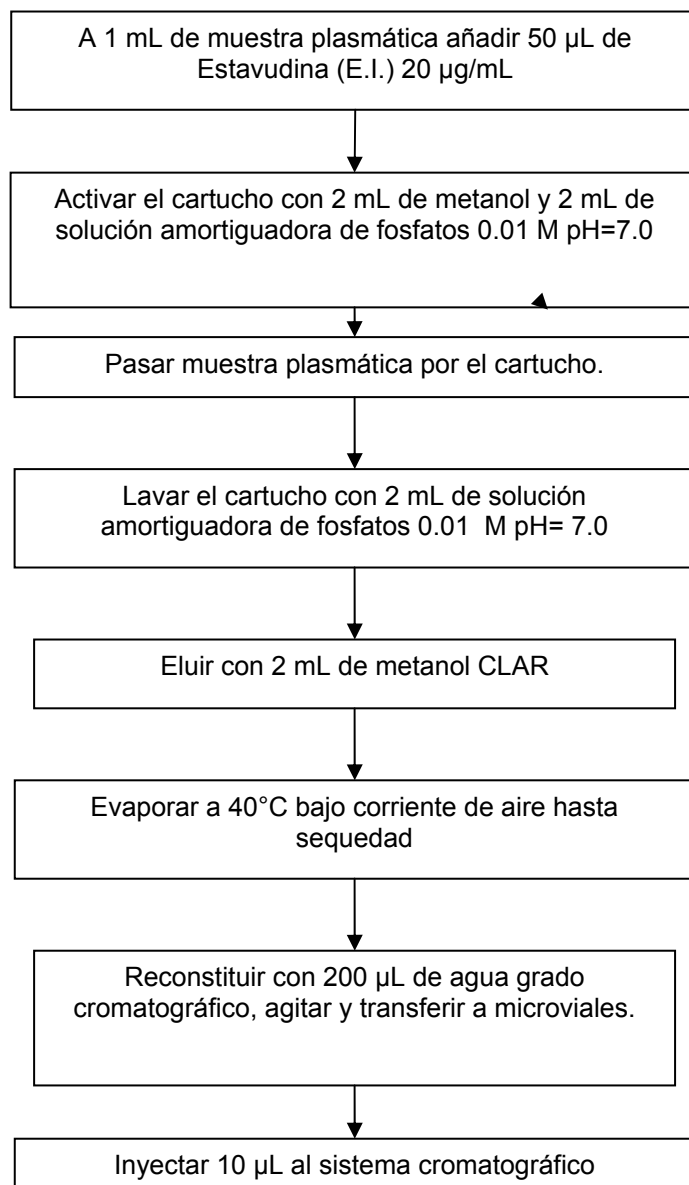


Figura 1. Proceso de extracción sólido-líquido de muestras plasmáticas.

5.2. RESULTADOS DE VALIDACIÓN.

5.2.1. Adecuabilidad del sistema.

Durante todas las corridas analíticas de la validación y al inicio del día de trabajo se evaluó la adecuabilidad del sistema mediante inyecciones consecutivas de una solución que contenía Zalcitabina y Estavudina (E.I.) a concentraciones de 125 ng/mL y 5 µg/mL respectivamente. La variabilidad (coeficiente de variación C.V. %) de todas las corridas analíticas se muestran a continuación:

Tabla 4. Adecuabilidad del sistema.

| No. de la corrida analítica | Analito | C.V%. del tiempo de retención (min) | C.V% de la respuesta (N=6) | C.V% de la relación de áreas (N=6) |
|-----------------------------|-------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 1 | Zalcitabina | 0.28 | 6.69 | 4.28 |
| | E.I. | 0.28 | 5.37 | |
| 2 | Zalcitabina | 0.28 | 4.93 | 5.45 |
| | E.I. | 0.06 | 5.24 | |
| 3 | Zalcitabina | 0.53 | 3.46 | 7.35 |
| | E.I. | 0.53 | 7.71 | |
| 4 | Zalcitabina | 0.36 | 0.29 | 8.06 |
| | E.I. | 0.40 | 7.93 | |
| 5 | Zalcitabina | 0.00 | 3.16 | 3.04 |
| | E.I. | 0.07 | 3.60 | |
| 6 | Zalcitabina | 0.20 | 0.85 | 3.77 |
| | E.I. | 0.73 | 3.61 | |
| 7 | Zalcitabina | 0.27 | 6.69 | 9.01 |
| | E.I. | 0.20 | 5.37 | |
| 8 | Zalcitabina | 0.27 | 4.88 | 3.51 |
| | E.I. | 0.13 | 6.29 | |

Las corridas analíticas cumplen con el criterio de aceptación ya que se obtuvo un coeficiente de variación no mayor al 10% para el área (y/o relación de áreas) y tiempo de retención con CV% ≤ 2.0. Adicionalmente cada día de análisis se comprobó que en la solución en la que se eluyen las muestras (blanco de reactivos) como en la matriz biológica utilizada (blanco de plasma) no existieran interferencias con el pico de interés.

5.2.2. Linealidad del método.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración (ver tabla 19 y figura 13), fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación $1/x$, donde la variable “y” es la relación de áreas Zalcitabina/E.I obtenida para la concentración nominal de Zalcitabina “x”. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, y la exactitud considerando las primeras 3 curvas de la validación del método analítico.

El método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.3 a 50 ng/mL; todos los valores de "r" obtenidos fueron mayores a 0.99. En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir con un C.V% y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite de cuantificación. La tabla 20 muestra las concentraciones obtenidas al aplicar la ponderación $1/X$.

Tabla 5. Resultados de la linealidad del método (Relación de áreas).

| CONC NOM (ng/mL) | 0.3 | 0.5 | 2 | 5 | 10 | 20 | 35 | 50 |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CURVA 1 | 0.0102 | 0.0155 | 0.0397 | 0.1067 | 0.1871 | 0.4041 | 0.7446 | 0.9066 |
| CURVA 2 | 0.0114 | 0.0169 | 0.0401 | 0.0786 | * | 0.3884 | 0.7135 | 0.9953 |
| CURVA 3 | 0.0128 | * | 0.0468 | 0.1220 | 0.2019 | 0.4099 | 0.7489 | 1.1295 |
| PROMEDIO | 0.011 | 0.016 | 0.042 | 0.102 | 0.195 | 0.401 | 0.736 | 1.010 |
| DESV EST | 0.001 | 0.001 | 0.004 | 0.022 | 0.010 | 0.011 | 0.019 | 0.112 |
| C.V. (%) | 11.35 | 6.11 | 9.45 | 21.49 | 5.38 | 2.78 | 2.63 | 11.11 |
| % DESV ABS | 0.0102 | 0.0155 | 0.0397 | 0.1067 | 0.1871 | 0.4041 | 0.7446 | 0.9066 |

* Valores no considerados por exceder el ± 15% de desviación con respecto a la concentración nominal

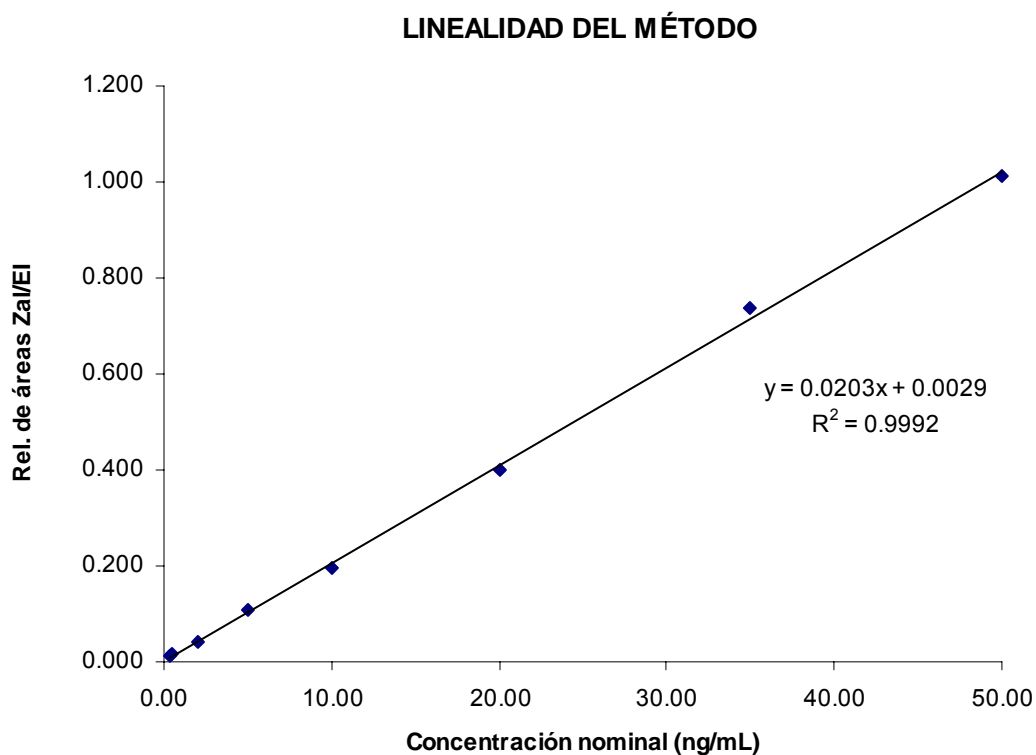


Figura 2. Linealidad del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma.

Tabla 6. Concentraciones obtenidas al aplicar la ponderación 1/X.

| CONC NOM (ng/mL) | 0.3 | 0.5 | 2 | 5 | 10 | 20 | 35 | 50 | Datos de ajuste | | |
|---------------------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|-----------------|----------|--------|
| | | | | | | | | | Pendiente | Ordenada | r |
| CURVA 1 | 0.28 | 0.55 | 1.81 | 5.27 | 9.42 | 20.64 | 38.23 | 46.60 | 0.0193 | 0.0048 | 0.9972 |
| CURVA 2 | 0.29 | 0.56 | 1.73 | 5.39 | * | 19.28 | 35.67 | 49.88 | 0.0198 | 0.0058 | 0.9995 |
| CURVA 3 | 0.33 | * | 1.91 | 5.40 | 9.11 | 18.78 | 34.54 | 52.23 | 0.0220 | 0.0058 | 0.9987 |
| PROMEDIO | 0.298 | 0.558 | 1.813 | 5.353 | 9.269 | 19.568 | 36.147 | 49.570 | 0.020 | | |
| DESV EST | 0.024 | 0.005 | 0.089 | 0.075 | 0.218 | 0.959 | 1.891 | 2.827 | 0.001 | | |
| C.V. (%) | 7.981 | 0.888 | 4.924 | 1.408 | 2.357 | 4.901 | 5.232 | 5.704 | 7.053 | | |
| % DESV ABS | 0.778 | 11.500 | 9.350 | 7.060 | 7.315 | 2.160 | 3.278 | 0.859 | | | |

* Valores no considerados por exceder el $\pm 15\%$ de desviación con respecto a la concentración nominal.

5.2.3. Precisión del método.

5.2.3.1. Repetibilidad y exactitud intradía.

En la tabla 21 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad y exactitud intradía, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 9.20%, mientras que la desviación absoluta (Desv.abs%) fue menor o igual que 7.14%.

Tabla 7. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar zalcitabina en plasma.

| Muestra | Control Bajo (1ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 | 1.070 | 23.618 | 40.865 |
| 2 | 0.865 | 25.844 | 41.852 |
| 3 | 0.894 | 22.686 | 38.165 |
| 4 | 0.946 | 27.831 | 34.929 |
| 5 | 0.868 | 27.691 | 35.053 |
| Promedio | 0.929 | 25.534 | 38.173 |
| D. E | 0.09 | 2.33 | 3.20 |
| C. V (%) | 9.20 | 9.14 | 8.39 |
| Conc. Nominal (ng/mL) | 1.0 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 7.14 | 2.14 | 4.57 |

5.2.3.2. Reproducibilidad analista 1 y exactitud intralaboratorio.

En la tabla 22 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía del analista 1, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 7.95 a 9.72%, mientras que la desviación absoluta % fue igual o menor a 4.46%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 8. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre días (analista 1).

| Inv / Día | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Inv 1 Día 1 | 1.070 | 23.618 | 40.865 |
| | 0.865 | 25.844 | 41.852 |
| | 0.894 | 22.686 | 38.165 |
| | 0.946 | 27.831 | 34.929 |
| | 0.868 | 27.691 | 35.053 |
| Inv 1 Día 2 | 1.044 | 21.937 | 40.197 |
| | 0.947 | 22.434 | 43.596 |
| | 1.011 | 21.382 | 35.906 |
| | 0.912 | 13.549* | 35.312 |
| | 0.989 | 22.876 | 39.607 |
| Inv 1 Día 3 | 1.122 | 25.767 | 38.309 |
| | 2.544* | 22.922 | 41.484 |
| | 1.096 | 26.299 | 42.230 |
| | 1.043 | 21.231 | 43.697 |
| | 0.916 | 21.86 | 36.424 |
| Promedio | 0.980 | 23.884 | 39.175 |
| D. E | 0.085 | 2.321 | 3.115 |
| C. V (%) | 8.72 | 9.72 | 7.95 |
| Conc. Nominal (ng/mL) | 1.0 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 1.98 | 4.46 | 2.06 |

*Resultado fuera del $\pm 15\%$ del valor nominal y que no se consideró para los cálculos por ser dato aberrante, lo cual fue determinado a través de la aplicación de las pruebas de Dixon y el procedimiento T para datos aberrantes.

De acuerdo con los resultados generados, el método fue repetible, reproducible y exacto al cumplir con los criterios de un coeficiente de variación y una desviación absoluta % no mayores al 15% para la concentración plasmática promedio.

5.2.3.3. Reproducibilidad analista 2 y exactitud entre analistas.

En la tabla 23 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía del analista 2, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 5.986% a 8.682%, mientras que la desviación absoluta % fue igual o menor a 7.515 %, en las diferentes concentraciones evaluadas.

En la tabla 24 se muestran los resultados de reproducibilidad y exactitud del método entre analistas, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los analistas fue de 7.51 a 9.04%, mientras que la desviación absoluta % fue igual o menor a 4.69%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 9. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre analistas (analista2).

| Inv / Día | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Inv 2 Día 1 | 1.039 | 25.557 | 19.82* |
| | 0.927 | 28.114 | 36.442 |
| | 0.939 | 23.160 | 36.579 |
| | 1.037 | 22.168 | 35.302 |
| | 1.004 | 11.297* | 39.286 |
| Inv2 Día 2 | 1.071 | 27.762 | 40.819 |
| | 1.08 | 24.253 | 36.243 |
| | 0.947 | 24.021 | 35.501 |
| | 1.056 | 23.497 | 43.235 |
| | 1.133 | 21.783 | 36.399 |
| Inv 2 Día 3 | 1.061 | 23.794 | 34.137 |
| | 0.942 | 24.186 | 37.513 |
| | 0.977 | 21.905 | 36.143 |
| | 1.047 | 23.748 | 36.175 |
| | 1.028 | 21.025 | 34.142 |
| Promedio | 1.019 | 23.927 | 36.994 |
| D. E | 0.061 | 2.077 | 2.531 |
| C. V (%) | 5.986 | 8.682 | 6.842 |
| Conc. Nominal (ng/mL) | 1.0 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 1.920 | 4.293 | 7.515 |

[*] Resultado fuera del $\pm 15\%$ del valor nominal y que no se consideró para los cálculos por ser dato aberrante, lo cual fue determinado a través de la aplicación de las pruebas de Dixon y el procedimiento T para datos aberrantes.

Tabla 10. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma entre analistas.

| Concentración | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Promedio | 1.000 | 23.905 | 38.122 |
| D. E | 0.075 | 2.161 | 3.010 |
| C. V (%) | 7.51 | 9.04 | 7.89 |
| Conc. Nominal | 1.0 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 0.04 | 4.38 | 4.69 |

5.2.4. Recobro.

El recobro del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro global del 50.55% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15% (ver tabla 25).

En la tabla 26 se muestra el % de recobro obtenido para el estándar interno (Estavudina).

Tabla 11. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma.

| | ÁREAS | | %Recobro | % Desv. |
|-------------------------------------|------------------|-----------------|--------------|-------------|
| | SISTEMA | MÉTODO | | |
| Control Bajo (1 ng/mL) | 51497.44 | 27748.72 | | |
| | 51417.16 | 29708.58 | | |
| | 48811.30 | 3005.65 | | |
| | 51395.65 | 28697.82 | | |
| | 49640.84 | 29820.42 | | |
| Promedio | 50552.5 | 23796.2 | 47.07 | 6.87 |
| Control Medio (25 ng/mL) | 953913.94 | 506956.97 | | |
| | 938370.38 | 499185.19 | | |
| | 765015.13 | 482507.56 | | |
| | 932446.75 | 466223.38 | | |
| | 940839.13 | 470419.56 | | |
| Promedio | 906117.1 | 485058.5 | 53.53 | 5.91 |
| Control Alto (40 ng/mL) | 1381707.50 | 670853.75 | | |
| | 1331978.63 | 685989.31 | | |
| | 1328444.38 | 704222.19 | | |
| | 1336492.88 | 698246.44 | | |
| | 1385793.88 | 692896.94 | | |
| Promedio | 1352883.5 | 690441.7 | 51.03 | 0.97 |
| Promedio Global | | | 50.55 | 4.58 |

Tabla 12. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma (EI).

| | ÁREAS | | %Recobro |
|-------------------|------------------------|-----------------|--------------|
| | SISTEMA | MÉTODO | |
| 5 µg/mL | 787892.25 | 268066.13 | |
| | 847500.94 | 463266.78 | |
| | 871432.38 | 287431.03 | |
| | 899150.63 | 252425.98 | |
| | 840107.88 | 301263.28 | |
| | 798229.44 | 233585.20 | |
| | 758333.06 | 691490.69 | |
| | 1392171.13 | 344923.97 | |
| | 874659.19 | 624535.69 | |
| | 769778.81 | 305589.50 | |
| | 763024.69 | 774152.81 | |
| | 749280.06 | 278266.53 | |
| | 750091.13 | 235731.17 | |
| | 804999.19 | 322537.78 | |
| | 847473.81 | 25900.90 | |
| Promedio | 850275.0 | 360611.2 | 42.41 |
| | Promedio Global | | 42.41 |
| *E.I.= ESTAVUDINA | | | |

5.2.5. Límite de detección y cuantificación.

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD). En la tabla 27 se muestran los resultados:

Tabla 13. Límite de detección y cuantificación del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma.

| Muestra | Concentración (0.1 ng/mL) | Concentración (0.3 ng/mL) | Concentración (0.5 ng/mL) |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 0.000* | 0.254 | 0.554 |
| 2 | 2.229 | 0.265 | 0.521 |
| 3 | 0.000* | 0.248 | 0.584 |
| 4 | 0.000* | 0.262 | 0.580 |
| 5 | 0.013 | 0.282 | 0.430 |
| Promedio | 0.448 | 0.262 | 0.534 |
| D. E | 1.00 | 0.01 | 0.06 |
| C. V (%) | 221.99 | 4.93 | 11.85 |
| Conc. Nominal (ng/mL) | 0.1 | 0.3 | 0.5 |
| Desv. Abs. (%) | 348.40 | 12.60 | 6.76 |

* Sin respuesta

El límite de cuantificación establecido fue de 0.3 ng/mL (precisión y exactitud de 4.93% y 12.60% respectivamente), al no desviarse en $\pm 20\%$ del valor nominal y tener un $CV \leq 20\%$.

Por otro lado, la concentración nominal de 0.1 ng/mL fue considerada como el LD, debido a que la relación señal/ruido que se presenta a este nivel es mayor a 3 (ver figura 14).

