



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE HIDROXICLOROQUINA EN  
SANGRE Y TEJIDO LINFOIDE

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q.F.B. ELVIA ADRIANA MORALES HIPÓLITO**



TUTOR:

Dra. Helgi Jung Cook

AÑO: 2007



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México**

Porque ser parte de la máxima casa de estudios es un privilegio.

### **A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y en especial al Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR)**

Lugar donde se desarrollo este trabajo

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**

Por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

### **A la Dirección General de Estudios de Posgrado (D.G.E.P.)**

Por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

### **Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT)**

Por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

Dra. Helgi Jung.

Por su apoyo para la realización de este trabajo y por sus conocimientos.

Dra. Raquel López, DAR Juan José Díaz y Dra. Patricia Ramírez

Por los equipos e instrumentos que se utilizaron para la realización de este trabajo

Dra. Alejandra Ayanegui, al MVZ Jaime Jaimes y al MVZ C. Salvador Flores.

Por su ayuda de laboratorio durante el estudio.

A los sinodales.

Por sus aportaciones para la mejora de este trabajo

Parte de este trabajo fue presentado en el XXXIX Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, realizado en Puerto Vallarta. Octubre de 2006.

# ÍNDICES

---

---

---

---

<b>ÍNDICE GENERAL</b>		PÁG
1	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
2	ÍNDICE DE TABLAS	2
3	ÍNDICE DE FIGURAS	3
4	INTRODUCCIÓN	4
5	OBJETIVOS	6
6	ANTECEDENTES	
6.1	SIDA	
6.1.1	Definición	8
6.1.2	Virus del VIH	8
6.1.3	Ciclo de reproducción del virus	8
6.1.4	Sistemas afectados por el virus del VIH	10
6.1.5	Tratamientos actuales contra el SIDA	12
6.2	SISTEMA INMUNOLÓGICO	
6.2.1	Definición	13
6.2.2	Componentes del sistema inmunológico	13
6.2.2.1	Médula ósea	14
6.2.2.2	Tejido linfoide	14
6.2.2.3	Placas de Peyer	14
6.2.2.4	Bazo	15
6.2.3	Sistema linfático	17
6.2.4	Sistema inmunológico y el virus del VIH	17
6.3	HIDROXICLOROQUINA	
6.3.1	Propiedades Fisicoquímicas	19

6.3.2	Propiedades farmacológicas	20
6.3.3	Mecanismo de acción	20
6.3.4	Aspectos Farmacocinéticos de la Hidroxicloroquina	
6.3.4.1	Absorción	21
6.3.4.2	Distribución	21
6.3.4.3	Metabolismo	21
6.3.4.4	Eliminación	21
6.3.5	Dosis y vías de administración	22
6.3.6	Toxicidad	22
6.3.6.1	Signos y síntomas	22
6.3.6.2	Mecanismo de acción	23
<b>7 DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>		
7.1	Método Analítico para la cuantificación de Hidroxicloroquina en sangre total y tejido linfoide.	
7.1.1	Equipo y reactivos	24
7.1.2	Preparación de estándares y soluciones	25
7.1.3	Preparación de curva de calibración del sistema	26
7.1.4	Preparación de curva de calibración del método	27
7.1.5	Preparación de la muestra	
7.1.5.1	Método de extracción de hidroxicloroquina en sangre	28
7.1.5.2	Método de extracción de hidroxicloroquina en tejido linfoide	29
7.1.5.3	Condiciones cromatográficas	30
7.1.6	Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en muestras sanguíneas.	

---

7.1.6.1	Linealidad del sistema	31
7.1.6.2	Linealidad del método	31
7.1.6.3	Precisión y Exactitud del método	31
7.1.6.4	Límite de Cuantificación y Detección	31
7.2	Estudio de Biodistribución de Hidroxicloroquina en conejo	32
8	RESULTADOS Y ANÁLISIS	
8.1	Método analítico para la cuantificación de hidroxicloroquina en sangre total.	
8.1.1.	Especificidad	33
8.1.2.	Linealidad del sistema	34
8.1.3.	Linealidad del método	36
8.1.4.	Precisión y exactitud del método	38
8.1.5.	Límite de cuantificación y detección	39
8.1.6.	Selectividad del método para la cuantificación en tejido	39
8.2	Estudio de biodistribución de HCQ en sangre total y en tejido linfoide	
8.2.1.	Farmacocinética de Hidroxicloroquina en sangre.	40
8.2.2.	Biodistribución de Hidroxicloroquina en tejido linfoide	42
8.2.3.	Comparación de niveles de HCQ en sangre y tejido linfoide.	48
9	CONCLUSIONES	50
10	BIBLIOGRAFIA	51
11	ANEXOS	54