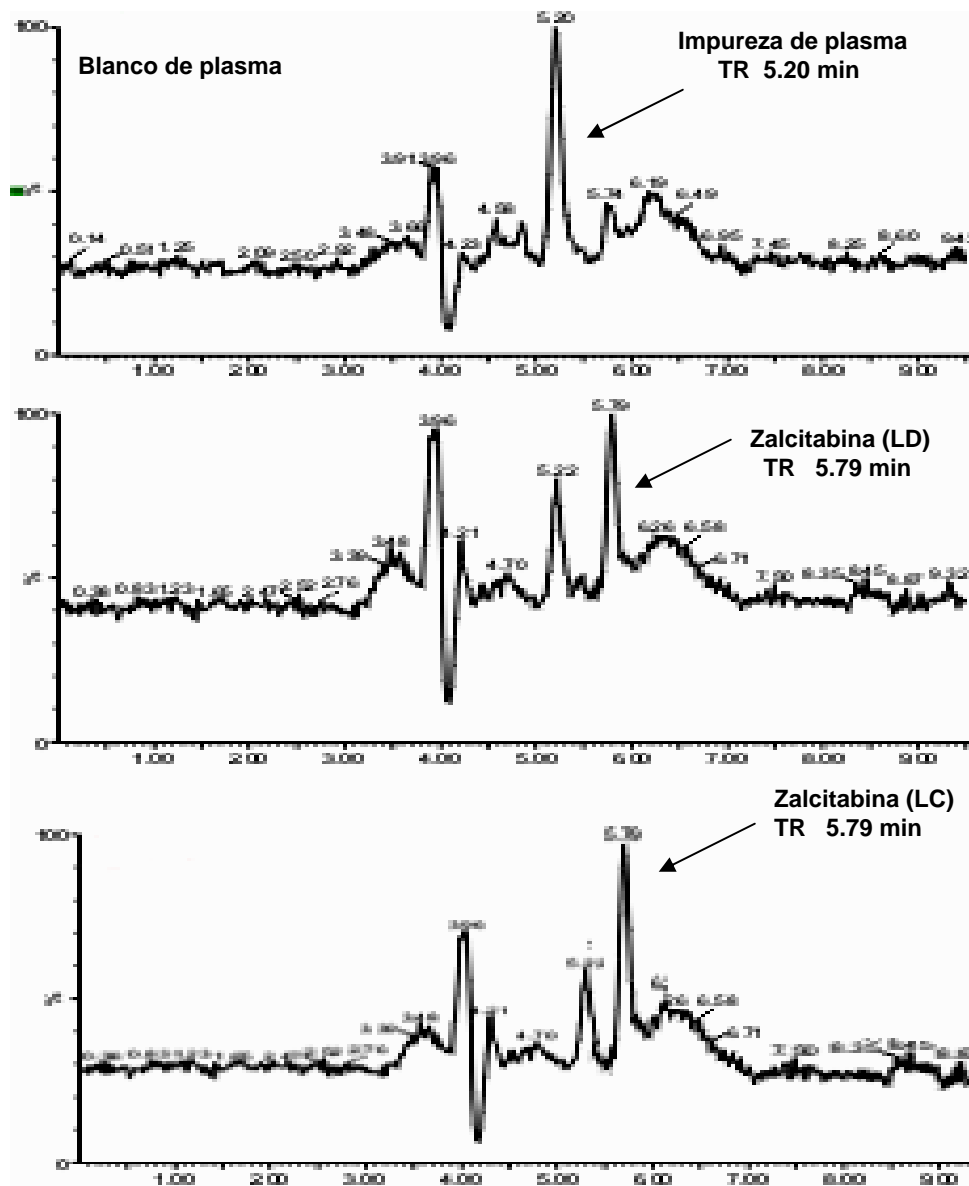


Figura 3. Límite de detección y cuantificación.

Cromatogramas correspondientes a: a) Blanco de plasma b) Límite de detección c) Límite de cuantificación

5.2.6. Selectividad.

El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados; ácido salicílico, paracetamol, naproxeno, zidovudina y el anticoagulante heparina al no presentarse interferencias con el pico cromatográfico de Zalcitabina ni el E.I. (ver figura 15).

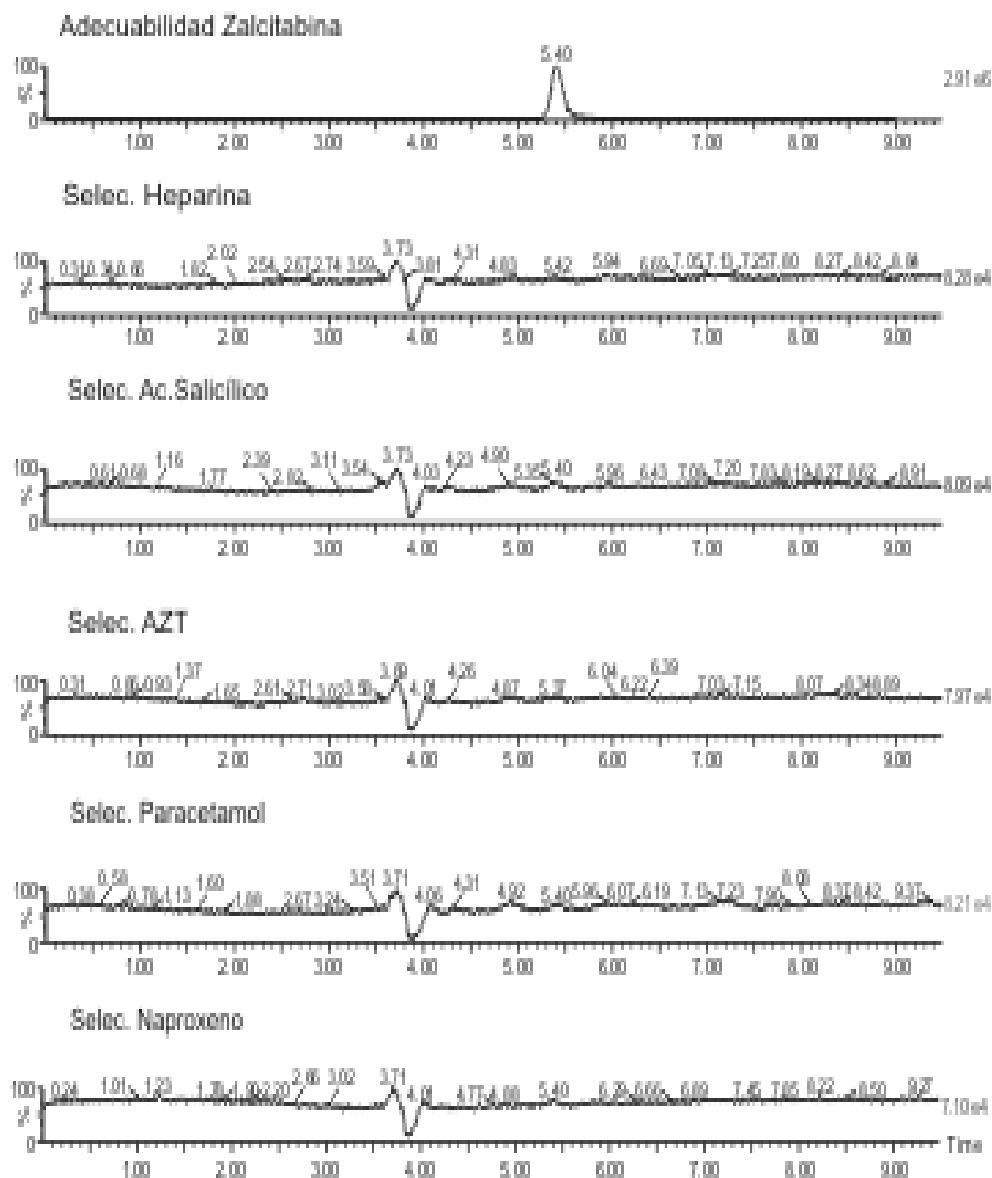


Figura 4. Selectividad del método para el fármaco Zalcitabina.

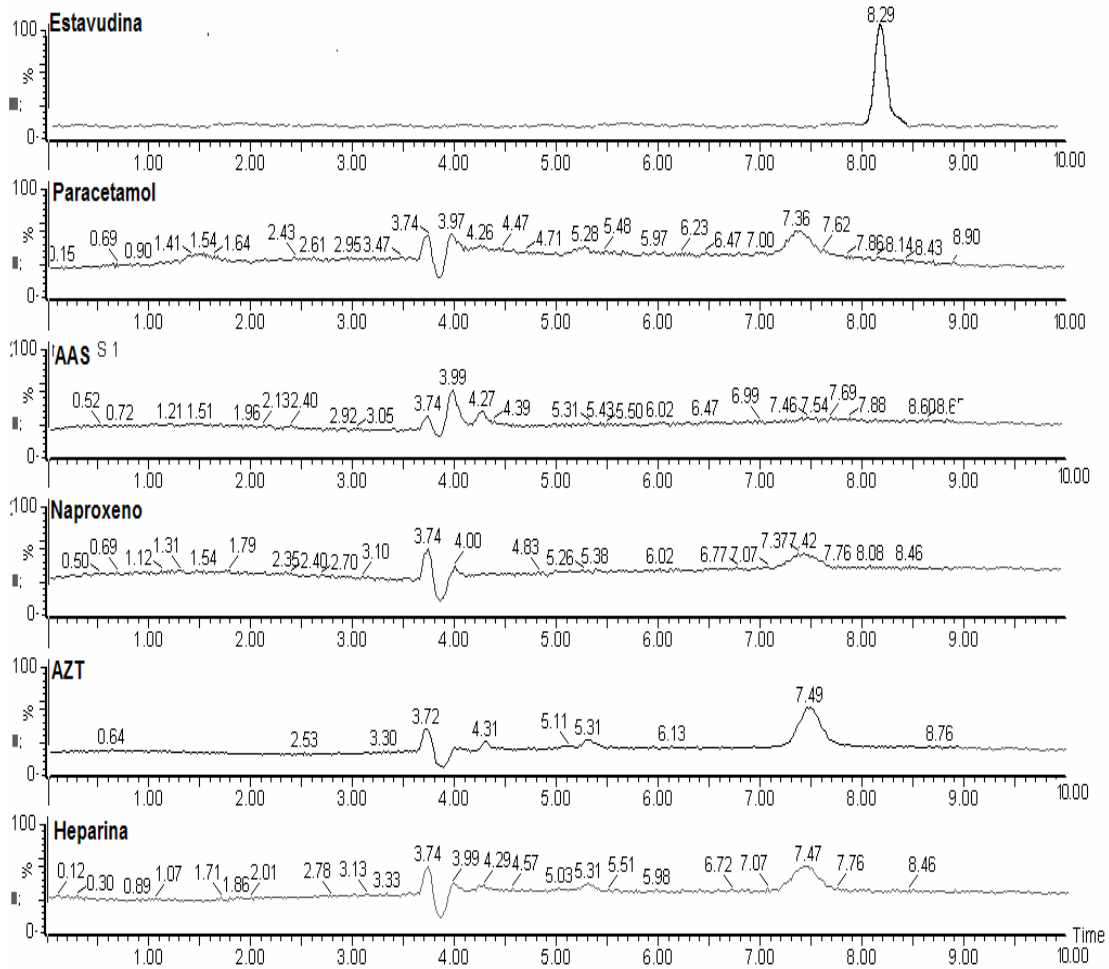


Figura 5. Selectividad del método para el estándar interno (Estavudina).

Los cromatogramas demuestran la selectividad del método para cuantificar Zalcitabina como para Estavudina al no producirse interferencias con los analitos de interés.

5.2.7. Estabilidad.

5.2.7.1. Ciclos de congelación-descongelación.

Se muestran los resultados obtenidos de las muestras en plasma de Zalcitabina (ver tabla 28). Las muestras fueron sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación, dejando 24 horas de diferencia entre cada ciclo.

Tabla 14. Estabilidad ciclos congelación descongelación.

| Condición Inicial (t= 0 h) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 |
| D.E | 0.013 | 1.490 | 3.433 |
| C.V. (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 |
| 1er. ciclo | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.095 | 22.585 | 39.920 |
| 2 | 1.128 | 22.117 | 41.812 |
| 3 | 1.149 | 22.316 | 34.564 |
| Promedio | 1.124 | 22.339 | 38.765 |
| D.E | 0.027 | 0.235 | 3.759 |
| C.V. (%) | 2.422 | 1.051 | 9.698 |
| Desv. Abs. (%) | 2.058 | 14.888 | 4.685 |
| 2o. ciclo | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.055 | 22.046 | 34.033 |
| 2 | 0.921 | 27.396 | 36.649 |
| 3 | 0.994 | 27.982 | 38.891 |
| Promedio | 0.990 | 25.808 | 36.524 |
| D.E | 0.067 | 3.271 | 2.431 |
| C.V. (%) | 6.777 | 12.675 | 6.657 |
| Desv. Abs. (%) | 10.109 | 1.673 | 10.195 |
| 3er. Ciclo | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.113 | 25.642 | 41.919 |
| 2 | 1.065 | 25.819 | 35.113 |
| 3 | 1.136 | 26.438 | 35.179 |
| Promedio | 1.105 | 25.966 | 37.404 |
| D.E | 0.036 | 0.418 | 3.911 |
| C.V. (%) | 3.279 | 1.610 | 10.455 |
| Desv. Abs. (%) | 0.303 | 1.069 | 8.033 |

Las muestras fueron estables durante tres ciclos congelación-descongelación ya que no se presentan coeficientes de variación superiores al 15% ni presentan diferencias mayores al 15% con respecto al valor de referencia (tiempo cero).

5.2.7.2. Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración.

En las tablas 29 y 30 se muestran los resultados del análisis de muestras de estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración respectivamente.

Tabla 15. Estabilidad a temperatura ambiente.

| Condición Inicial (t= 0 h) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 |
| D.E | 0.013 | 1.490 | 3.433 |
| C.V. (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 |
| 24 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.128 | 26.356 | 39.290 |
| 2 | 1.085 | 26.644 | 45.587 |
| 3 | 1.116 | 21.852 | 41.045 |
| Promedio | 1.110 | 24.951 | 41.974 |
| D.E | 0.022 | 2.687 | 3.250 |
| C.V. (%) | 2.000 | 10.771 | 7.742 |
| Desv. Abs. (%) | 0.757 | 4.939 | 3.205 |
| 48 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.116 | 22.829 | 35.478 |
| 2 | 1.111 | 22.047 | 37.889 |
| 3 | 1.139 | 23.023 | 38.628 |
| Promedio | 1.122 | 22.633 | 37.332 |
| D.E | 0.015 | 0.517 | 1.647 |
| C.V. (%) | 1.331 | 2.283 | 4.413 |
| Desv. Abs. (%) | 1.877 | 13.769 | 8.210 |

Las muestras son estables durante 48 horas a temperatura ambiente, mostrando una desviación absoluta % con respecto al valor original menor o igual que $\pm 15\%$.

Tabla 16. Estabilidad en refrigeración.

| Condición Inicial (t= 0 h) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 |
| D.E | 0.013 | 1.490 | 3.433 |
| C.V. (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 |
| 24 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.126 | 28.185 | 34.696 |
| 2 | 1.147 | 21.441 | 41.593 |
| 3 | 1.078 | 22.096 | 34.430 |
| Promedio | 1.117 | 23.907 | 36.906 |
| D.E | 0.035 | 3.719 | 4.061 |
| C.V. (%) | 3.166 | 15.556 | 11.003 |
| Desv. Abs. (%) | 1.423 | 8.914 | 9.256 |
| 48 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.103 | 24.957 | 35.694 |
| 2 | 1.148 | 23.156 | 34.926 |
| 3 | 1.128 | 24.590 | 39.966 |
| Promedio | 1.126 | 24.234 | 36.862 |
| D.E | 0.023 | 0.952 | 2.715 |
| C.V. (%) | 2.002 | 3.927 | 7.366 |
| Desv. Abs. (%) | 2.270 | 7.668 | 9.365 |

Las muestras son estables durante 48 horas en refrigeración, mostrando una desviación absoluta % con respecto al valor original menor o igual que $\pm 15\%$.

5.2.7.3. Estabilidad a largo plazo (congelación a -70°C).

Las series de muestras de control de calidad (bajo, medio y alto) preparadas por triplicado, de las cuales la primera serie fue procesada y analizada de manera inmediata (tiempo cero) y las muestras restantes fueron almacenadas a -70°C. La segunda serie de muestras fue descongelada y analizada a los 30 días posteriores a su preparación.

Tabla 17. Estabilidad a largo plazo (-70°C).

| Condición Inicial (t= 0 h) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 |
| D.E | 0.013 | 1.490 | 3.433 |
| C.V. (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 |
| 31 días | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.125 | 27.333 | 44.802 |
| 2 | 1.022 | 27.235 | 45.007 |
| 3 | 1.082 | 28.017 | 39.888 |
| Promedio | 1.076 | 27.528 | 43.232 |
| D.E | 0.052 | 0.426 | 2.898 |
| C.V. (%) | 4.806 | 1.548 | 6.704 |
| Desv. Abs. (%) | 2.270 | 4.882 | 6.299 |

Los resultados anteriores demuestran que Zalcitabina es estable en plasma en congelación a -70°C durante 30 días, ya que no presenta una desviación absoluta % mayor al 15% con respecto a su valor al tiempo cero.

5.2.7.4. Estabilidad de la muestra procesada.

En la tabla 32 se muestran los resultados obtenidos de las muestras procesadas las cuales se inyectaron en el sistema cromatográfico (tiempo cero). Los controles permanecieron en el automuestreador a 10°C y fueron inyectados a las 192 y 216 horas.

Tabla 18. Estabilidad de la muestra procesada.

| Condición Inicial (t= 0 h) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.044 | 21.937 | 40.197 |
| 2 | 0.947 | 22.434 | 43.596 |
| 3 | 1.011 | 21.382 | 35.906 |
| Promedio | 1.001 | 21.918 | 39.900 |
| D.E | 0.049 | 0.526 | 3.854 |
| C.V. (%) | 4.929 | 2.401 | 9.658 |
| 192 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.062 | 21.574 | 36.518 |
| 2 | 0.886 | 21.375 | 35.842 |
| 3 | 1.000 | 26.651 | 34.844 |
| Promedio | 0.983 | 23.200 | 35.735 |
| D.E | 0.089 | 2.990 | 0.842 |
| C.V. (%) | 9.085 | 12.889 | 2.357 |
| Desv. Abs. (%) | 9.598 | 7.185 | 12.144 |
| 216 horas | | | |
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.108 | 20.688 | 40.907 |
| 2 | 0.972 | 20.760 | 40.410 |
| 3 | 1.132 | 26.058 | 29.142* |
| Promedio | 1.071 | 22.502 | 40.659 |
| D.E | 0.086 | 3.080 | 0.351 |
| C.V. (%) | 8.059 | 13.687 | 0.864 |
| Desv. Abs. (%) | 1.503 | 9.978 | 0.039 |

*Resultado fuera del $\pm 15\%$ del valor nominal y que no se consideró para los cálculos por ser dato aberrante, lo cual fue determinado a través de la aplicación de las pruebas de Dixon y el procedimiento T para datos aberrantes.

Se puede observar que Zalcitabina fue estable en la solución de inyección a -10°C hasta 216 horas posteriores a su preparación, ya que la concentración recuperada promedio mostró una desviación absoluta % respecto al valor original menor que 15%.

5.2.8. Tolerancia.

En seguida se muestran los resultados de las muestras de concentraciones 1, 25 y 40 ng/mL de Zalcitabina en plasma, las cuales se inyectaron en las condiciones originales del método y posteriormente modificando las condiciones del instrumento.

5.2.8.1. Cambio en el pH de la fase móvil.

En la tabla 33 se muestran los resultados de la modificación en el pH de la fase móvil de 6.5 a 7.0.

Tabla 19. Tolerancia del método analítico al cambio de pH de la fase móvil.

| Condición Inicial pH 6.5 | | | | Condiciones modificadas (Fase móvil pH 7.0) | | |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|
| Muestra | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 | 1.446 | 21.980 | 30.010 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 | 1.286 | 24.895 | 29.490 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 | 1.592 | 24.817 | 32.089 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 | 1.441 | 23.897 | 30.530 |
| D.E | 0.013 | 1.490 | 3.433 | 0.153 | 1.661 | 1.375 |
| C.V. (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 | 10.619 | 6.950 | 4.505 |
| Conc. Abs. (ng/mL) | 1 | 25 | 40 | 1 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 10.1 | 4.988 | 1.677 | 44.133 | 4.411 | 23.676 |

*Fase móvil: Acetato de amonio 0.01 M

El método no fue tolerante al cambio de pH ya que al comparar las concentraciones interpoladas de los puntos control a las condiciones modificadas con respecto a su concentración nominal, éstas presentaron una exactitud mayor al 15%.