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS****SÍMBOLO**

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AUC	Área bajo la curva
$b_0$	Intercepto
$b_1$	Pendiente
BDCQ	Bisdeseetilcloroquina
C máx.	Concentración máxima
Cl	Depuración
CV	Coefficiente de variación
DCQ	Desetilcloroquina
DHCQ	Desetilhidroxicloroquina
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia Antiretroviral Altamente Activa
HCQ	Hidroxicloroquina
IgA	Inmunoglobulina A
IC	Intervalo de Confianza
IL	Interleucinas
K	Constante de eliminación
MRT	Tiempo medio de residencia
$r^2$	Coefficiente de determinación
SI	Sistema inmunológico
SIDA	Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida
$T_{1/2}$	Tiempo de vida media
T máx.	Tiempo en el cual se alcanza la máxima concentración
$V_F$	Volumen de distribución
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

**ÍNDICE DE TABLAS**

Nº TABLA		PÁG
1	Linealidad del sistema para la cuantificación de hidroxiclороquina.	34
2	Parámetros de la linealidad del sistema para la cuantificación de hidroxiclороquina.	35
3	Linealidad del método para la cuantificación de hidroxiclороquina en sangre total.	36
4	Parámetros de la linealidad del método	37
5	Exactitud y precisión del método para cuantificar hidroxiclороquina en sangre	38
6	Concentración de hidroxiclороquina en los diferentes tiempos de muestreo.	41
7	Parámetros farmacocinéticos de hidroxiclороquina.	42
8	Cantidad de hidroxiclороquina [ $\mu\text{g}$ ] por gramo de tejido en función del tiempo.	43
9	Parámetros farmacocinéticos de hidroxiclороquina en los 6 diferentes tejidos linfoides y sangre.	47
10	Relación de los niveles encontrados de hidroxiclороquina en los diferentes tejidos en sangre y tejido linfoide	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Nº FIGURA		PÁG
1	Ciclo vital y reproducción del VIH	9
2	Componentes del sistema linfático	13
3	Representación de las placas de Peyer	15
4	Representación del bazo	16
5	Estructura de la Hidroxicloroquina	19
6	Estructura de los metabolitos de la Hidroxicloroquina	22
7	Espectro de absorción de HCQ en solución amortiguadora de fosfatos pH 2.5 [0.1M]	33
8	Cromatograma de HCQ para evaluar la especificidad del método.	34
9	Linealidad del sistema para la cuantificación de Hidroxicloroquina	35
10	Linealidad del método para la cuantificación de Hidroxicloroquina	37
11	Cromatograma de tejido blanco y tejido con HCQ.	40
12	Representación gráfica de la Concentración de HCQ en sangre en función del tiempo.	41
13	Gráfico del perfil de biodistribución de HCQ en los diferentes tejidos linfáticos.	43
14	Gráfico del perfil de biodistribución de HCQ en el Bazo.	44
15	Gráfico de la $C_{máx.}$ y del $T_{máx.}$ de HCQ en los diferentes tejidos.	45
16	Gráfico del tiempo de vida media de eliminación de HCQ en los diferentes tejidos	46
17	Gráfico del tiempo de vida media de eliminación de HCQ en los diferentes tejidos.	46



# **INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

En México, al igual que en el resto de los países del mundo, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se ha convertido en un problema prioritario de salud pública muy complejo, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud, y que constituyen una amenaza para la seguridad nacional y para el desarrollo económico y social de las naciones.

A finales del 2004, ONUSIDA estimó que a nivel mundial existen 39.4 millones de personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de los cuales 37.2 millones eran adultos, 17.6 millones mujeres, y 2.2 millones menores de 15 años. Cada día 14 mil personas se infectan por el VIH en todo el mundo. Aproximadamente el 50% de las nuevas infecciones por VIH, se producen en jóvenes de entre 10 y 24 años. Únicamente durante el 2004, el SIDA causó 3.1 millones de muertes ([http://www.biocab.org/VIH\\_SIDA.html#anchor\\_1005](http://www.biocab.org/VIH_SIDA.html#anchor_1005)).

Considerando el número total de casos reportados, México ocupa el tercer lugar en el continente americano, después de Estados Unidos y Brasil; sin embargo, de acuerdo con la prevalencia de VIH México se ubica en el vigésimo tercer lugar en América y el Caribe, y el sitio veintisiete a nivel mundial. (<http://www.globalhealthfacts.org/topic.jsp?i=1>)

México se clasifica como un país con una epidemia de SIDA concentrada en los grupos que mantienen prácticas de riesgo, en contraste, la prevalencia de VIH en población adulta de 15 a 49 años de edad es del 0.3%, lo cual significa que tres de cada mil personas adultas podrían ser portadoras del VIH en nuestro país. De acuerdo a las estimaciones más recientes del Centro Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CENSIDA), en México existen 182 mil personas adultas infectadas por el VIH.

En la actualidad existen diferentes tratamientos los cuales, aun cuando no eliminan el virus, tienden a detener su multiplicación y a frenar la destrucción de las células productoras de defensas, retrasando el comienzo de las enfermedades.

Debido a lo anterior y a que los fármacos ya existentes para el tratamiento de dicha enfermedad no se encuentran al alcance de la mayor parte de la población, es necesario continuar investigando el desarrollo de nuevos fármacos que actúen a otros niveles del ciclo de replicación del virus y que además los costos sean menores. Algunos estudios concentran sus esfuerzos en estimular la respuesta del sistema inmunológico del paciente, mientras que otros guardan la esperanza de encontrar una vacuna eficaz que además se enfrenta a la dificultad añadida de la gran variabilidad genética del virus.

Por ello se investiga la hidroxicloroquina que es un fármaco antimalárico el cual también ejerce un efecto benéfico en lupus eritematoso (sistémico y discoide) y artritis reumatoidea aguda y crónica y otras enfermedades autoinmunes, como terapia alterna para el tratamiento de dicha enfermedad. Aún cuando no se conoce su mecanismo de acción, se sabe que este está relacionado con la elevación del pH intracitoplasmático (Grace, 1996), lo cual altera el ensamble de las cadenas a y b de las moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y de esta manera interfiere con el procesamiento antigénico y por tanto disminuye el estímulo autoinmune de la células CD4+. Dado su mecanismo de acción, recientemente se ha encontrado que frena la replicación del VIH en el laboratorio, sin embargo, no existe información acerca de su biodistribución y los datos farmacocinéticos son escasos. Para ello, se requiere contar con metodología analítica sencilla y específica para su cuantificación en fluidos biológicos, para conocer los niveles o cantidad de fármaco que llega al sitio de acción.