5.2.8.2. Prueba de volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración).

Los resultados obtenidos señalan que en caso de que alguna muestra presente una concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración, puede emplearse un volumen menor (500 μ L) el que debe completarse a 1 mL con una mezcla de plasma finalmente analizándola, logrando así que la concentración quede dentro de la curva de calibración.

Tabla 20. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma con volumen parcial de muestra (por encima de la curva de calibración)

| MUESTRA DE 80 ng/mL | |
|--|----------|
| 1 | 43.274 |
| 2 | 42.945 |
| 3 | 45.129 |
| Utilizando un factor de dilución de 2 | |
| 1 | 86.548 |
| 2 | 85.890 |
| 3 | 90.258 |
| Concentración nominal | 80 ng/mL |
| PROMEDIO | 87.565 |
| DESV EST | 1.178 |
| C.V. (%) | 1.345 |
| Desv. Abs. (%) | 9.457 |

5.2.8.3. Prueba de volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración).

La prueba se realizó cuantificando tres muestras de 25 ng/mL empleando la mitad del volumen (0.5 mL), completando a 1 mL con una mezcla de plasma y sometiéndolas a las condiciones establecidas para la extracción. Los resultados se muestran en la tabla 35.

Tabla 21. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma con volumen parcial de muestra (dentro de la curva de calibración).

| MUESTRA DE 25 ng/mL | |
|---------------------------------------|----------|
| 1 | 12.011 |
| 2 | 12.635 |
| 3 | 13.014 |
| Utilizando un factor de dilución de 2 | |
| 1 | 24.022 |
| 2 | 25.270 |
| 3 | 26.028 |
| Concentración nominal | 25 ng/mL |
| PROMEDIO | 25.107 |
| DESV EST | 0.506 |
| C.V. (%) | 2.017 |
| Desv. Abs. (%) | 0.427 |

Los resultados muestran que en caso de que no hubiera suficiente muestra, se podría utilizar un volumen menor para procesarla sin que se vea comprometido el resultado.

5.2.8.4. Muestras lipémicas y hemolizadas.

La evaluación sobre el efecto de las muestras lipémicas y hemolizadas en la respuesta cromatográfica, se muestra en las tablas 36 y 37 respectivamente:

Tabla 22. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma lipémico.

| Muestra | Condición Inicial (t= 0 h) | | | Plasma lipémico | | |
|----------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| | Control Bajo (1ng/mL) | Control Medio (25ng/mL) | Control Alto (40ng/mL) | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 | 1.111 | 26.536 | 36.512 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 | 1.073 | 26.833 | 38.801 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 | 1.039 | 22.885 | 35.266 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 | 1.074 | 25.418 | 36.860 |
| D. E | 0.013 | 1.490 | 3.433 | 0.036 | 2.199 | 1.793 |
| C. V (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 | 3.353 | 8.650 | 4.864 |
| Conc. Nominal | 1 | 25 | 40 | 1 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 10.1 | 4.988 | 1.677 | 7.433 | 1.672 | 7.851 |

Tabla 23. Tolerancia del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma hemolizado.

| Muestra | Condición Inicial (t= 0 h) | | | plasma hemolizado | | |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) | Control Bajo (1 ng/mL) | Control Medio (25 ng/mL) | Control Alto (40 ng/mL) |
| 1 | 1.087 | 24.723 | 38.114 | 1.055 | 28.364 | 36.54 |
| 2 | 1.111 | 26.317 | 44.572 | 1.039 | 26.143 | 39.97 |
| 3 | 1.106 | 27.701 | 39.326 | 1.009 | 26.936 | 41.92 |
| Promedio | 1.101 | 26.247 | 40.671 | 1.034 | 27.148 | 39.473 |
| D. E | 0.013 | 1.490 | 3.433 | 0.023 | 1.126 | 2.723 |
| C. V (%) | 1.150 | 5.678 | 8.440 | 2.258 | 4.146 | 6.897 |
| Conc. nominal | 1 | 25 | 40 | 1 | 25 | 40 |
| Desv. Abs. (%) | 10.1 | 4.988 | 1.677 | 3.433 | 8.591 | 1.318 |

Con los resultados anteriores se concluye que el método no se ve afectado por utilizar plasma lipémico o hemolizado.

La validación del método analítico para cuantificar Zalcitabina en plasma mediante CLAR acoplada a un detector de masas, sujeto a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, cumplió satisfactoriamente los criterios normativos correspondientes, por lo que se puede aplicar en un estudio de biodisponibilidad de dicho fármaco en población mexicana.

5.3. Etapa clínica.

En el estudio clínico participaron 40 voluntarios (15 mujeres y 25 hombres) clínicamente sanos, demostrado a través de exámenes de laboratorio y gabinete. Los voluntarios fueron informados con relación al protocolo de estudio, posteriormente se emitió su consentimiento en forma escrita.

5.3.1. Estadística demográfica descriptiva.

De la estadística demográfica de los voluntarios participantes en el estudio se calcularon: la media, desviación estándar (Desv.Est), Error Estándar (Error Est), Mínimo (Min), Mediana, Máximo (Max) y Coeficiente de Variación (C.V%) de las variables demográficas de edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC) para los voluntarios que ingresaron al estudio (ver tabla 38). Los valores individuales se muestran en el Anexo II

Tabla 24. Estadística descriptiva de las variables demográficas.

| Variable | Género | N | Media | Desv. Estándar | Error Estándar | Min | Mediana | Max | CV% |
|--------------------------|---------|----|--------|----------------|----------------|--------|---------|--------|-------|
| Edad (años) | Hombres | 25 | 23.68 | 4.08 | 0.82 | 19.00 | 23.00 | 32.00 | 17.23 |
| | Mujeres | 15 | 24.00 | 4.64 | 1.20 | 18.00 | 24.00 | 35.00 | 19.35 |
| | Global | 40 | 23.80 | 4.24 | 0.67 | 18.00 | 23.50 | 35.00 | 17.83 |
| Peso (Kg) | Hombres | 25 | 68.97 | 7.09 | 1.42 | 57.00 | 69.00 | 82.50 | 10.28 |
| | Mujeres | 15 | 57.86 | 6.83 | 1.76 | 46.50 | 58.00 | 73.00 | 11.81 |
| | Global | 40 | 64.80 | 8.79 | 1.39 | 46.50 | 64.00 | 82.50 | 13.57 |
| Talla (cm) | Hombres | 25 | 170.16 | 4.85 | 0.97 | 158.00 | 169.00 | 178.00 | 2.85 |
| | Mujeres | 15 | 158.33 | 5.02 | 1.30 | 149.00 | 160.00 | 165.00 | 3.17 |
| | Global | 40 | 165.73 | 7.56 | 1.20 | 149.00 | 167.00 | 178.00 | 4.56 |
| IMC (Kg/m ²) | Hombres | 25 | 23.85 | 2.55 | 0.51 | 19.20 | 24.00 | 29.58 | 10.69 |
| | Mujeres | 15 | 23.08 | 2.50 | 0.65 | 19.14 | 22.76 | 27.52 | 10.85 |
| | Global | 40 | 23.56 | 2.53 | 0.40 | 19.14 | 23.55 | 29.58 | 10.73 |

5.3.2. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.

En la tabla 39 se presenta la estadística descriptiva para los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo de Zalcitabina, se observa que el número de voluntarios considerado para el análisis estadístico fue de 40. Los datos individuales se muestran en el Anexo III.

Tabla 25. Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de Zalcitabina con respecto al tiempo.

| Tiempo (h) | N | Media (µg/mL) | Desv. Est (µg/mL) | Error Est (µg/mL) | Min (µg/mL) | Mediana (µg/mL) | Max (µg/mL) | CV% |
|------------|----|---------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------|-------------|--------|
| 0 | 40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | - |
| 0.167 | 39 | 0.62 | 1.64 | 0.26 | 0.00 | 0.00 | 8.05 | 265.58 |
| 0.333 | 40 | 4.95 | 5.57 | 0.88 | 0.00 | 2.86 | 20.76 | 112.50 |
| 0.5 | 40 | 11.62 | 8.51 | 1.35 | 0.00 | 10.36 | 36.21 | 73.26 |
| 0.667 | 40 | 15.66 | 9.52 | 1.50 | 0.00 | 15.84 | 41.05 | 60.76 |
| 0.833 | 40 | 18.30 | 9.78 | 1.55 | 0.37 | 18.15 | 39.58 | 53.44 |
| 1 | 40 | 18.28 | 10.42 | 1.65 | 0.66 | 15.97 | 47.82 | 57.04 |
| 1.25 | 40 | 17.46 | 9.83 | 1.55 | 0.32 | 16.45 | 49.27 | 56.31 |
| 1.5 | 40 | 14.68 | 6.56 | 1.04 | 0.54 | 14.24 | 28.72 | 44.68 |
| 2 | 40 | 12.22 | 4.97 | 0.79 | 2.52 | 11.91 | 25.09 | 40.66 |
| 3 | 40 | 9.03 | 3.55 | 0.56 | 3.06 | 8.53 | 15.91 | 39.37 |
| 4 | 40 | 7.22 | 3.82 | 0.60 | 2.29 | 6.56 | 21.38 | 52.84 |
| 5 | 40 | 4.43 | 2.00 | 0.32 | 0.90 | 4.65 | 8.02 | 45.14 |
| 6 | 40 | 2.77 | 1.36 | 0.21 | 0.00 | 3.01 | 6.63 | 48.99 |
| 8 | 40 | 1.25 | 0.71 | 0.11 | 0.00 | 1.24 | 2.65 | 56.53 |
| 10 | 40 | 0.63 | 0.51 | 0.08 | 0.00 | 0.71 | 2.20 | 80.74 |

5.3.3. Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica).

Con la finalidad de visualizar el comportamiento farmacocinética de Zalcitabina, se presentan las gráficas de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (figuras 17 y 18), así como los perfiles para cada voluntario (ver Anexo IV).

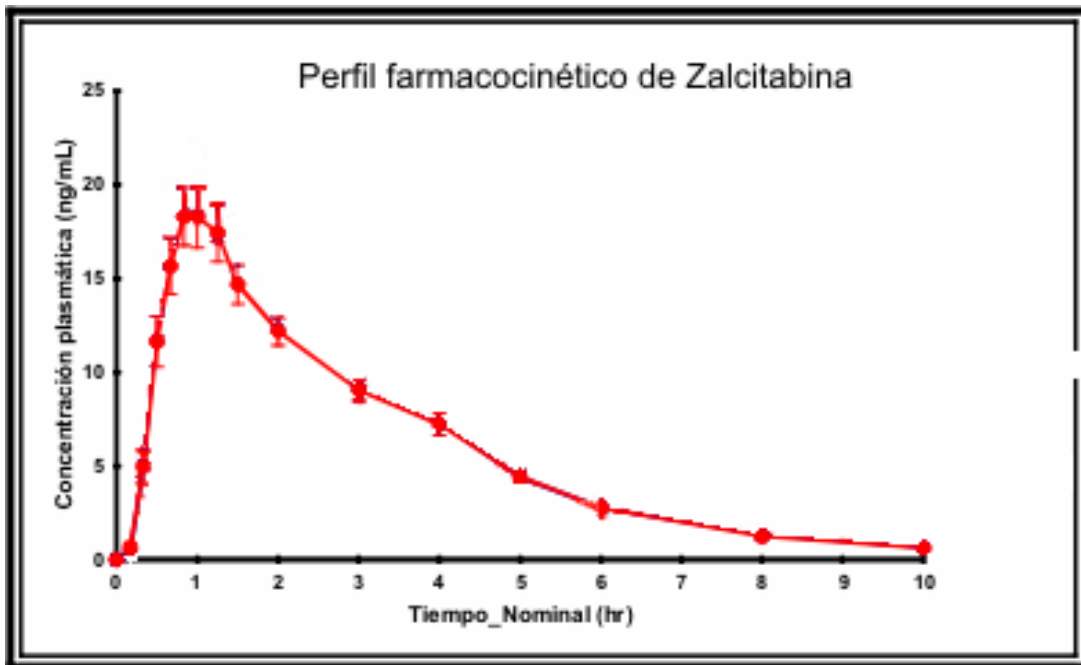


Figura 6. Perfil farmacocinético promedio de Zalcitabina \pm error estándar en escala normal.

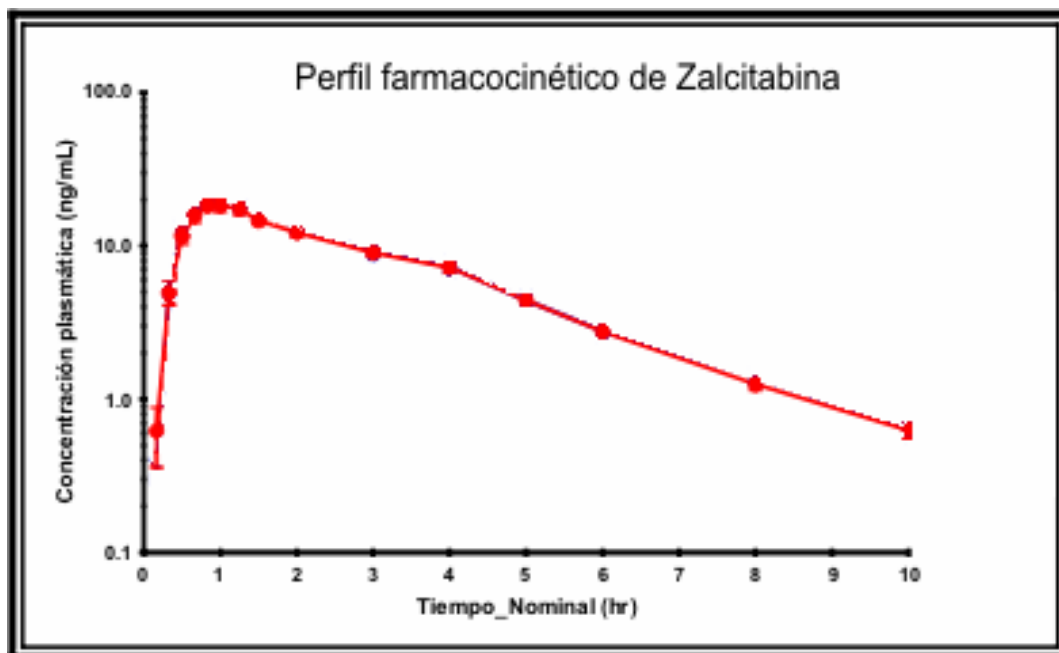


Figura 7. Perfil farmacocinético promedio de Zalcitabina en escala semilogarítmica.

5.3.4. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente) considerando los siguientes aspectos:

5.3.4.1. Cálculo de parámetros farmacocinéticos.

- ◆ C_{max}: Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- ◆ T_{max}: Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- ◆ ABC 0-t: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula.

$$ABC_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Donde:

n= número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil plasmático.

ti= tiempo en que se realiza la iésima toma de muestra

Ci= Concentración obtenida en el iésimo tiempo de muestreo.

- ◆ ABC 0-inf: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración al tiempo extrapolado al infinito.

$$ABC_{0-inf} = ABC_{0-t} + C_f/Ke$$

Donde:

Cf= Concentración de la última muestra

Ke= Constante de eliminación

- ◆ Ke: constante de eliminación: se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica)

- ◆ Vida media de Ke: mediante el cociente de Ln(2)/Ke

- ◆ TMRo-inf: Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito..

$$TMR_{0-inf} = \frac{ABCM_{0-inf}}{ABC_{0-inf}}$$

- ◆ ABCM 0-inf: Área bajo la curva del primer momento extrapolado a tiempo infinito

$$ABCM_{0-inf} = \sum_{i=1}^n \frac{(t_n C_n + t_{n-1} C_{n-1})(t_n - t_{n-1})}{2} + \frac{t_f C_f}{Ke} + \frac{C_f}{Ke^2}$$

Donde:

t_f = Tiempo de la última muestra

C_f = Concentración de la última muestra

La estadística descriptiva se presenta a continuación en la tabla 40. En el Anexo V se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos para cada voluntario.

Tabla 26. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de Zalcitabina.

| Variable | N | Media | Desv. Est | Error Est | Min | Mediana | Max | C.V.% |
|-------------------------------|----|--------|-----------|-----------|--------|---------|---------|-------|
| Tmax (h) | 40 | 1.16 | 0.65 | 0.10 | 0.67 | 1.00 | 4.00 | 56.52 |
| Cmax (ng/mL) | 40 | 22.93 | 9.19 | 1.45 | 7.68 | 22.07 | 49.27 | 40.10 |
| ABCo-t (h*ng/mL) | 40 | 59.08 | 21.62 | 3.42 | 16.88 | 58.96 | 102.55 | 36.59 |
| ABCo-inf (h*ng/mL) | 40 | 61.56 | 22.34 | 3.53 | 17.77 | 62.45 | 104.88 | 36.28 |
| Vida Media de eliminación (h) | 40 | 1.84 | 0.52 | 0.08 | 0.90 | 1.80 | 3.30 | 28.37 |
| TMRo-inf (h) | 40 | 3.23 | 0.62 | 0.10 | 2.01 | 3.20 | 5.17 | 19.33 |
| Vd/F (L) | 40 | 73.91 | 35.65 | 5.64 | 22.92 | 66.10 | 197.10 | 48.23 |
| Cl/F (mL/min) | 40 | 484.85 | 257.89 | 40.78 | 238.36 | 400.52 | 1406.99 | 55.19 |

La determinación de los parámetros farmacocinéticos que se muestran en la tabla anterior, nos permitieron caracterizar la farmacocinética de Zalcitabina en la población mexicana, los cuales no presentaron diferencias en relación a los reportados en la literatura en población caucásica^{19,25,26}, por lo que, la biodisponibilidad del fármaco no se modifica por efecto de la raza, al menos en nuestra población.

6. CONCLUSIONES.

Se desarrolló una metodología analítica para cuantificar Zalcitabina en plasma empleando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) acoplada a un detector de masas y se validó de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Dicha metodología resultó ser eficaz, confiable, reproducible y sensible en el rango de concentraciones evaluado, por lo que pudo ser aplicado en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana para caracterizar el perfil farmacocinético de una forma farmacéutica con este principio activo.

Las características que conforman el estudio clínico resultaron del todo satisfactorias, ya que en conjunto con la metodología analítica validada nos permitieron una adecuada caracterización de los parámetros farmacocinéticos principales, cuyos valores resultaron ser semejantes a los reportados en la literatura en población caucásica, por lo que se atribuye que la raza no influye en la biodisponibilidad del fármaco Zalcitabina.

El presente trabajo de tesis adquiere una especial trascendencia, ya que puede ser aplicado en un estudio de biodisponibilidad comparativa entre diferentes formas farmacéuticas o estudios de bioequivalencia, permitiendo la obtención de medicamentos de calidad a costos accesibles, beneficiando a la población infectada por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y contribuyendo al mejoramiento de su calidad de vida.

ANEXOS

ANEXO I. CARACTERÍSTICAS DE FARMACOS ANTIRRETROVIRALES.

Características de los Inhibidores de la Transcriptasa Reversa Análogos a Nucleósidos (ITRAN)

| Nombre Genérico | Nombre comercial | Presentación | Precio (pesos) | Dosis | Efectos secundarios |
|----------------------|------------------|--|----------------------|---|---|
| Zidovudina (AZT,ZDV) | Retrovir | Cápsulas 100 mg/100. Cápsulas 250 mg./ 30 | \$120.00 \$110.00 | 200 mg, 3 veces/ día (500 o 600 mg/ día) | Supresión de médula ósea: anemia y/o neutropenia, intolerancia gastrointestinales, cefalea, insomnio, astenia, acidosis láctica con esteatosis hepática |
| Didanosina (ddl) | Vldex | Tabletas masticables 100 mg/ 60 tabletas | \$548.35 | > 60kg @ 200 mg 2 veces/día < 60 kg @ 125 mg 2 veces/día | Pancreatitis, neuropatía periférica, náusea, diarrea, acidosis láctica con esteatosis hepática |
| Zalcitabina (ddc) | HIVID | Tabletas 0.375 mg/ 100 tab. Tabletas 0.750 mg/ 100 tab. | --- \$2,153.00 | 0.75 mg 3 veces/día | Neuropatía periférica, estomatitis, acidosis láctica con esteatosis hepática |
| Estavudina (d4T) | Zerit | Cápsulas 15 mg cápsulas 40 mg | \$340.00 \$95 | > 60 kg @ 40 mg 2 veces/día < 60kg @ 30 mg 2 veces/día | Neuropatía periférica, rash, acidosis láctica con esteatosis hepática |
| Lamivudina (3TC) | 3TC | Tabletas 150 mg/ 60 tabletas | \$2,148.40 | 150 mg 2 veces/día | (Mínima toxicidad) Acidosis láctica con esteatosis hepática |
| Abacavir (ABC) | Ziagenavir | Tabletas 300 mg/60 tab. | \$2,364.90 | 300 mg 2 veces/día | Náusea, vómito,cefalea, dolor abdominal, rash (Nota: reacción de hipersensibilidad en 2-5% en las primeras 4 semanas (NO REINICIAR TX) |

Inhibidores de la Transcriptasa Reversa No Nucleósidos (ITRNN)

| Nombre Genérico | Nombre comercial | Presentación | Precio (pesos) | Dosis | Efectos secundarios |
|------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------|---|---|
| Neviparina | Viramune | Tabletas de 200 mg/60 tab. | \$2,200.00 | 200mg/una vez al día/14 días después 200 mg/dos veces al día | Exantema Hepatitis Elevación de transaminasas |
| Delavirdina | Rescriptor | Tabletas de 100 mg | --- | 400 mg/tres veces al día | Exantema Cefalea |
| Efavirenz | Estorcin | Tabletas 200 mg Tabletas 600 mg | --- \$777.72 | 600 mg/una vez al día antes de dormir | Exantema Síntomas neurológicos Elevación de transaminasas |

Características de los Inhibidores de Proteasa (IP)

| Nombre genérico | Nombre comercial | Presentación | Precio (pesos) | Dosis | Efectos secundarios |
|------------------------|-------------------------|---|-----------------------|--|--|
| Indinavir | Crixivan | Cápsulas 400 mg/ 180 cap. | \$1,013.11 | 800 mg c/8 hr Tomar 1 hr antes ó 2 hr después de los alimentos. | Nefrolitiasis, intolerancia gastrointes-tinal (GI), bilirrubina indirecta, cefalea, mareo, hiperglucemia |
| Ritonavir | Norvir | Cápsulas 100 mg/ 2 envases de 84 cap c/u Solución 80 mg/mL | \$2,241.00 | 600 mg c/12 hr Tomar con alimentos | Intolerancia GI, parestesias, hepoatitis, astenia, alteración del gusto, hiperglucemia |

Características de los Inhibidores de Proteasa (IP).

| Nombre genérico | Nombre comercial | Presentación | Precio (pesos) | Dosis | Efectos secundarios |
|-----------------|------------------|--|--------------------|--|--|
| Saquinavir | Invirase | Cápsulas 200 mg | ----- | Solo uso en combinación con Ritonavir o Nelfinavir 400 mg 2 veces/día Tomar con alimentos abundantes | Intolerancia GI, cefalea, transaminasas, hiperglucemia |
| | Fortovase | Cápsulas 200 mg | \$1,535.00 | 1200 mg 3 veces/día Tomar con alimentos abundantes | Intolerancia GI, dolor abdominal, cefalea, transamina-sas, hiperglucemia |
| Nelfinavir | Viracept | Tabletas 250 mg/270 tab. Polvo 50 mg/g/144g | \$3,519.00 ---- | 750 mg 3 veces/día Tomar con alimentos | Diarrea, hiperglucemia alteración en distribución de lípidos, episodios de sangrado en hemofílicos |
| Amprenavir | Agenerase | Cápsulas 150 mg/ 180 cap | \$2,512.70 | 1200 mg 2 veces/día | Náusea, diarrea, rash, parestesias bucales, cefalea, fatiga, vómito |

ANEXO II.DATOS DEMOGRAFICOS DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO.

**Datos demográficos individuales de los participantes en el estudio
(mujeres)**

| Género | Voluntario | Edad (años) | Peso (Kg) | Talla (cm) | IMC (Kg/m ²) |
|---------|------------|-------------|-----------|------------|--------------------------|
| Mujeres | 1 | 18 | 58.5 | 162 | 22.29 |
| | 2 | 21 | 46.5 | 151 | 20.39 |
| | 3 | 24 | 59 | 161 | 22.76 |
| | 4 | 20 | 49 | 160 | 19.14 |
| | 8 | 20 | 73 | 165 | 26.81 |
| | 13 | 24 | 52.8 | 161 | 20.37 |
| | 16 | 35 | 61.1 | 149 | 27.52 |
| | 20 | 24 | 56 | 165 | 20.57 |
| | 23 | 25 | 62 | 160 | 24.22 |
| | 24 | 25 | 55 | 158 | 22.03 |
| | 25 | 20 | 58 | 160 | 22.66 |
| | 26 | 22 | 59 | 156 | 24.24 |
| | 27 | 33 | 53.5 | 150 | 23.78 |
| | 28 | 24 | 69 | 161 | 26.62 |
| | 38 | 25 | 55.5 | 156 | 22.81 |

**Datos demográficos individuales de los participantes en el estudio
(hombres)**

| Género | Voluntario | Edad (años) | Peso (Kg) | Talla (cm) | IMC (Kg/m ²) |
|---------|------------|-------------|-----------|------------|--------------------------|
| Hombres | 5 | 20 | 57 | 168 | 20.2 |
| | 6 | 23 | 58.2 | 171 | 19.9 |
| | 7 | 24 | 69 | 166 | 25.04 |
| | 9 | 24 | 60 | 158 | 24.03 |
| | 10 | 24 | 79 | 172 | 26.7 |
| | 11 | 20 | 61.5 | 172 | 20.79 |
| | 12 | 25 | 73 | 169 | 25.56 |
| | 14 | 23 | 75 | 165 | 27.55 |
| | 15 | 22 | 69 | 177 | 22.02 |
| | 17 | 19 | 82.5 | 167 | 29.58 |
| | 18 | 20 | 64 | 168 | 22.68 |
| | 19 | 19 | 75.2 | 178 | 23.73 |
| | 21 | 31 | 73 | 167 | 26.18 |
| | 22 | 28 | 61 | 167 | 21.87 |
| | 29 | 25 | 77 | 174 | 25.43 |
| | 30 | 32 | 79 | 172 | 26.7 |
| | 31 | 22 | 67 | 167 | 24.02 |
| | 32 | 23 | 71 | 172 | 24 |
| | 33 | 20 | 70 | 165 | 25.71 |
| | 34 | 20 | 58.8 | 175 | 19.2 |
| 35 | 19 | 74 | 178 | 23.36 | |
| 36 | 25 | 64 | 168 | 22.68 | |
| 37 | 22 | 68 | 172 | 22.99 | |
| 39 | 30 | 70 | 168 | 24.8 | |
| 40 | 32 | 68 | 178 | 21.46 | |

ANEXO III. CONCENTRACIÓN DE ZALCITABINA EN PLASMA PARA CADA VOLUNTARIO EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO.

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 0 | ZAL 1 | ND | 2 | 0 | ZAL 17 | ND |
| | 0.167 | ZAL 2 | 1.027 | | 0.167 | ZAL 18 | NC |
| | 0.333 | ZAL 3 | 11.343 | | 0.333 | ZAL 19 | 16.862 |
| | 0.5 | ZAL 4 | 15.204 | | 0.5 | ZAL 20 | 16.951 |
| | 0.667 | ZAL 5 | 13.633 | | 1 | ZAL 21 | 16,387 |
| | 0.833 | ZAL 6 | 13.367 | | 0.667 | ZAL 22 | 22.137 |
| | 1 | ZAL 7 | 17.26 | | 0.833 | ZAL 23 | 19.682 |
| | 1.25 | ZAL 8 | 14.445 | | 1.25 | ZAL 24 | 14,083 |
| | 1.5 | ZAL 9 | 9.478 | | 1.5 | ZAL 25 | 14,158 |
| | 2 | ZAL 10 | 8.88 | | 2 | ZAL 26 | 14,710 |
| | 3 | ZAL 11 | 15.908 | | 3 | ZAL 27 | 10,320 |
| | 4 | ZAL 12 | 10.417 | | 4 | ZAL 28 | 12,449 |
| | 5 | ZAL 13 | 5.82 | | 5 | ZAL 29 | 6,493 |
| | 6 | ZAL 14 | 2.983 | | 6 | ZAL 30 | 5,248 |
| | 8 | ZAL 15 | 1.358 | | 8 | ZAL 31 | 1,897 |
| 10 | ZAL 16 | 0.847 | 10 | ZAL 32 | 0.955 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 3 | 0 | ZAL 33 | ND | 4 | 0 | ZAL 49 | ND |
| | 0.167 | ZAL 34 | 0,595 | | No se tomo | ZAL 50 | No se tomó |
| | 0.333 | ZAL 35 | 2,570 | | 0.333 | ZAL 51 | NC |
| | 0.5 | ZAL 36 | 10,199 | | 0.5 | ZAL 52 | 3,750 |
| | 0.667 | ZAL 37 | 17,398 | | 0.667 | ZAL 53 | 7,086 |
| | 0.833 | ZAL 38 | 22,491 | | 0.833 | ZAL 54 | 19,860 |
| | 1 | ZAL 39 | 24,818 | | 1 | ZAL 55 | 25,910 |
| | 1.25 | ZAL 40 | 20,004 | | 1.25 | ZAL 56 | 19,440 |
| | 1.5 | ZAL 41 | 14,220 | | 1.5 | ZAL 57 | 15,958 |
| | 2 | ZAL 42 | 9,247 | | 2 | ZAL 58 | 14,795 |
| | 3 | ZAL 43 | 8,117 | | 3 | ZAL 59 | 12,329 |
| | 4 | ZAL 44 | 4,689 | | 4 | ZAL 60 | 7,886 |
| | 5 | ZAL 45 | 2,278 | | 5 | ZAL 61 | 3,989 |
| | 6 | ZAL 46 | 2,084 | | 6 | ZAL 62 | 3,267 |
| | 8 | ZAL 47 | 0,867 | | 8 | ZAL 63 | 1,236 |
| 10 | ZAL 48 | NC | 10 | ZAL 64 | 0,462 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 5 | 0 | ZAL 65 | ND | 6 | 0 | ZAL 81 | ND |
| | 0.167 | ZAL 66 | 1,632 | | 0.167 | ZAL 82 | ND |
| | 0.333 | ZAL 67 | 12,605 | | 0.333 | ZAL 83 | 0.942 |
| | 0.5 | ZAL 68 | 14,489 | | 0.5 | ZAL 84 | 10,454 |
| | 0.667 | ZAL 69 | 16,058 | | 0.667 | ZAL 85 | 26,001 |
| | 0.833 | ZAL 70 | 18,927 | | 0.833 | ZAL 86 | 39,579 |
| | 1 | ZAL 71 | 29,085 | | 1 | ZAL 87 | 47,819 |
| | 1.25 | ZAL 72 | 18,447 | | 1.25 | ZAL 88 | 49,265 |
| | 1.5 | ZAL 73 | 15,627 | | 1.5 | ZAL 89 | 28,719 |
| | 2 | ZAL 74 | 14,753 | | 2 | ZAL 90 | 20,218 |
| | 3 | ZAL 75 | 7,669 | | 3 | ZAL 91 | 9,534 |
| | 4 | ZAL 76 | 6,245 | | 4 | ZAL 92 | 7,733 |
| | 5 | ZAL 77 | 3,460 | | 5 | ZAL 93 | 7,723 |
| | 6 | ZAL 78 | 2,284 | | 6 | ZAL 94 | 3,999 |
| 8 | ZAL 79 | 1,130 | 8 | ZAL 95 | 1,548 | | |
| 10 | ZAL 80 | 0.634 | 10 | ZAL 96 | 1,074 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 7 | 0 | ZAL 97 | ND | 8 | 0 | ZAL 113 | ND |
| | 0.167 | ZAL 98 | 8,048 | | 0.167 | ZAL 114 | NC |
| | 0.333 | ZAL 99 | 20,763 | | 0.333 | ZAL 115 | 4,215 |
| | 0.5 | ZAL 100 | 20,766 | | 0.5 | ZAL 116 | 10,922 |
| | 0.667 | ZAL 101 | 25,354 | | 0.667 | ZAL 117 | 20,423 |
| | 0.833 | ZAL 102 | 33,984 | | 0.833 | ZAL 118 | 12,904 |
| | 1 | ZAL 103 | 25,482 | | 1 | ZAL 119 | 18,334 |
| | 1.25 | ZAL 104 | 21,062 | | 1.25 | ZAL 120 | 10,352 |
| | 1.5 | ZAL 105 | 16,486 | | 1.5 | ZAL 121 | 9,508 |
| | 2 | ZAL 106 | 16,828 | | 2 | ZAL 122 | 8,245 |
| | 3 | ZAL 107 | 10,216 | | 3 | ZAL 123 | 5,735 |
| | 4 | ZAL 108 | 7,086 | | 4 | ZAL 124 | 2,289 |
| | 5 | ZAL 109 | 5,856 | | 5 | ZAL 125 | 1,226 |
| | 6 | ZAL 110 | 3,030 | | 6 | ZAL 126 | NC |
| 8 | ZAL 111 | NC | 8 | ZAL 127 | NC | | |
| 10 | ZAL 112 | NC | 10 | ZAL 128 | NC | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 9 | 0 | ZAL 129 | ND | 10 | 0 | ZAL 145 | ND |
| | 0.167 | ZAL 130 | NC | | 0.167 | ZAL 146 | 0.417 |
| | 0.333 | ZAL 131 | 2,859 | | 0.333 | ZAL 147 | 2,999 |
| | 0.5 | ZAL 132 | 25,867 | | 0.5 | ZAL 148 | 6,667 |
| | 0.667 | ZAL 133 | 31,508 | | 0.667 | ZAL 149 | 11,354 |
| | 0.833 | ZAL 134 | 37,687 | | 0.833 | ZAL 150 | 15,284 |
| | 1 | ZAL 135 | 40,009 | | 1 | ZAL 151 | 10,768 |
| | 1.25 | ZAL 136 | 26,978 | | 1.25 | ZAL 152 | 12,988 |
| | 1.5 | ZAL 137 | 22,507 | | 1.5 | ZAL 153 | 12,014 |
| | 2 | ZAL 138 | 20,295 | | 2 | ZAL 154 | 6,098 |
| | 3 | ZAL 139 | 14,575 | | 3 | ZAL 155 | 4,353 |
| | 4 | ZAL 140 | 7,985 | | 4 | ZAL 156 | 4,936 |
| | 5 | ZAL 141 | 8,015 | | 5 | ZAL 157 | 1,960 |
| | 6 | ZAL 142 | 3,436 | | 6 | ZAL 158 | 1,448 |
| 8 | ZAL 143 | 0.945 | 8 | ZAL 159 | 1,226 | | |
| 10 | ZAL 144 | NC | 10 | ZAL 160 | 0.444 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 11 | 0 | ZAL 161 | ND | 12 | 0 | ZAL 177 | ND |
| | 0.167 | ZAL 162 | NC | | 0.167 | ZAL 178 | NC |
| | 0.333 | ZAL 163 | 3,437 | | 0.333 | ZAL 179 | 3,734 |
| | 0.5 | ZAL 164 | 9,955 | | 0.5 | ZAL 180 | 8,468 |
| | 0.667 | ZAL 165 | 15,989 | | 0.667 | ZAL 181 | 11,527 |
| | 0.833 | ZAL 166 | 23,118 | | 0.833 | ZAL 182 | 15,657 |
| | 1 | ZAL 167 | 22,996 | | 1 | ZAL 183 | 14,704 |
| | 1.25 | ZAL 168 | 17,833 | | 1.25 | ZAL 184 | 11,857 |
| | 1.5 | ZAL 169 | 22,680 | | 1.5 | ZAL 185 | 13,529 |
| | 2 | ZAL 170 | 14,117 | | 2 | ZAL 186 | 13,243 |
| | 3 | ZAL 171 | 13,272 | | 3 | ZAL 187 | 7,122 |
| | 4 | ZAL 172 | 5,518 | | 4 | ZAL 188 | 6,203 |
| | 5 | ZAL 173 | 5,660 | | 5 | ZAL 189 | 4,795 |
| | 6 | ZAL 174 | 3,049 | | 6 | ZAL 190 | 2,147 |
| 8 | ZAL 175 | 1,481 | 8 | ZAL 191 | 1,097 | | |
| 10 | ZAL 176 | 1,106 | 10 | ZAL 192 | 0.362 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 13 | 0 | ZAL 193 | ND | 14 | 0 | ZAL 209 | ND |
| | 0.167 | ZAL 194 | 1,089 | | 0.167 | ZAL 210 | ND |
| | 0.333 | ZAL 195 | 16,370 | | 0.333 | ZAL 211 | NC |
| | 0.5 | ZAL 196 | 36,213 | | 0.5 | ZAL 212 | NC |
| | 0.667 | ZAL 197 | 41,048 | | 0.667 | ZAL 213 | NC |
| | 0.833 | ZAL 198 | 39,162 | | 0.833 | ZAL 214 | 0.371 |
| | 1 | ZAL 199 | 40,369 | | 1 | ZAL 215 | 0.659 |
| | 1.25 | ZAL 200 | 31,988 | | 1.25 | ZAL 216 | 0.315 |
| | 1.5 | ZAL 201 | 22,316 | | 1.5 | ZAL 217 | 0.541 |
| | 2 | ZAL 202 | 17,944 | | 2 | ZAL 218 | 2,520 |
| | 3 | ZAL 203 | 14,060 | | 3 | ZAL 219 | 11,612 |
| | 4 | ZAL 204 | 11,647 | | 4 | ZAL 220 | 21,382 |
| | 5 | ZAL 205 | 5,874 | | 5 | ZAL 221 | 6,249 |
| | 6 | ZAL 206 | 4,055 | | 6 | ZAL 222 | 3,500 |
| 8 | ZAL 207 | 1,722 | 8 | ZAL 223 | 1,309 | | |
| 10 | ZAL 208 | 0.892 | 10 | ZAL 224 | 0.705 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 15 | 0 | ZAL 225 | ND | 16 | 0 | ZAL 241 | ND |
| | 0.167 | ZAL 226 | NC | | 0.167 | ZAL 242 | ND |
| | 0.333 | ZAL 227 | 2,855 | | 0.333 | ZAL 243 | 10,284 |
| | 0.5 | ZAL 228 | 12,229 | | 0.5 | ZAL 244 | 28,089 |
| | 0.667 | ZAL 229 | 16,603 | | 0.667 | ZAL 245 | 26,901 |
| | 0.833 | ZAL 230 | 17,372 | | 0.833 | ZAL 246 | 26,939 |
| | 1 | ZAL 231 | 15,963 | | 1 | ZAL 247 | 24,876 |
| | 1.25 | ZAL 232 | 17,388 | | 1.25 | ZAL 248 | 36,050 |
| | 1.5 | ZAL 233 | 17,649 | | 1.5 | ZAL 249 | 24,827 |
| | 2 | ZAL 234 | 10,635 | | 2 | ZAL 250 | 20,686 |
| | 3 | ZAL 235 | 6,432 | | 3 | ZAL 251 | 13,678 |
| | 4 | ZAL 236 | 6,778 | | 4 | ZAL 252 | 12,319 |
| | 5 | ZAL 237 | 3,315 | | 5 | ZAL 253 | 5,407 |
| | 6 | ZAL 238 | 2,474 | | 6 | ZAL 254 | 6,633 |
| 8 | ZAL 239 | 2,427 | 8 | ZAL 255 | 1,936 | | |
| 10 | ZAL 240 | 1,137 | 10 | ZAL 256 | 1,141 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 17 | 0 | ZAL 257 | ND | 18 | 0 | ZAL 273 | ND |
| | 0.167 | ZAL 258 | NC | | 0.167 | ZAL 274 | NC |
| | 0.333 | ZAL 259 | 0.525 | | 0.333 | ZAL 275 | 0.498 |
| | 0.5 | ZAL 260 | 4,277 | | 0.5 | ZAL 276 | 3,445 |
| | 0.667 | ZAL 261 | 15,725 | | 0.667 | ZAL 277 | 7,898 |
| | 0.833 | ZAL 262 | 23,668 | | 0.833 | ZAL 278 | 14,401 |
| | 1 | ZAL 263 | 30,431 | | 1 | ZAL 279 | 12,182 |
| | 1.25 | ZAL 264 | 34,062 | | 1.25 | ZAL 280 | 12,577 |
| | 1.5 | ZAL 265 | 21,844 | | 1.5 | ZAL 281 | 10,743 |
| | 2 | ZAL 266 | 17,471 | | 2 | ZAL 282 | 9,129 |
| | 3 | ZAL 267 | 13,834 | | 3 | ZAL 283 | 8,393 |
| | 4 | ZAL 268 | 11,525 | | 4 | ZAL 284 | 10,314 |
| | 5 | ZAL 269 | 5,825 | | 5 | ZAL 285 | 7,247 |
| | 6 | ZAL 270 | 3,950 | | 6 | ZAL 286 | 1,351 |
| 8 | ZAL 271 | 2,495 | 8 | ZAL 287 | 0.686 | | |
| 10 | ZAL 272 | 1,345 | 10 | ZAL 288 | 0.384 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 19 | 0 | ZAL 289 | ND | 20 | 0 | ZAL 305 | ND |
| | 0.167 | ZAL 290 | ND | | 0.167 | ZAL 306 | ND |
| | 0.333 | ZAL 291 | ND | | 0.333 | ZAL 307 | NC |
| | 0.5 | ZAL 292 | NC | | 0.5 | ZAL 308 | NC |
| | 0.667 | ZAL 293 | 0.755 | | 0.667 | ZAL 309 | 0.390 |
| | 0.833 | ZAL 294 | 1,836 | | 0.833 | ZAL 310 | 3,134 |
| | 1 | ZAL 295 | 2,016 | | 1 | ZAL 311 | 4,604 |
| | 1.25 | ZAL 296 | 2,789 | | 1.25 | ZAL 312 | 8,381 |
| | 1.5 | ZAL 297 | 1,892 | | 1.5 | ZAL 313 | 5,595 |
| | 2 | ZAL 298 | 7,680 | | 2 | ZAL 314 | 5,208 |
| | 3 | ZAL 299 | 3,060 | | 3 | ZAL 315 | 4,238 |
| | 4 | ZAL 300 | 2,654 | | 4 | ZAL 316 | 2,591 |
| | 5 | ZAL 301 | 1,370 | | 5 | ZAL 317 | 1,346 |
| | 6 | ZAL 302 | 0.928 | | 6 | ZAL 318 | 0.598 |
| 8 | ZAL 303 | 0.382 | 8 | ZAL 319 | NC | | |
| 10 | ZAL 304 | NC | 10 | ZAL 320 | NC | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 21 | 0 | ZAL 321 | ND | 22 | 0 | ZAL 337 | ND |
| | 0.167 | ZAL 322 | NC | | 0.167 | ZAL 338 | 0.717 |
| | 0.333 | ZAL 323 | 1,795 | | 0.333 | ZAL 339 | 7,981 |
| | 0.5 | ZAL 324 | 9,854 | | 0.5 | ZAL 340 | 10,545 |
| | 0.667 | ZAL 325 | 10,241 | | 0.667 | ZAL 341 | 30,516 |
| | 0.833 | ZAL 326 | 13,547 | | 0.833 | ZAL 342 | 31,190 |
| | 1 | ZAL 327 | 12,489 | | 1 | ZAL 343 | 25,966 |
| | 1.25 | ZAL 328 | 12,635 | | 1.25 | ZAL 344 | 32,840 |
| | 1.5 | ZAL 329 | 16,149 | | 1.5 | ZAL 345 | 17,414 |
| | 2 | ZAL 330 | 10,921 | | 2 | ZAL 346 | 11,295 |
| | 3 | ZAL 331 | 7,774 | | 3 | ZAL 347 | 11,841 |
| | 4 | ZAL 332 | 4,369 | | 4 | ZAL 348 | 7,359 |
| | 5 | ZAL 333 | 2,782 | | 5 | ZAL 349 | 5,548 |
| | 6 | ZAL 334 | 2,457 | | 6 | ZAL 350 | 2,796 |
| 8 | ZAL 335 | 1,016 | 8 | ZAL 351 | 1,271 | | |
| 10 | ZAL 336 | 0.804 | 10 | ZAL 352 | NC | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 23 | 0 | ZAL 353 | ND | 24 | 0 | ZAL 369 | ND |
| | 0.167 | ZAL 354 | 1,266 | | 0.167 | ZAL 370 | ND |
| | 0.333 | ZAL 355 | 6,346 | | 0.333 | ZAL 371 | 1,012 |
| | 0.5 | ZAL 356 | 20,158 | | 0.5 | ZAL 372 | 13,168 |
| | 0.667 | ZAL 357 | 22,012 | | 0.667 | ZAL 373 | 10,860 |
| | 0.833 | ZAL 358 | 11,980 | | 0.833 | ZAL 374 | 20,970 |
| | 1 | ZAL 359 | 15,253 | | 1 | ZAL 375 | 10,848 |
| | 1.25 | ZAL 360 | 11,491 | | 1.25 | ZAL 376 | 9,979 |
| | 1.5 | ZAL 361 | 11,132 | | 1.5 | ZAL 377 | 11,404 |
| | 2 | ZAL 362 | 7,821 | | 2 | ZAL 378 | 8,029 |
| | 3 | ZAL 363 | 6,910 | | 3 | ZAL 379 | 3,982 |
| | 4 | ZAL 364 | 3,770 | | 4 | ZAL 380 | 8,552 |
| | 5 | ZAL 365 | 4,582 | | 5 | ZAL 381 | 4,673 |
| | 6 | ZAL 366 | 1,724 | | 6 | ZAL 382 | 3,043 |
| 8 | ZAL 367 | 0.996 | 8 | ZAL 383 | 1,128 | | |
| 10 | ZAL 368 | 0.606 | 10 | ZAL 384 | 0.725 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 25 | 0 | ZAL 385 | ND | 26 | 0 | ZAL 401 | ND |
| | 0.167 | ZAL 386 | NC | | 0.167 | ZAL 402 | 1,374 |
| | 0.333 | ZAL 387 | 0.458 | | 0.333 | ZAL 403 | 6,211 |
| | 0.5 | ZAL 388 | 2,248 | | 0.5 | ZAL 404 | 10,275 |
| | 0.667 | ZAL 389 | 3,700 | | 0.667 | ZAL 405 | 15,951 |
| | 0.833 | ZAL 390 | 3,833 | | 0.833 | ZAL 406 | 12,747 |
| | 1 | ZAL 391 | 14,501 | | 1 | ZAL 407 | 10,745 |
| | 1.25 | ZAL 392 | 22,908 | | 1.25 | ZAL 408 | 8,557 |
| | 1.5 | ZAL 393 | 23,042 | | 1.5 | ZAL 409 | 10,231 |
| | 2 | ZAL 394 | 11,943 | | 2 | ZAL 410 | 9,906 |
| | 3 | ZAL 395 | 12,627 | | 3 | ZAL 411 | 4,817 |
| | 4 | ZAL 396 | 11,534 | | 4 | ZAL 412 | 3,098 |
| | 5 | ZAL 397 | 7,180 | | 5 | ZAL 413 | 0.897 |
| | 6 | ZAL 398 | 4,081 | | 6 | ZAL 414 | 0.626 |
| 8 | ZAL 399 | 1,254 | 8 | ZAL 415 | NC | | |
| 10 | ZAL 400 | 0.718 | 10 | ZAL 416 | NC | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 27 | 0 | ZAL 417 | ND | 28 | 0 | ZAL 433 | ND |
| | 0.167 | ZAL 418 | 0.379 | | 0.167 | ZAL 434 | NC |
| | 0.333 | ZAL 419 | 6,818 | | 0.333 | ZAL 435 | 4,246 |
| | 0.5 | ZAL 420 | 15,059 | | 0.5 | ZAL 436 | 7,877 |
| | 0.667 | ZAL 421 | 18,272 | | 0.667 | ZAL 437 | 11,914 |
| | 0.833 | ZAL 422 | 22,469 | | 0.833 | ZAL 438 | 13,679 |
| | 1 | ZAL 423 | 14,376 | | 1 | ZAL 439 | 15,394 |
| | 1.25 | ZAL 424 | 14,395 | | 1.25 | ZAL 440 | 16,590 |
| | 1.5 | ZAL 425 | 16,530 | | 1.5 | ZAL 441 | 14,266 |
| | 2 | ZAL 426 | 14,369 | | 2 | ZAL 442 | 7,715 |
| | 3 | ZAL 427 | 6,607 | | 3 | ZAL 443 | 5,374 |
| | 4 | ZAL 428 | 5,341 | | 4 | ZAL 444 | 3,151 |
| | 5 | ZAL 429 | 2,691 | | 5 | ZAL 445 | 1,669 |
| | 6 | ZAL 430 | 2,199 | | 6 | ZAL 446 | 1,096 |
| | 8 | ZAL 431 | 0.723 | | 8 | ZAL 447 | 0.476 |
| 10 | ZAL 432 | NC | 10 | ZAL 448 | NC | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 29 | 0 | ZAL 449 | ND | 30 | 0 | ZAL 465 | ND |
| | 0.167 | ZAL 450 | ND | | 0.167 | ZAL 466 | ND |
| | 0.333 | ZAL 451 | 2,555 | | 0.333 | ZAL 467 | 1,133 |
| | 0.5 | ZAL 452 | 7,393 | | 0.5 | ZAL 468 | 3,441 |
| | 0.667 | ZAL 453 | 9,222 | | 0.667 | ZAL 469 | 5,638 |
| | 0.833 | ZAL 454 | 11,505 | | 0.833 | ZAL 470 | 11,187 |
| | 1 | ZAL 455 | 9,252 | | 1 | ZAL 471 | 6,159 |
| | 1.25 | ZAL 456 | 8,245 | | 1.25 | ZAL 472 | 7,809 |
| | 1.5 | ZAL 457 | 5,693 | | 1.5 | ZAL 473 | 6,982 |
| | 2 | ZAL 458 | 5,108 | | 2 | ZAL 474 | 7,308 |
| | 3 | ZAL 459 | 5,292 | | 3 | ZAL 475 | 5,222 |
| | 4 | ZAL 460 | 2,728 | | 4 | ZAL 476 | 2,922 |
| | 5 | ZAL 461 | 1,775 | | 5 | ZAL 477 | 2,832 |
| | 6 | ZAL 462 | 1,136 | | 6 | ZAL 478 | 1,472 |
| 8 | ZAL 463 | 0.407 | 8 | ZAL 479 | 0.829 | | |
| 10 | ZAL 464 | NC | 10 | ZAL 480 | 0.526 | | |

| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 31 | 0 | ZAL 481 | ND | 32 | 0 | ZAL 497 | ND |
| | 0.167 | ZAL 482 | NC | | 0.167 | ZAL 498 | NC |
| | 0.333 | ZAL 483 | 2,793 | | 0.333 | ZAL 499 | 2,618 |
| | 0.5 | ZAL 484 | 13,361 | | 0.5 | ZAL 500 | 7,428 |
| | 0.667 | ZAL 485 | 20,489 | | 0.667 | ZAL 501 | 11,152 |
| | 0.833 | ZAL 486 | 20,217 | | 0.833 | ZAL 502 | 19,458 |
| | 1 | ZAL 487 | 18,131 | | 1 | ZAL 503 | 17,193 |
| | 1.25 | ZAL 488 | 16,753 | | 1.25 | ZAL 504 | 16,348 |
| | 1.5 | ZAL 489 | 11,393 | | 1.5 | ZAL 505 | 11,294 |
| | 2 | ZAL 490 | 11,376 | | 2 | ZAL 506 | 11,882 |
| | 3 | ZAL 491 | 8,886 | | 3 | ZAL 507 | 7,661 |
| | 4 | ZAL 492 | 6,105 | | 4 | ZAL 508 | 7,830 |
| | 5 | ZAL 493 | 4,620 | | 5 | ZAL 509 | 5,405 |
| | 6 | ZAL 494 | 4,015 | | 6 | ZAL 510 | 4,214 |
| 8 | ZAL 495 | 1,884 | 8 | ZAL 511 | 2,651 | | |
| 10 | ZAL 496 | 1,475 | 10 | ZAL 512 | 2,203 | | |

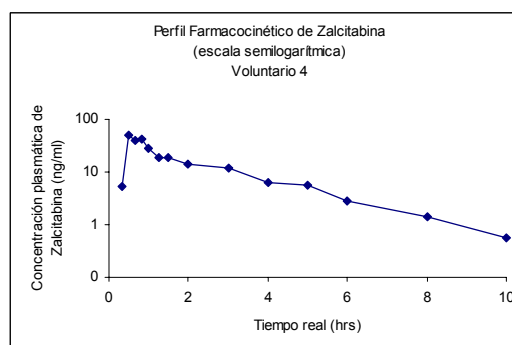
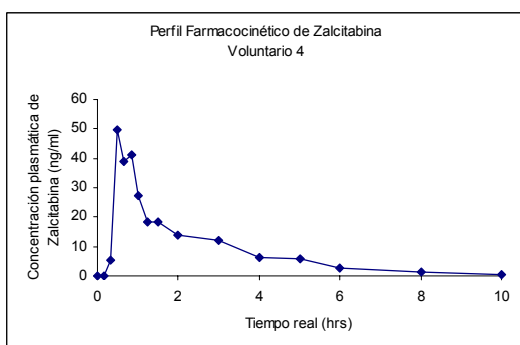
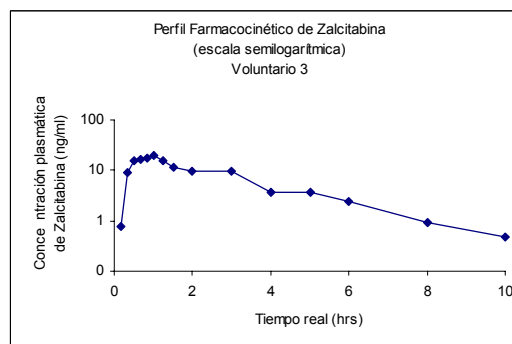
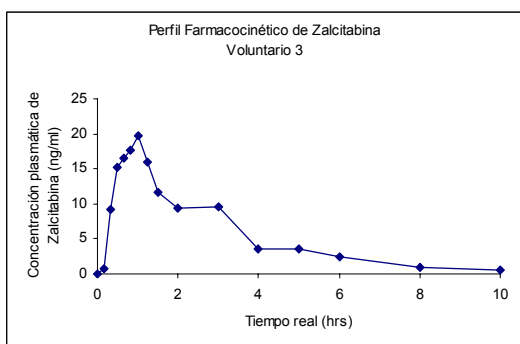
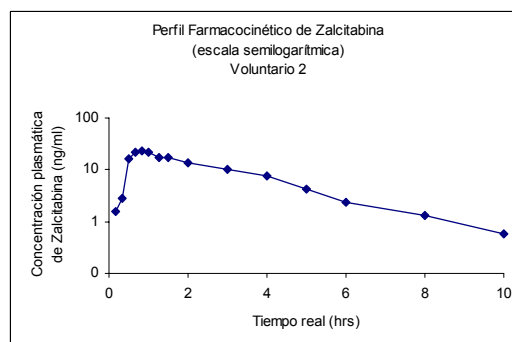
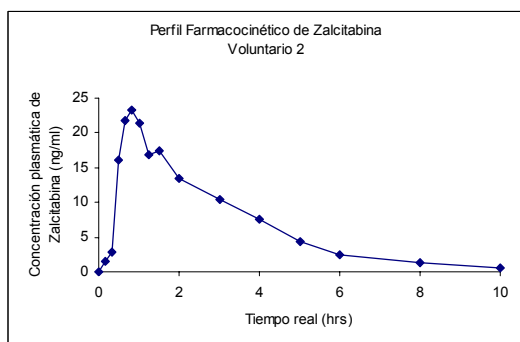
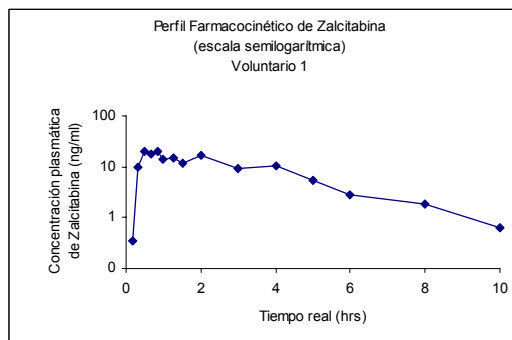
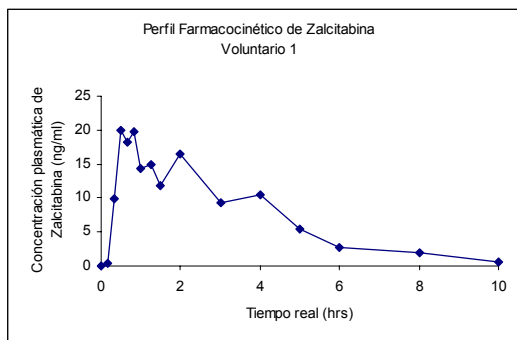
| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 33 | 0 | ZAL 513 | ND | 34 | 0 | ZAL 529 | ND |
| | 0.167 | ZAL 514 | 1,104 | | 0.167 | ZAL 530 | NC |
| | 0.333 | ZAL 515 | 0.857 | | 0.333 | ZAL 531 | NC |
| | 0.5 | ZAL 516 | 5,495 | | 0.5 | ZAL 532 | NC |
| | 0.667 | ZAL 517 | 8,957 | | 0.667 | ZAL 533 | 0.880 |
| | 0.833 | ZAL 518 | 11,191 | | 0.833 | ZAL 534 | 1,941 |
| | 1 | ZAL 519 | 11,641 | | 1 | ZAL 535 | 2,508 |
| | 1.25 | ZAL 520 | 11,582 | | 1.25 | ZAL 536 | 4,745 |
| | 1.5 | ZAL 521 | 13,739 | | 1.5 | ZAL 537 | 5,548 |
| | 2 | ZAL 522 | 13,301 | | 2 | ZAL 538 | 5,658 |
| | 3 | ZAL 523 | 5,694 | | 3 | ZAL 539 | 13,919 |
| | 4 | ZAL 524 | 3,768 | | 4 | ZAL 540 | 11,253 |
| | 5 | ZAL 525 | 2,233 | | 5 | ZAL 541 | 5,950 |
| | 6 | ZAL 526 | 1,742 | | 6 | ZAL 542 | 3,341 |
| 8 | ZAL 527 | 0.821 | 8 | ZAL 543 | 1,927 | | |
| 10 | ZAL 528 | 0.485 | 10 | ZAL 544 | 0.705 | | |