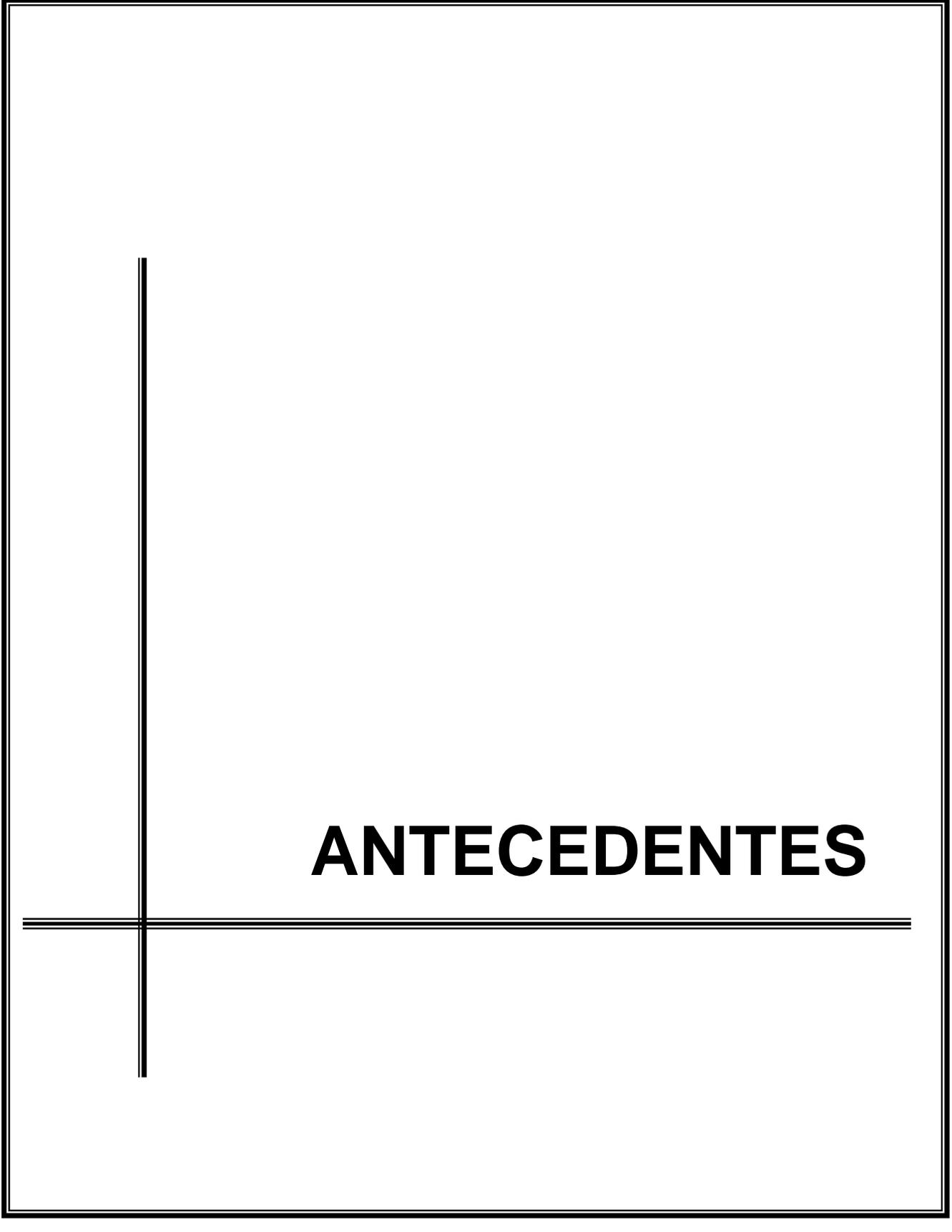
# **OBJETIVOS**

## OBJETIVO GENERAL.

Determinar la biodistribución y los niveles alcanzados de Hidroxicloroquina en sangre completa y tejido linfoide.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Determinar las condiciones óptimas para cuantificar Hidroxicloroquina en sangre completa y tejido linfoide.
- Validar el método para cuantificar Hidroxicloroquina en sangre completa.
- Estimar las concentraciones de Hidroxicloroquina durante el estudio de distribución.
- Comparar y analizar los niveles alcanzados de Hidroxicloroquina en sangre y tejidos.
- Establecer la posible correlación de los datos sanguíneos con los obtenidos en tejido.
- Evaluar, según los resultados obtenidos, el posible uso de la Hidroxicloroquina como terapia alterna en el tratamiento del SIDA.



# **ANTECEDENTES**

## **6.1 SIDA**

### **6.1.1 Definición**

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

### **6.1.2. Virus del VIH**

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

El VIH agente causante del SIDA, es un retrovirus lentivirae, aparentemente no oncogénico. Fue descubierto y relacionado con el SIDA por Luc Montaigner en Francia en 1983. Es un virus esférico con varias capas proteicas. Su material genético se compone principalmente de ARN que debe copiarse en ADN para poder multiplicarse e integrarse en el núcleo de la célula que infectan. Los antígenos (proteínas) de la envoltura exterior, permiten al virus adherirse e infectar a los linfocitos. (Roitt, 2003)

### **6.1.3. Ciclo de reproducción del virus**

El proceso de conversión de ARN en ADN es una característica principal de los retrovirus y se lleva a cabo mediante acciones enzimáticas de transcriptasa inversa.

Con la demostración de la existencia de la transcriptasa inversa, se inició en la década de los 70's la búsqueda de retrovirus humanos, que permitió el aislamiento en 1980 del virus de leucemia de células T del adulto, HTLV-1 (Gallo, 2002).