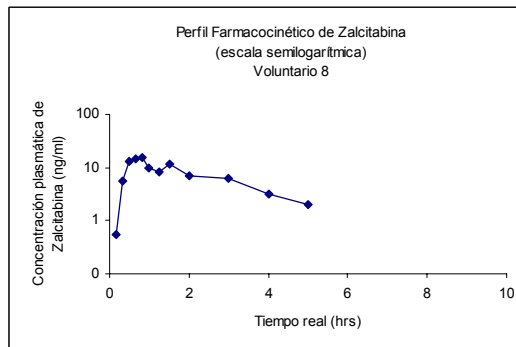
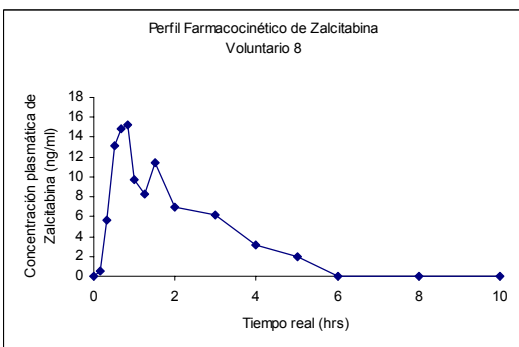
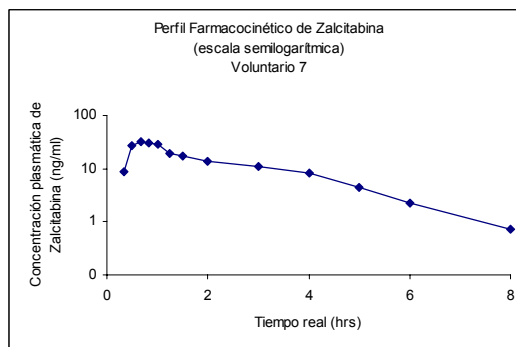
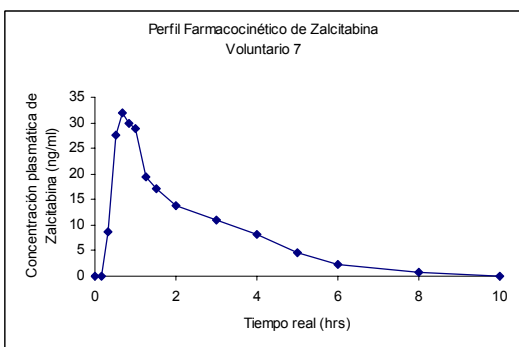
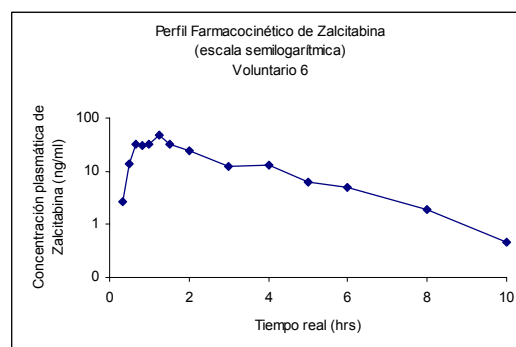
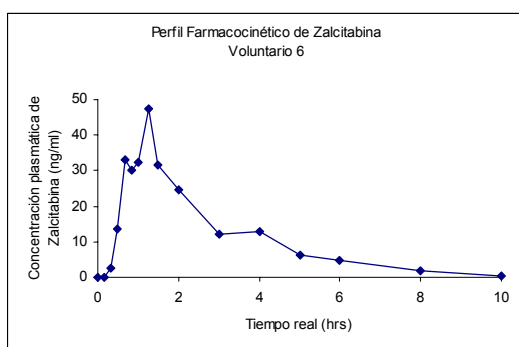
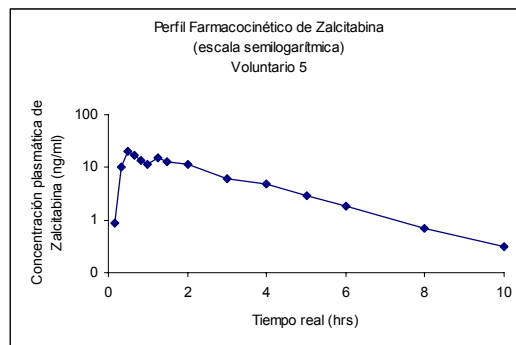
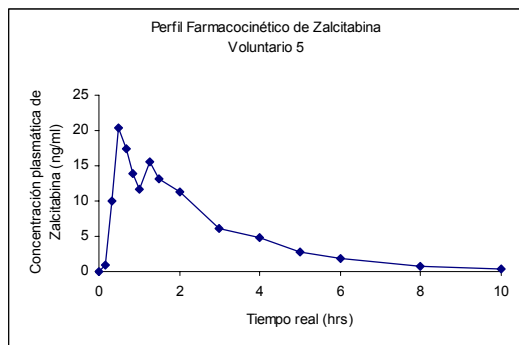
| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 35 | 0 | ZAL 545 | ND | 36 | 0 | ZAL 561 | ND |
| | 0.167 | ZAL 546 | NC | | 0.167 | ZAL 562 | NC |
| | 0.333 | ZAL 547 | 3,627 | | 0.333 | ZAL 563 | 14,226 |
| | 0.5 | ZAL 548 | 19,347 | | 0.5 | ZAL 564 | 16,348 |
| | 0.667 | ZAL 549 | 23,463 | | 0.667 | ZAL 565 | 15,048 |
| | 0.833 | ZAL 550 | 16,559 | | 0.833 | ZAL 566 | 11,924 |
| | 1 | ZAL 551 | 15,969 | | 1 | ZAL 567 | 13,410 |
| | 1.25 | ZAL 552 | 13,145 | | 1.25 | ZAL 568 | 16,549 |
| | 1.5 | ZAL 553 | 10,385 | | 1.5 | ZAL 569 | 19,389 |
| | 2 | ZAL 554 | 12,132 | | 2 | ZAL 570 | 25,088 |
| | 3 | ZAL 555 | 6,568 | | 3 | ZAL 571 | 15,063 |
| | 4 | ZAL 556 | 5,668 | | 4 | ZAL 572 | 11,011 |
| | 5 | ZAL 557 | 4,786 | | 5 | ZAL 573 | 6,522 |
| | 6 | ZAL 558 | 3,567 | | 6 | ZAL 574 | 3,962 |
| 8 | ZAL 559 | 1,744 | 8 | ZAL 575 | 1,967 | | |
| 10 | ZAL 560 | 0.827 | 10 | ZAL 576 | 0.839 | | |

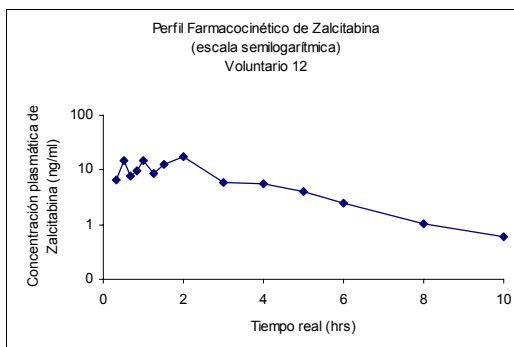
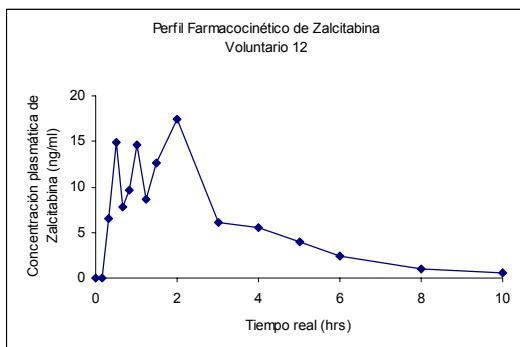
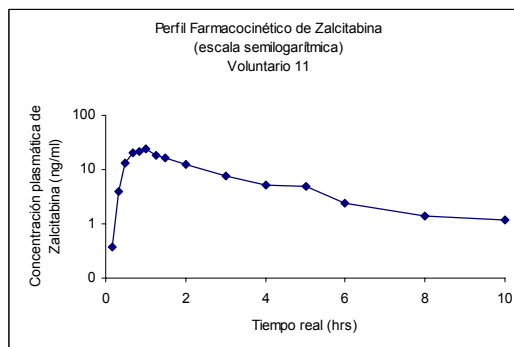
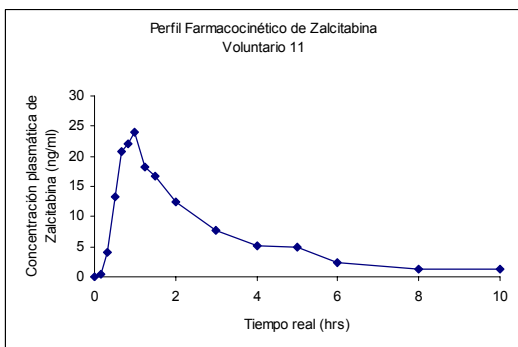
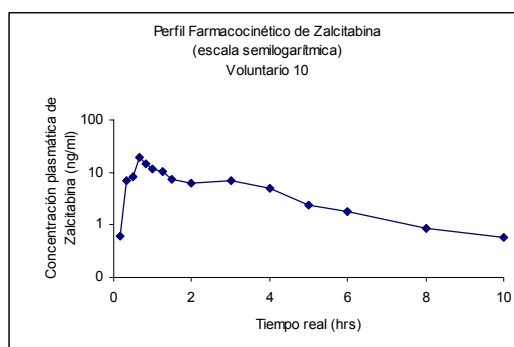
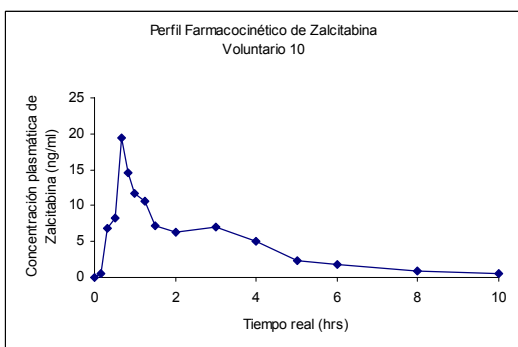
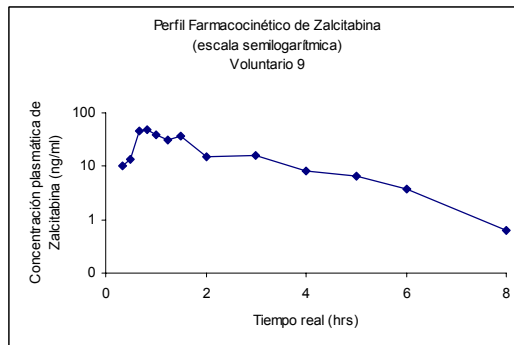
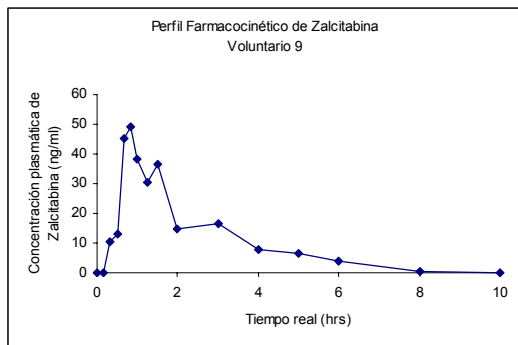
| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 37 | 0 | ZAL 577 | ND | 38 | 0 | ZAL 593 | ND |
| | 0.167 | ZAL 578 | 6,466 | | 0.167 | ZAL 594 | ND |
| | 0.333 | ZAL 579 | 16,453 | | 0.333 | ZAL 595 | 1,696 |
| | 0.5 | ZAL 580 | 26,181 | | 0.5 | ZAL 596 | 10,476 |
| | 0.667 | ZAL 581 | 31,999 | | 0.667 | ZAL 597 | 19,802 |
| | 0.833 | ZAL 582 | 28,080 | | 0.833 | ZAL 598 | 25,165 |
| | 1 | ZAL 583 | 29,167 | | 1 | ZAL 599 | 28,210 |
| | 1.25 | ZAL 584 | 27,376 | | 1.25 | ZAL 600 | 23,406 |
| | 1.5 | ZAL 585 | 23,461 | | 1.5 | ZAL 601 | 23,096 |
| | 2 | ZAL 586 | 16,356 | | 2 | ZAL 602 | 13,357 |
| | 3 | ZAL 587 | 9,072 | | 3 | ZAL 603 | 8,676 |
| | 4 | ZAL 588 | 5,017 | | 4 | ZAL 604 | 6,333 |
| | 5 | ZAL 589 | 3,547 | | 5 | ZAL 605 | 4,271 |
| | 6 | ZAL 590 | 2,378 | | 6 | ZAL 606 | 3,148 |
| 8 | ZAL 591 | 1,250 | 8 | ZAL 607 | 1,602 | | |
| 10 | ZAL 592 | 0.778 | 10 | ZAL 608 | 0.865 | | |

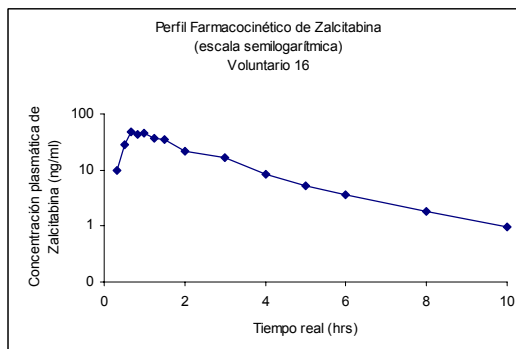
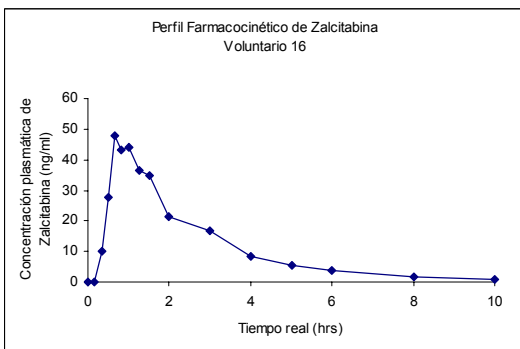
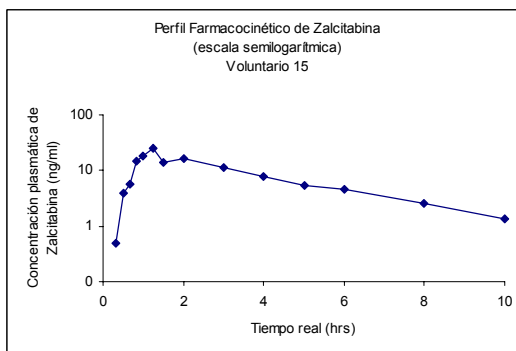
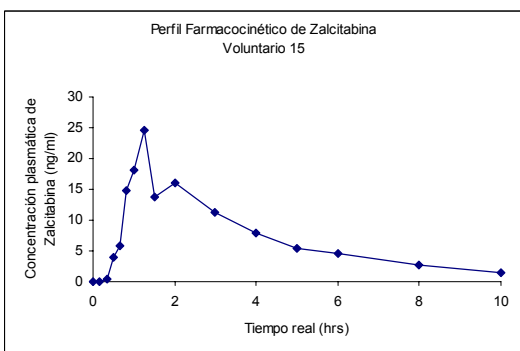
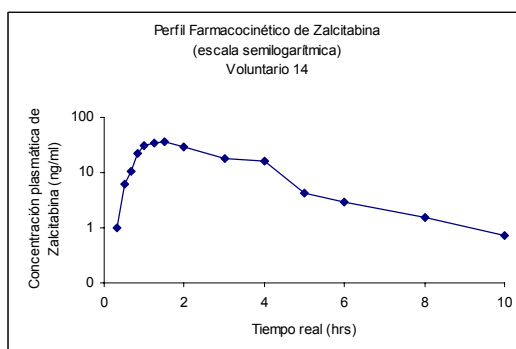
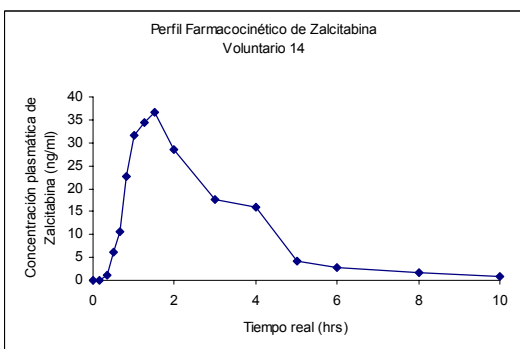
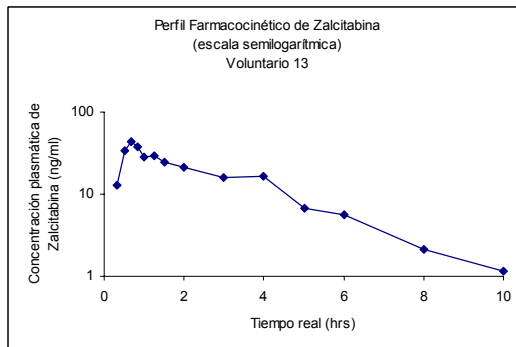
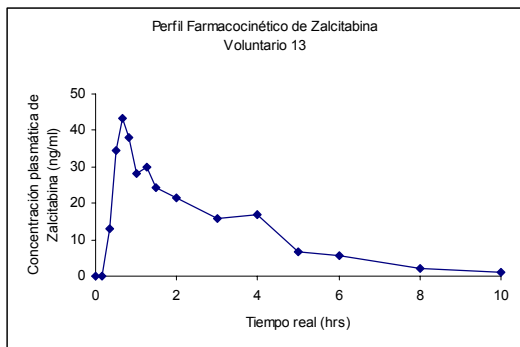
| Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) | Voluntario | Tiempo real (h) | Código de identificación | Concentración Zalcitabina (ng/ml) |
|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| 39 | 0 | ZAL 609 | ND | 40 | 0 | ZAL 625 | ND |
| | 0.167 | ZAL 610 | ND | | 0.167 | ZAL 626 | ND |
| | 0.333 | ZAL 611 | 0.809 | | 0.333 | ZAL 627 | 3,559 |
| | 0.5 | ZAL 612 | 4,015 | | 0.5 | ZAL 628 | 24,244 |
| | 0.667 | ZAL 613 | 7,550 | | 0.667 | ZAL 629 | 21,103 |
| | 0.833 | ZAL 614 | 24,525 | | 0.833 | ZAL 630 | 20,539 |
| | 1 | ZAL 615 | 14,181 | | 1 | ZAL 631 | 20,939 |
| | 1.25 | ZAL 616 | 16,739 | | 1.25 | ZAL 632 | 26,063 |
| | 1.5 | ZAL 617 | 14,593 | | 1.5 | ZAL 633 | 21,237 |
| | 2 | ZAL 618 | 15,273 | | 2 | ZAL 634 | 17,061 |
| | 3 | ZAL 619 | 10,542 | | 3 | ZAL 635 | 10,147 |
| | 4 | ZAL 620 | 7,475 | | 4 | ZAL 636 | 8,992 |
| | 5 | ZAL 621 | 6,848 | | 5 | ZAL 637 | 4,328 |
| | 6 | ZAL 622 | 3,770 | | 6 | ZAL 638 | 3,454 |
| 8 | ZAL 623 | 2,052 | 8 | ZAL 639 | 2,416 | | |
| 10 | ZAL 624 | 1,171 | 10 | ZAL 640 | 1,005 | | |