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

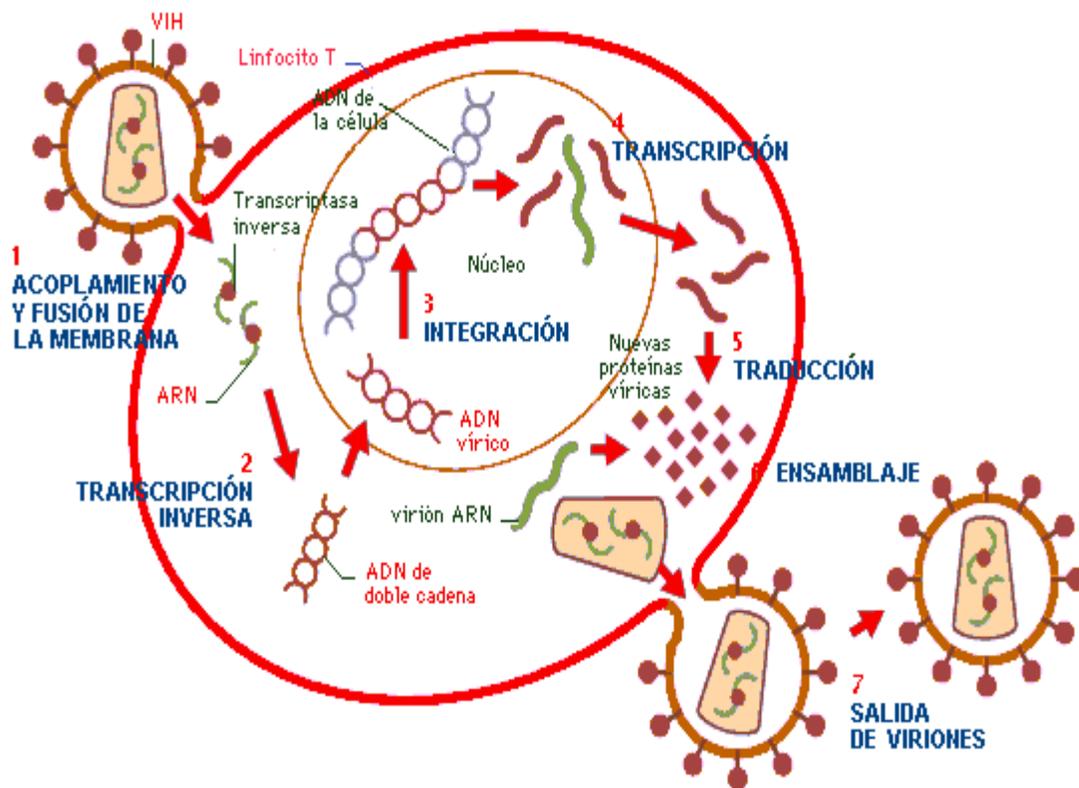


Figura 1. Ciclo vital y reproducción del VIH

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

#### **6.1.4. Sistemas afectados por el virus del VIH**

En el momento de la infección primera, esa afección se traduce a veces en una encefalitis, una meningitis o una afección de los nervios periféricos. Todas esas manifestaciones retroceden de manera espontánea. Se piensa que algunas cepas víricas tendrían una afinidad mayor con las células macrófagas que con los linfocitos. Una vez infectadas, los macrófagos atraviesan la barrera de la meninge, que protege el cerebro, y originan pequeños focos de infección vírica.

En el momento en que el SIDA se declara, estos focos son reactivados al desplomarse el sistema inmunitario, desarrollándose una encefalitis en aproximadamente el 20 % de los pacientes. Los primeros signos son dificultades de concentración, lapsus de memoria y lentitud intelectual. Transcurridas algunas semanas o algunos meses, se produce un estado de demencia. La encefalitis es la complicación neurológica más frecuente en la fase de SIDA. Del 40 al 80 % de los enfermos presentan manifestaciones neurológicas más o menos severas. En los recién nacidos con infección de madres seropositivas y déficit inmunitario importante, existe una forma muy grave de esta enfermedad. En todos los casos el pronóstico es muy sombrío.