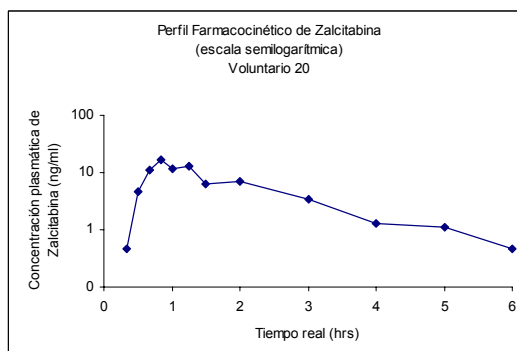
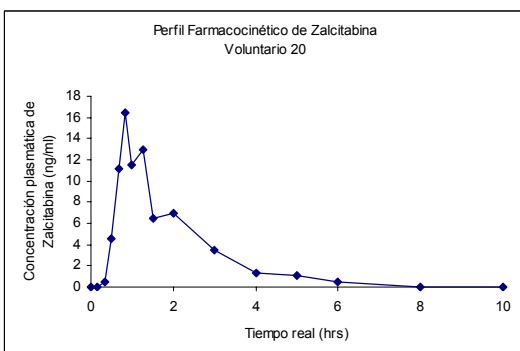
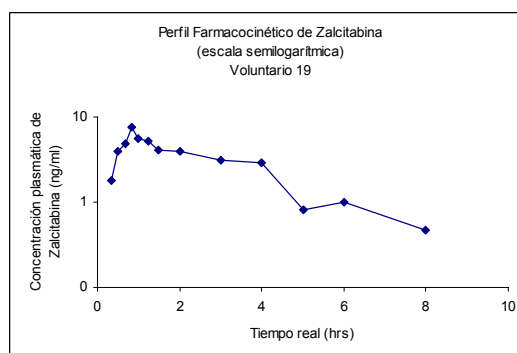
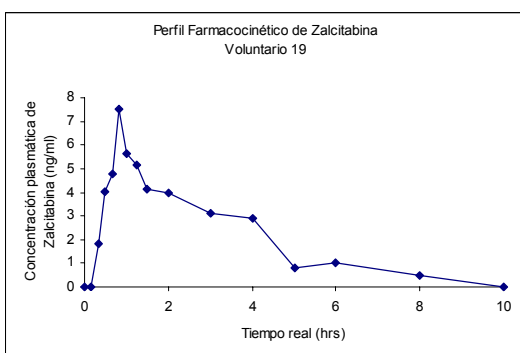
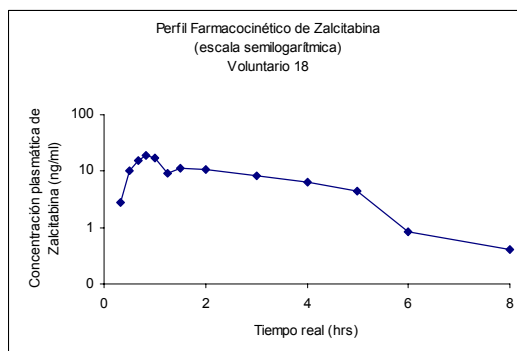
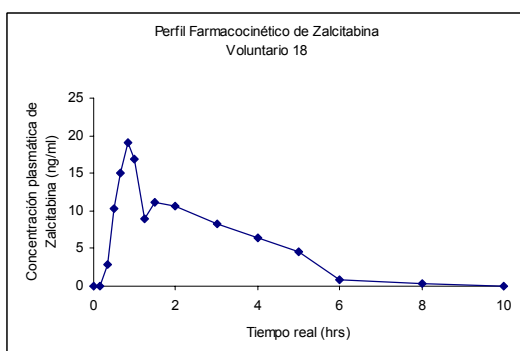
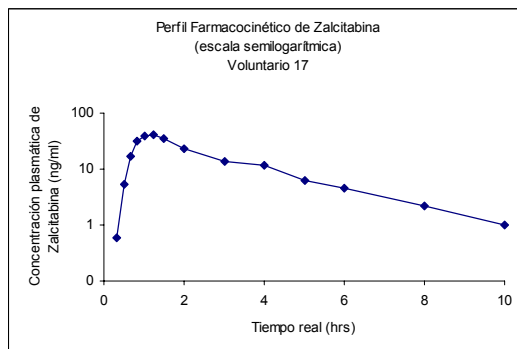
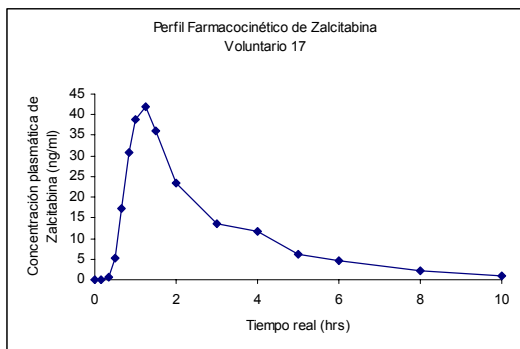
ANEXO IV. GRÁFICAS DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA EN ESCALA NORMAL Y SEMILOGARÍTMICA CON RESPECTO AL TIEMPO PARA CADA VOLUNTARIO.

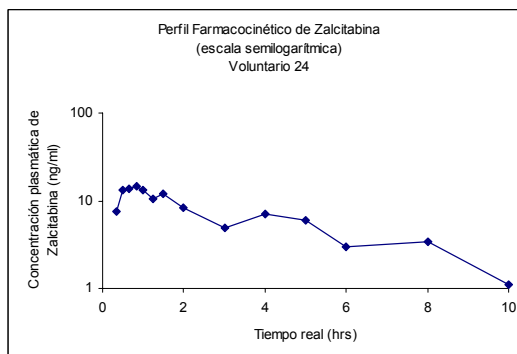
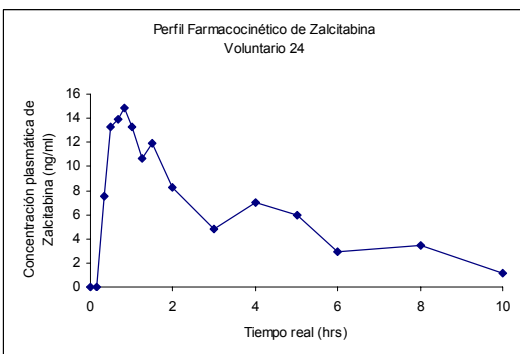
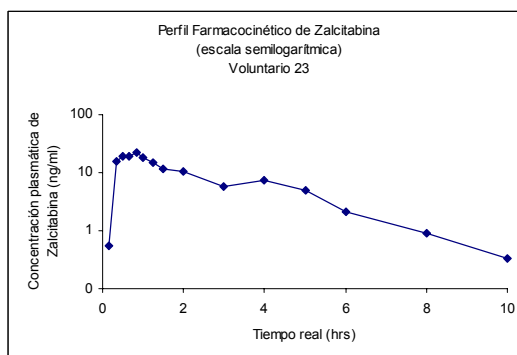
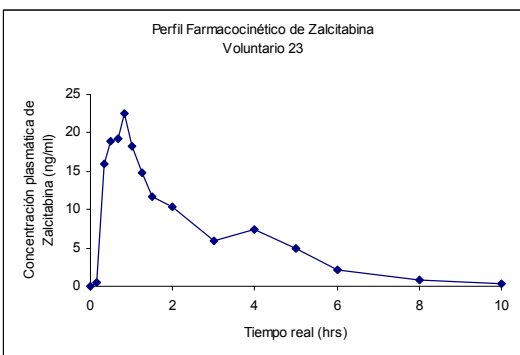
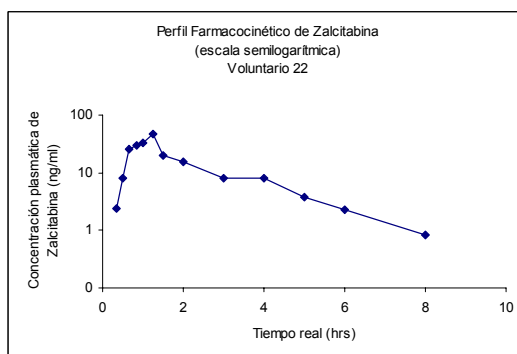
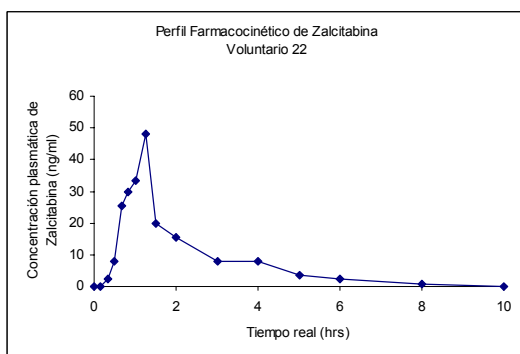
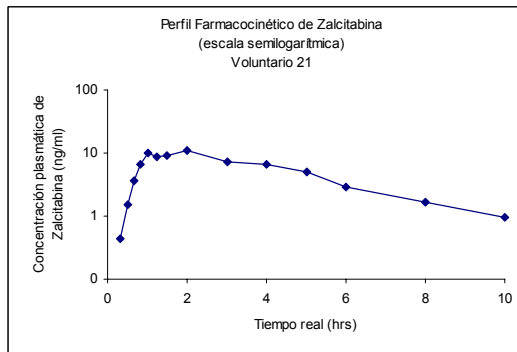
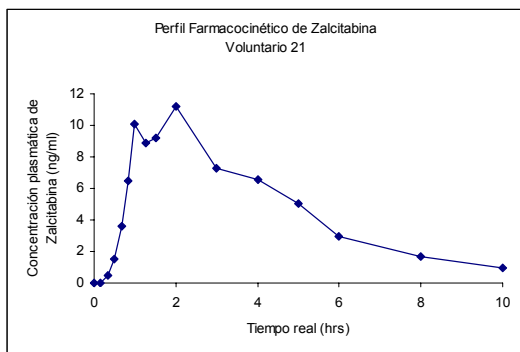


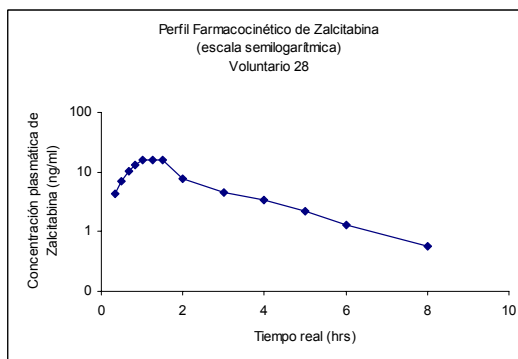
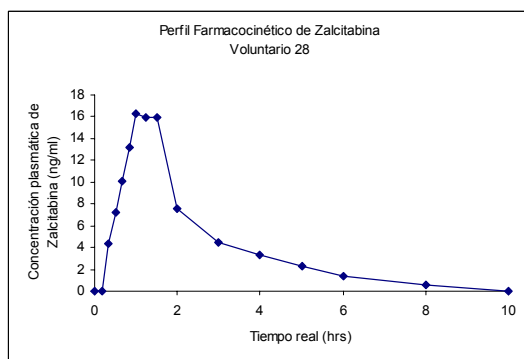
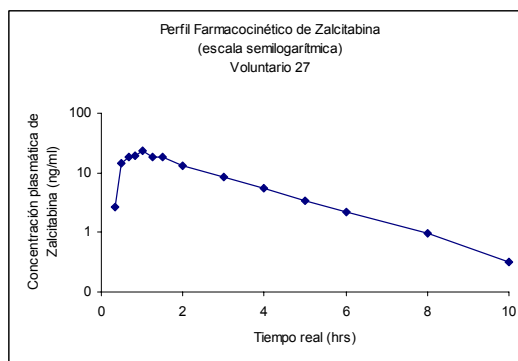
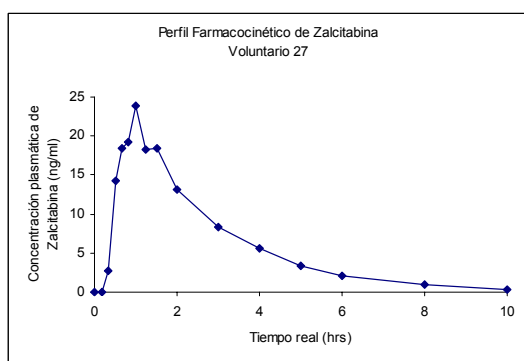
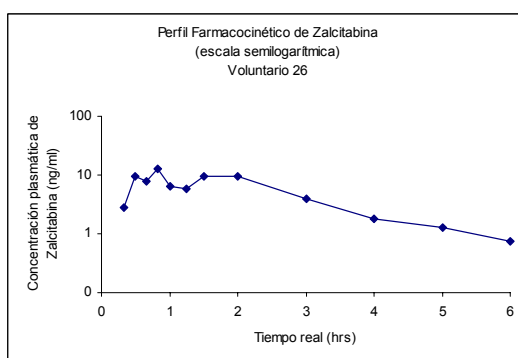
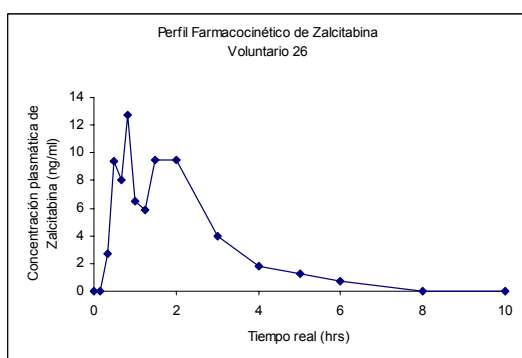
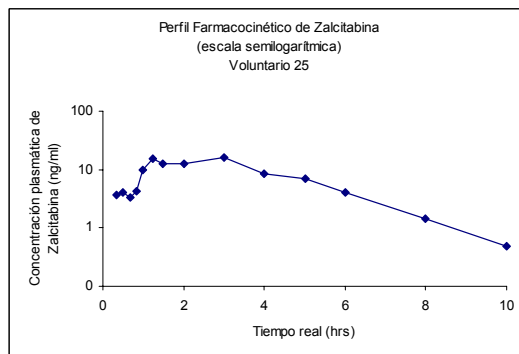
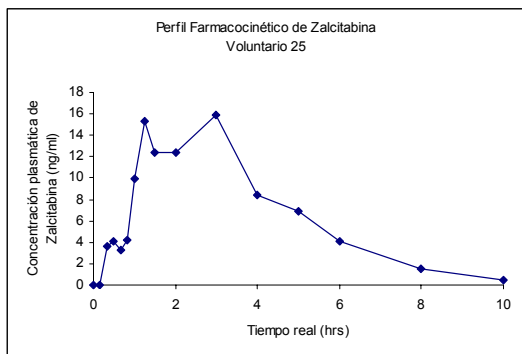


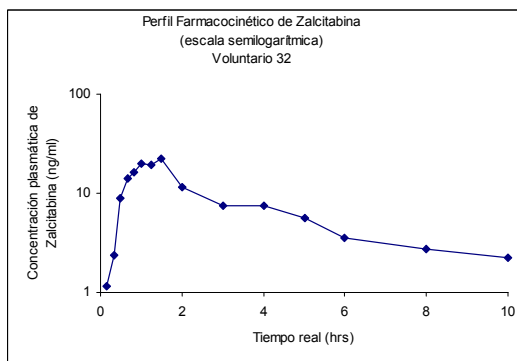
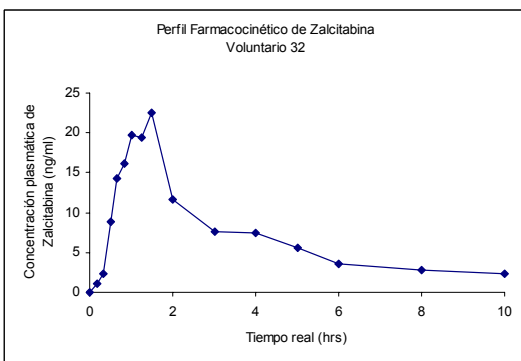
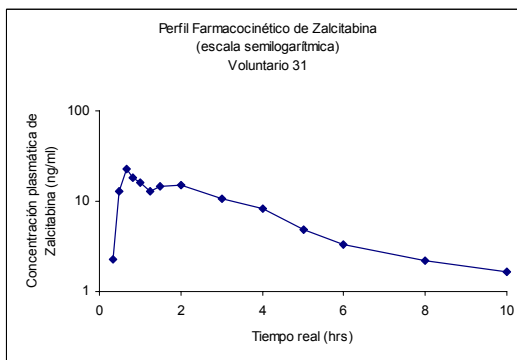
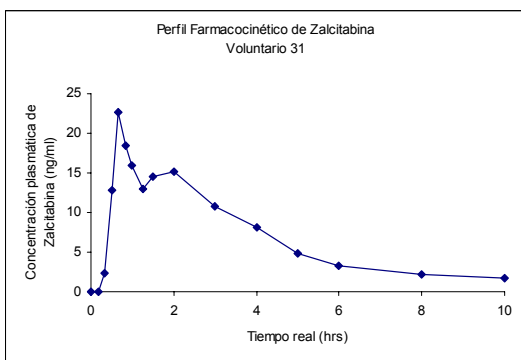
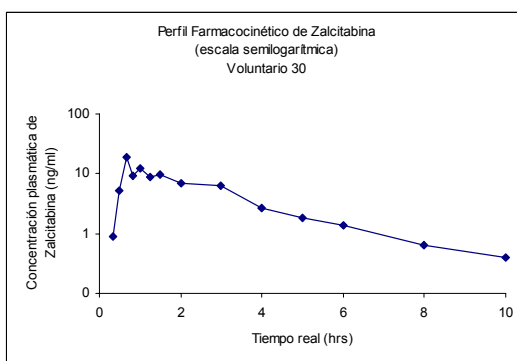
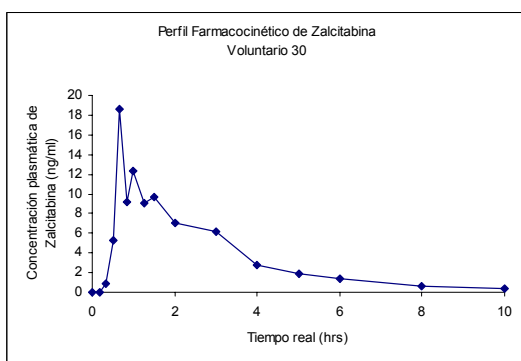
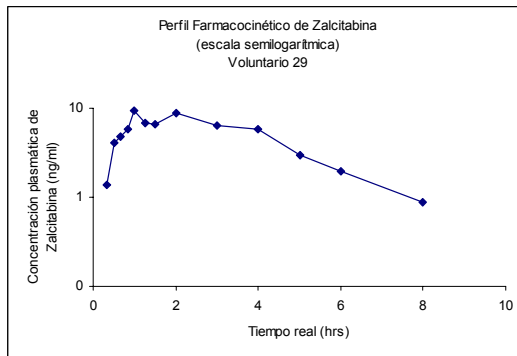
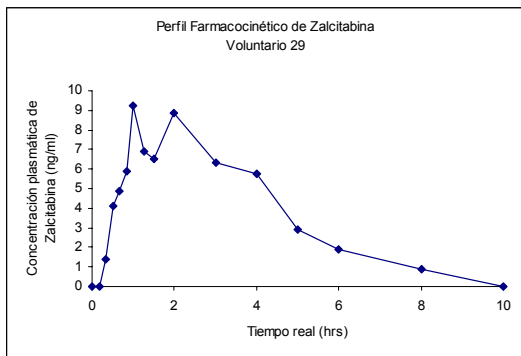