El mecanismo por el cual el virus produce esos trastornos a pesar de no infectar las neuronas, es incierto. Se asume que se debe a mecanismos indirectos como el siguiente: Las células macrófagas segregan citocinas inflamatorias que trastornan

el funcionamiento de las células gliales, que rodean las neuronas, o que liberan productos de oxidación, en particular óxido nítrico, el cual a dosis altas altera su funcionamiento o conduce a su muerte por apoptosis.

El sistema nervioso es también la sede de infecciones oportunistas: toxoplasmosis cerebral (en el 14 % de los casos), encefalitis por citomegalovirus, criptococosis neuromeningea (19 % de los casos), linfomas, o también leuco-encefalia multifocal causada por un pequeño virus en el ADN.

En el curso de la enfermedad pueden también surgir manifestaciones hematológicas como: disminución del número de plaquetas sanguíneas con alteraciones de la coagulación, alteración en las cepas sanguíneas, presencia de auto-anticuerpos en la sangre.

En esa fase de la enfermedad, todos los parámetros inmunitarios se colapsan. Los linfocitos mueren por el virus o de apoptosis. La disminución de los linfocitos T4 precede a veces a la aparición de una infección oportunista (Parslow,2001).

Además, en todas las células del organismo, se acelera un proceso destructor: el estrés oxidante. Las células macrófagas activadas e infectadas liberan en la circulación cantidades cada vez más importantes de productos de oxidación, de radicales libres, que son tóxicos para las otras células, provocando la apoptosis y ruptura de ADN y modificando las membranas de las otras células, que se convierten a causa de ello en más frágiles. Ese mecanismo implica una destrucción celular muy importante. En la fase terminal, ya no quedan linfocitos T4 en la sangre, mientras que circulan grandes cantidades de antígeno vírico. La muerte puede producirse como consecuencia de la recidiva de una infección, de un cáncer, de una encefalopatía o incluso por caquexia.

### 6.1.5. Tratamientos actuales contra el SIDA.

En la actualidad existen diferentes tratamientos los cuales, aun cuando no eliminan el virus, tienden a detener su multiplicación y a frenar la destrucción de las células productoras de defensas, retrasando el comienzo de las enfermedades. Estos fármacos reciben el nombre de antiretrovirales. El primer tipo es el de los inhibidores de la transcriptasa inversa, que interfieren la acción de dicha enzima, que el virus utiliza para convertir el ARN en una copia de ADN y el segundo tipo, inhibidores de la proteasa. Son fármacos que obstaculizan la acción de esta enzima viral que convierte las proteínas en fragmentos que se ensamblan en la cubierta de las partículas nuevas de VIH que se producen (Tortora, 2002).

Los diferentes antiretrovirales actúan en las diferentes etapas del ciclo vital del VIH. Las combinaciones de tres o cuatro fármacos conocidas como Terapia Antiretroviral Altamente Activa, (HAART, por sus siglas en ingles), ha permitido que los enfermos infectados, lleven a cabo vidas productivas; sin embargo la durabilidad de HAART aun no se ha establecido, además los problemas tóxicos de los medicamentos no han permitido establecer un tratamiento continuo de esta terapia.

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

Las combinaciones de antiretrovirales actúan incrementando el número de obstáculos para la mutación viral, manteniendo bajo el número de copias virales. Esto limita el número de combinaciones posibles.

## 6.2 SISTEMA INMUNOLÓGICO (SI)

### 6.2.1 Definición

El término inmunidad tiene su origen en un vocablo romano que significa privilegio de exención o “estar libre de” y que hace referencia a la capacidad que poseen los seres vivos de no sufrir continuamente las enfermedades que ocasionan la agresión de los microorganismos (Roitt, 2003).

El sistema inmunológico es el responsable de defender al organismo del ataque de los diferentes tipos de agentes potencialmente dañinos para él (antígenos); está integrado por numerosos componentes que interaccionan entre sí y con el medio, para reconocer lo que es propio y diferenciarlo de lo ajeno o extraño y así iniciar una serie de respuestas encaminadas a eliminarlo, sus características son, la especificidad y la memoria (Roitt, 2003, Abbas, 2002).