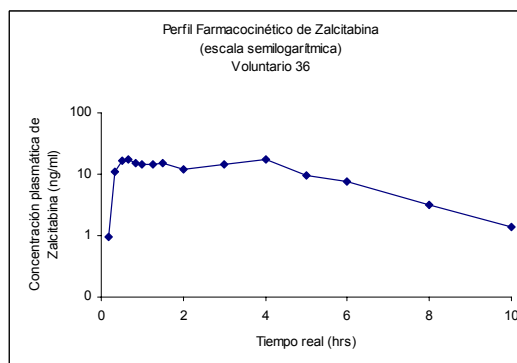
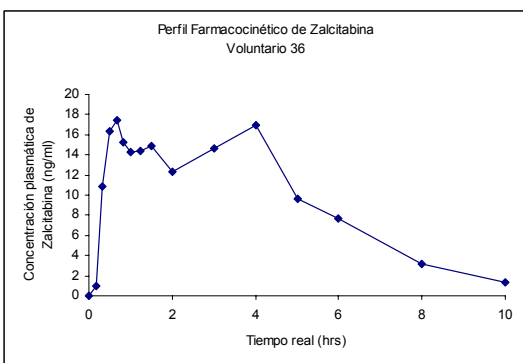
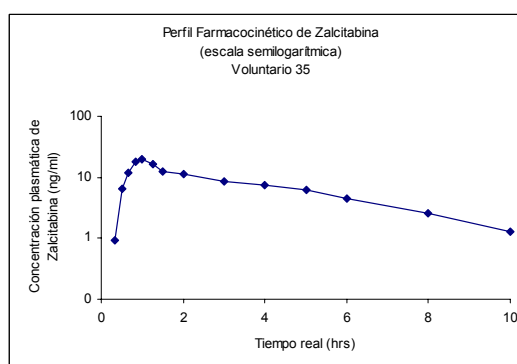
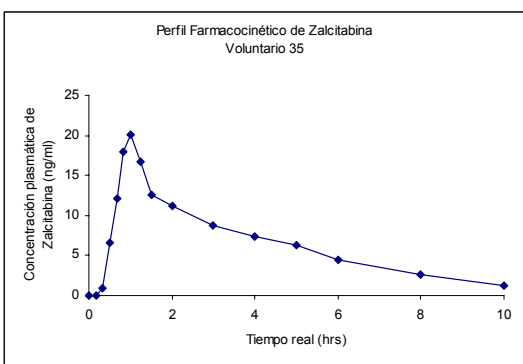
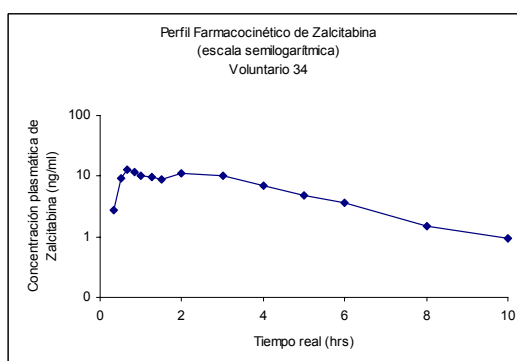
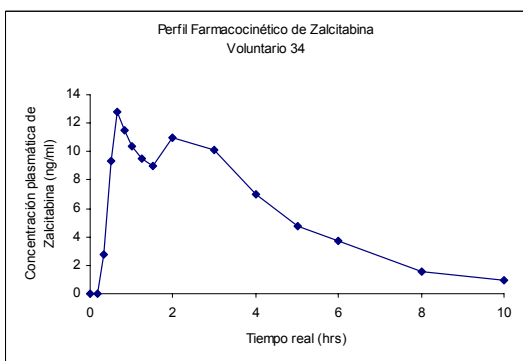
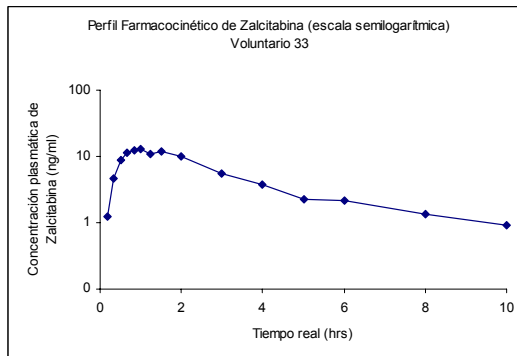
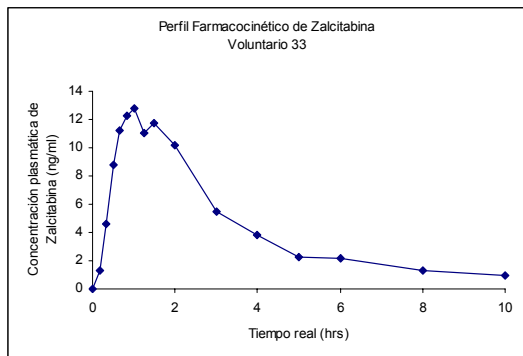


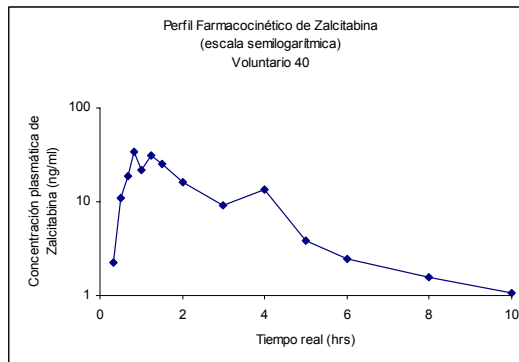
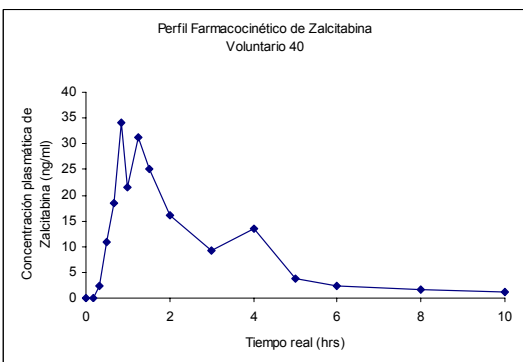
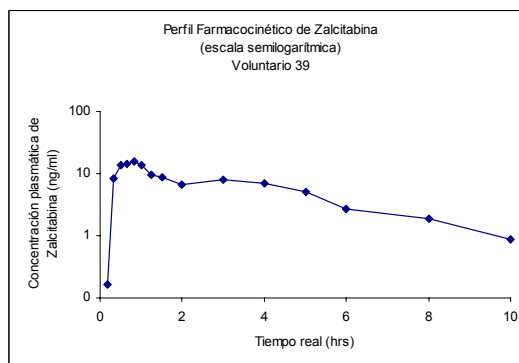
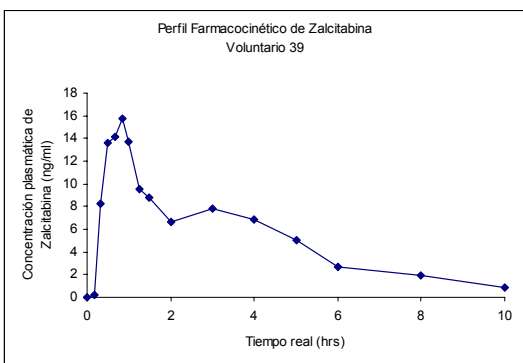
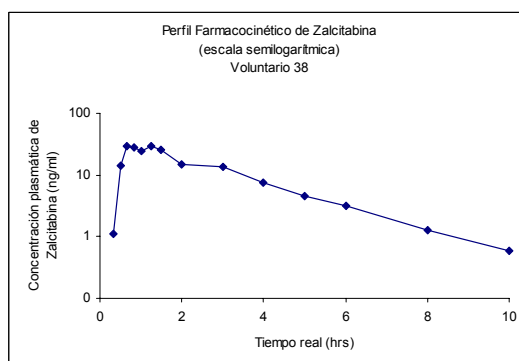
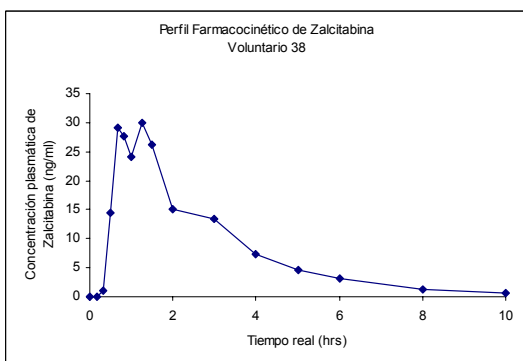
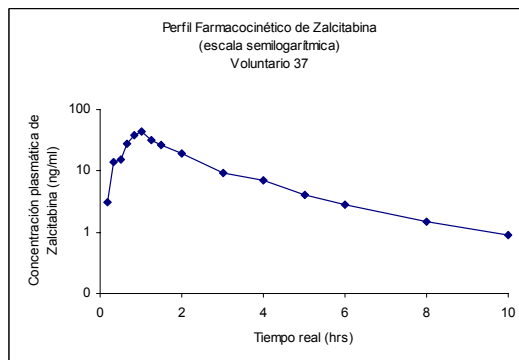
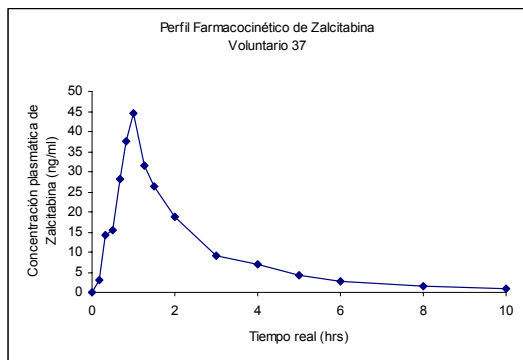












ANEXO V. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE ZALCITABINA OBTENIDOS PARA CADA VOLUNTARIO.

| Voluntario | Corr. | No. para Ke | Ke (1/h) | Tiempo inicial para Ke (h) | Tiempo final para Ke (h) | Vida media de Ke (h) | Tlag (h) | Tmax (h) | Cmax (ng/mL) | ABC 0-t (h*ng/mL) | ABC 0-inf (h*ng/mL) |
|------------|--------|-------------|----------|----------------------------|--------------------------|----------------------|----------|----------|--------------|-------------------|---------------------|
| 1 | 0.9736 | 6 | 0.44 | 3 | 10 | 1.59 | 0 | 1 | 17.26 | 66.7 | 68.65 |
| 2 | 0.9891 | 5 | 0.42 | 4 | 10 | 1.64 | 0.17 | 0.67 | 22.14 | 77.76 | 80.02 |
| 3 | 0.9784 | 7 | 0.43 | 1.5 | 8 | 1.63 | 0 | 1 | 24.82 | 50.39 | 52.43 |
| 4 | 1 | 3 | 0.49 | 6 | 10 | 1.42 | 0.33 | 1 | 25.91 | 64.49 | 65.44 |
| 5 | 0.9968 | 3 | 0.32 | 6 | 10 | 2.16 | 0 | 1 | 29.09 | 61.91 | 63.89 |
| 6 | 0.9667 | 8 | 0.38 | 1.5 | 10 | 1.82 | 0.17 | 1.25 | 49.27 | 96.2 | 99.01 |
| 7 | 0.9793 | 8 | 0.39 | 1 | 6 | 1.79 | 0 | 0.83 | 33.98 | 72.2 | 80.02 |
| 8 | 0.988 | 3 | 0.77 | 3 | 5 | 0.9 | 0.17 | 0.67 | 20.42 | 32.87 | 34.46 |
| 9 | 0.995 | 3 | 0.7 | 5 | 8 | 0.99 | 0.17 | 1 | 40.01 | 91.74 | 93.08 |
| 10 | 0.9551 | 11 | 0.37 | 0.83 | 10 | 1.89 | 0 | 0.83 | 15.28 | 37.01 | 38.21 |
| 11 | 0.973 | 11 | 0.36 | 0.83 | 10 | 1.93 | 0.17 | 0.83 | 23.12 | 70.18 | 73.27 |
| 12 | 0.9865 | 5 | 0.48 | 4 | 10 | 1.46 | 0.17 | 0.83 | 15.66 | 51.49 | 52.26 |
| 13 | 0.9968 | 4 | 0.38 | 5 | 10 | 1.81 | 0 | 0.67 | 41.05 | 102.55 | 104.88 |
| 14 | 0.9841 | 4 | 0.44 | 5 | 10 | 1.59 | 0.67 | 4 | 21.38 | 50.19 | 51.8 |
| 15 | 0.9261 | 7 | 0.26 | 2 | 10 | 2.65 | 0.17 | 1.5 | 17.65 | 56.67 | 61.02 |
| 16 | 0.9731 | 9 | 0.38 | 1.25 | 10 | 1.82 | 0.17 | 1.25 | 36.05 | 100.76 | 103.76 |
| 17 | 0.9936 | 4 | 0.28 | 5 | 10 | 2.45 | 0.17 | 1.25 | 34.06 | 86.96 | 91.7 |
| 18 | 0.998 | 3 | 0.31 | 6 | 10 | 2.2 | 0.17 | 0.83 | 14.4 | 50.67 | 51.89 |
| 19 | 0.999 | 3 | 0.43 | 5 | 8 | 1.62 | 0.5 | 2 | 7.68 | 16.88 | 17.77 |
| 20 | 0.9962 | 3 | 0.73 | 4 | 6 | 0.95 | 0.5 | 1.25 | 8.38 | 18.12 | 18.94 |
| 21 | 0.9656 | 8 | 0.36 | 1.5 | 10 | 1.93 | 0.17 | 1.5 | 16.15 | 47.36 | 49.6 |
| 22 | 0.9903 | 5 | 0.45 | 3 | 8 | 1.54 | 0 | 1.25 | 32.84 | 72.32 | 75.14 |
| 23 | 0.9992 | 3 | 0.26 | 6 | 10 | 2.65 | 0 | 0.67 | 22.01 | 46.83 | 49.15 |
| 24 | 0.9749 | 5 | 0.42 | 4 | 10 | 1.67 | 0.17 | 0.83 | 20.97 | 47.47 | 49.22 |
| 25 | 0.9832 | 5 | 0.48 | 4 | 10 | 1.44 | 0.17 | 1.5 | 23.04 | 68.74 | 70.23 |

| Voluntario | Corr. | No. Para Ke | Ke (1/h) | Tiempo inicial para Ke (h) | Tiempo final para Ke (h) | Vida media de Ke (h) | Tlag (h) | Tmax (h) | Cmax (ng/mL) | ABC 0-t (h*ng/mL) | ABC 0-inf (h*ng/mL) |
|------------|--------|-------------|----------|----------------------------|--------------------------|----------------------|----------|----------|--------------|-------------------|---------------------|
| 26 | 0.9728 | 5 | 0.72 | 2 | 6 | 0.96 | 0 | 0.67 | 15.95 | 32.53 | 33.4 |
| 27 | 0.9875 | 7 | 0.48 | 1.5 | 8 | 1.46 | 0 | 0.83 | 22.47 | 52.73 | 54.25 |
| 28 | 1 | 3 | 0.42 | 5 | 8 | 1.66 | 0.17 | 1.25 | 16.59 | 37.09 | 38.23 |
| 29 | 0.9989 | 3 | 0.49 | 5 | 8 | 1.4 | 0.17 | 0.83 | 11.51 | 26.97 | 27.8 |
| 30 | 0.9955 | 3 | 0.26 | 6 | 10 | 2.69 | 0.17 | 0.83 | 11.19 | 30.27 | 32.31 |
| 31 | 0.985 | 8 | 0.26 | 1.5 | 10 | 2.66 | 0.17 | 0.67 | 20.49 | 61.12 | 66.78 |
| 32 | 0.9721 | 8 | 0.21 | 1.5 | 10 | 3.3 | 0.17 | 0.83 | 19.46 | 62.31 | 72.8 |
| 33 | 0.9939 | 4 | 0.31 | 5 | 10 | 2.2 | 0 | 1.5 | 13.74 | 41.48 | 43.03 |
| 34 | 0.987 | 6 | 0.43 | 3 | 10 | 1.61 | 0.5 | 3 | 13.92 | 49.2 | 50.84 |
| 35 | 0.9999 | 3 | 0.37 | 6 | 10 | 1.9 | 0.17 | 0.67 | 23.46 | 56.8 | 59.06 |
| 36 | 0.9972 | 7 | 0.42 | 2 | 10 | 1.64 | 0.17 | 2 | 25.09 | 85.92 | 87.91 |
| 37 | 0.9916 | 5 | 0.31 | 4 | 10 | 2.21 | 0 | 0.67 | 32 | 76.66 | 79.14 |
| 38 | 0.9996 | 4 | 0.32 | 5 | 10 | 2.15 | 0.17 | 1 | 28.21 | 68 | 70.69 |
| 39 | 0.9995 | 3 | 0.29 | 6 | 10 | 2.37 | 0.17 | 0.83 | 24.53 | 66.01 | 70.02 |
| 40 | 0.9781 | 9 | 0.36 | 1.25 | 10 | 1.94 | 0.17 | 1.25 | 26.06 | 77.7 | 80.51 |

Corr: Correlación.

Ke: Constante de Eliminación.

No para Ke: Número de datos utilizados en el cálculo de Ke.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Departamento de Estado de Estados Unidos, SIDA amenaza a la seguridad mundial, Periódico Electrónico Julio del 2000, Volumen 5, Número 2.
- 2 ONUSIDA/OMS Situación de la epidemia de SIDA, diciembre de 2005 ONUSIDA (2005). Informe sobre la epidemia mundial de SIDA 2005. Ginebra, ONUSIDA. Disponible en <http://www.salud.gob.mx/conasida>.
- 3 INEGI-SSA. Principales causas de mortalidad general 2004, CONAPO Proyecciones de la Población de México, 2000-2050. Disponible en <http://sinais.salud.gob.mx/>
- 4 Guía de manejo antirretroviral de las personas que viven con el VIH/SIDA Segunda Edición, México 2005-2006 Consejo de salubridad general disponible en <http://www.salud.gob.mx/conasida/>
- 5 UNAIDS: The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. disponible en <http://www.unaids.org>
- 6 Organización Panamericana de la Salud. Sin mejora significativa en Salud mundial del 2005 al 2006, <http://www.paho.org>
- 7 Consejo Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA Secretaria de Salud Panorama Epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México, 30 de junio del 2005. información disponible en <http://www.salud.gob.mx/conasida>.
- 8 Abbas Kabul. Inmunología celular y molecular. 5° Edición, Elsevier. España 2004, pág. 464-475.
- 9 R. Cummings M. Conceptos de Genética. 5° Edición. Prentice Hall. España 2000, pág.665-667.

- 10 Aranda Anzaldo A. En la frontera de la vida: los virus. Fondo de cultura económica. México 2001.
- 11 Janney Ch., Travers P., Walport M., Shlomchik M., Immunobiology The immune system in health and disease, Quinta edición, Garland Publishing, USA 2001, pág. 450-459
- 12 T. DeVita V, Hellman S, A Rosenberg S. SIDA Etiología, Diagnóstico, Tratamiento y Prevención 2° Edición. Salvat Editores (1990) Barcelona España, pág. 11-85.
- 13 Hanneke Schuitemaker, Frank Miedema. Kluwer. Immunology and medicine AIDS pathogenesis. Academia Publishers, vol 28 Holanda 2000. Capítulo 12, pág. 221- 232.
- 14 Roche HIV lifecycle. <http://www.roche-hiv.com>
- 15 AIDS and other manifestations of HIV Infection. 4ª Ed. Gray P. Wormser/ Elsevier 2004, pág. 58–93.
- 16 Modificación Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-1993, Para la prevención y control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Junio 2000. <http://www.economia.gob.mx/>
- 17 Amigos contra el SIDA. Guía para la atención médica de pacientes con infección por VIH/SIDA en consulta externa y hospitales disponible en: <http://www.aids-sida.org/>
- 18 Department for health and human services AIDS info. Offering information on HIV/AIDS, Treatment, Prevention and Research. <http://www.aidsinfo.nih.gov/>
- 19 U.S. Food and drug administration. HIV/AIDS Therapeutics <http://www.fda.gov>

- 20 AIDS Therapy, 2° Edición. Rápale Dolin, Henry Masur, Michael S. Saag, Churchill Livingstone. Elsevier Science 2003, Elsevier (USA) 2003, pág. 57-65, 948, 971-975.
- 21 Tarinas Reyes A. Tápanes Peraza R. D. y Pérez Ávila L. J. Terapia antiviral para VIH-SIDA Rev Cubana Farm 2000; pág. 34(3):207-220
- 22 Lupo S. Clínica y terapéutica de la infección por VIH y SIDA, Tomo II. 1° Edición. Argentina 2003, pág. 59 -70.
- 23 J. Balzarini and E. De Clercq. Antiretroviral Therapy. ASM press 2001 Washington D. C. E. U, pág. 31- 39.
- 24 Hardman J. G, Goodman G.A. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9° Edición, 1996, pág. 1206-1209.
- 25 Diccionario de especialidades farmacéuticas PLM 2005 51° Edición, Editorial Thomson PLM México 2005, pág. 309-311, 1739-1734, 3451-3461
- 26 Mosby GenRx, A comprehensive reference for generis and brand prescription dugs. 11° Edición, Editorial Mosby pág. III 2553 – III 2558.
- 27 Análisis de los costos de atención del VIH/SIDA en México Costing of HIV/AIDS Treatment in Mexico Available at: CENSIDA (2002) Panorama Epidemiológico del VIH/SIDA e ITS en México: www.inegi.gob.mx/
- 28 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que realicen las pruebas.
- 29 Quattrochi O. A, Abelaira S.I, Laba R.F. Intoducción a la HPLC aplicación y práctica, Buenos Aires, Argentina (1992) pág. 3-6, 211-218, 331-334.

- 30 Willard H, Merritt L, Dean J. Métodos Instrumentales de Análisis, Grupo editorial Iberoamericana. 7° Edición. México 1991,pág. 455-460, 597-599.
- 31 Bezy Vincent, Simultaneous análisis of several antirretroviral nucleosides in rat-plasma by high-performance liquid chromatography with UV using acetic acid/hydroxylamine buffer. Test of this new volatile medium-pH for HPLC-ESI-MS/MS. J. Chrom B, 821(2005), pág 132-143
- 32 Hemant K. Jajoo and Steven M. Bennett "Thermospray liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of anti-AIDS nucleosides: quantification of 2', 3'-dideoxycytidine in plasma samples". J. Chrom. Biom. Appl, pág. 577 (1992) 299-304.