### 6.2.2 Componentes del Sistema Inmunológico

Desde el punto de vista estructural, los componentes básicos del sistema inmunológico son la médula ósea y el tejido linfoide. Ambas estructuras generan y soportan complejos sistemas celulares y humorales, integrados básicamente por los linfocitos T y B, responsables del mecanismo celular de la respuesta inmunológica, las inmunoglobulinas o anticuerpos, responsables del mecanismo humoral; el sistema mayor de histocompatibilidad, marcador leucocitario, que desencadena respuestas inmunológicas específicas; el sistema del complemento, que colabora en la elaboración de dichas respuestas, y las denominadas interleucinas y citocinas, sustancias que actúan de mediadores entre los distintos elementos. Todo este complejo defensivo se halla a su vez interrelacionado gracias al sistema linfático.

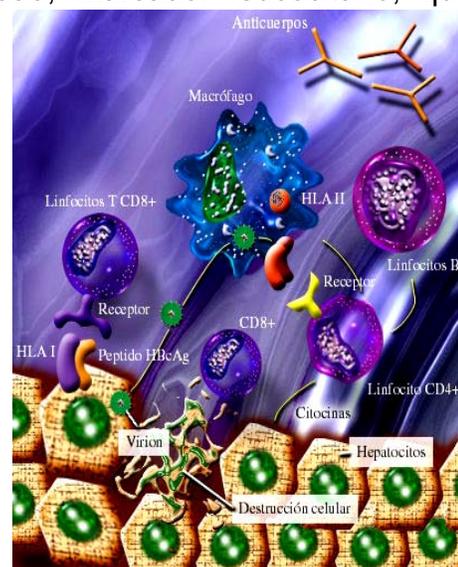


Figura 2. Componentes del sistema linfático

### **6.2.2.1 Médula ósea**

La médula ósea es el órgano que genera todas las células que circulan por la sangre, ya que en ella se localizan los elementos pluripotenciales que, en su desarrollo, van dando lugar a todos los demás.

Es en ella donde se originan los dos tipos fundamentales de células defensivas: las de origen linfoide y las de origen mieloide. Las primeras dan origen a los linfocitos, que a su vez se dividen en tipo T y en tipo B (según donde se desarrollan; es decir las células B se desarrollan en la médula ósea y en el hígado fetal y las células T en el Timo), las segundas dan lugar a los granulocitos, que se diferencian en neutrófilos, eosinófilos y basófilos; a los mastocitos, y a los monocitos y macrófagos.

### **6.2.2.2 Tejido linfoide**

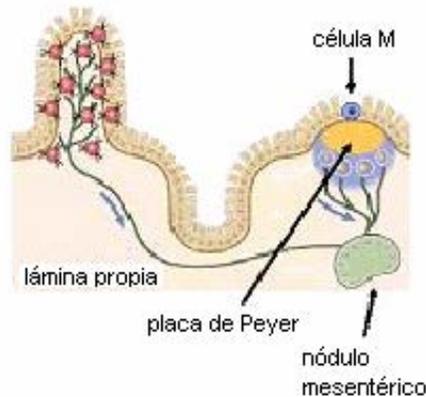
Este tejido da origen a la mayoría de los linfocitos y permite su desarrollo en fases iniciales de la vida. Se encuentra en el timo, un pequeño órgano retroesternal, cuya función es permitir la maduración de los linfocitos T y que solo es funcional hasta la adolescencia.

El tejido linfoide esta presente asimismo en todas las mucosas del organismo (intestinal, respiratoria, urogenital, etc.), y su localización en estos casos es privilegiada para defender al cuerpo de cualquier ataque externo, dada su proximidad a las puertas de entrada a la circulación sanguínea y al conjunto de órganos.

### **6.2.2.3 Placas de Peyer.**

Las Placas de peyer son cúmulos de folículos linfoides, los cuales se encuentran en la porción terminal de íleon. Su función es reconocer y absorber antígenos y patógenos y desencadenar respuestas inmunitarias con especificidad a antígeno en la mucosa. Esto lo realizan mediante la inducción de la actividad de linfocitos B comprometidos con IgA.

Estas placas se desarrollan tempranamente en la vida fetal, pero después de nacido, se necesita la estimulación por antígenos para activar los folículos linfoides. El tamaño y el número de estos últimos aumentan hasta la pubertad, luego disminuyen (Neu Josef, 1996).



**Figura 3. Representación de las placas de peyer**

#### 6.2.2.4 Bazo

El bazo es otro órgano linfoide, que presenta antígenos a las células inmunológicas y también participa en la eliminación y filtración de los componentes deteriorados o anómalos de la sangre.

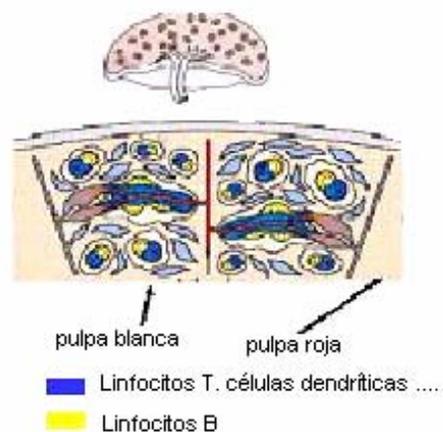
Es un órgano linfoide secundario grande (150 g en humanos adultos), de forma ovoide, situado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen.

Está especializado en capturar antígenos transportados por la sangre (p. Ej., en las situaciones de infecciones sistémicas). Se forma por la arteria esplénica, la cual se ramifica en numerosas arteriolas, que descargan a los sinusoides esplénicos; de allí arrancan las vénulas, que finalmente se unen en una sola vena esplénica que sale del órgano.

Posee una cápsula de tejido conectivo, de la que salen hacia el interior numerosas trabéculas que delimitan compartimentos. En cada compartimiento se distinguen dos tipos principales de tejidos: la pulpa blanca y la pulpa roja.

1. La **pulpa blanca** está constituida por tejido linfoide, principalmente por linfocitos y macrófagos, dispuestos alrededor de ramas de la arteria esplénica llamadas arterias centrales.
2. La **pulpa roja** es una red de sinusoides venosos que contienen macrófagos residentes especializados (macrófagos de los senos esplénicos), que además se encarga de tres funciones relacionadas con los elementos formes de la sangre: 1) Eliminación de células sanguíneas y plaquetas defectuosas, que efectúan los macrófagos, 2) almacenamiento de plaquetas, que puede ser hasta un tercio del total y 3) producción de células sanguíneas (hematopoyesis) durante la vida fetal.

El bazo recibe cada día más linfocitos que la suma de todos los de los ganglios linfáticos.



**Figura 4. Representación del bazo**

### **6.2.3 Sistema linfático.**

El sistema linfático constituye un aparato circulatorio en paralelo al de la sangre, por el que circula la linfa, líquido semejante al plasma sanguíneo, de color amarillento, que se forma a partir de los fluidos que se encuentran entre las células (espacio intersticial) constitutivas de los distintos tejidos del organismo. Dichos fluidos procedentes de todo el cuerpo, penetran en el sistema a través de los capilares linfáticos, que a su vez van desembocando en conductos cada vez mayores, llamados colectores.

Los ganglios linfáticos se encuentran intercalados a lo largo de la red vascular y filtran el líquido por ella transportado. Entre otras funciones, controlan el contenido de lo que se encuentra circulando por el organismo y, en caso necesario, pueden desencadenar un ataque y destruir a los elementos potencialmente nocivos.

El sistema linfático, además de absorber hacia la linfa las grasas procedentes de la digestión, de mantener el equilibrio del volumen corporal total y de recoger las proteínas que por su tamaño no pueden traspasar los capilares sanguíneos, ejerce una función defensiva básica, al promover la circulación de los linfocitos. Sin embargo, este sistema vascular también puede facilitar la extensión de un tumor, ya que por él pueden viajar las células malignas hasta que encuentran un lugar donde asentarse y continuar proliferando (Diez, 2003).

### **6.2.4 El Sistema Inmunológico y el VIH**

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

El VIH infecta fundamentalmente las células T CD4 que son esenciales en la respuesta inmunitaria y además presenta estrategias de escape que actúan con gran eficacia (variabilidad genética, latencia-reactivación, existencia en santuarios-reservorios, etc.).

In vivo el VIH tienen dos células diana principales: los linfocitos CD4 y los macrófagos de los tejidos. Los CD4 de sangre periférica se encuentran infectados en una proporción pequeña, mientras que, en los ganglios linfáticos también existe una proporción de células infectadas, solo una parte mínima, replica activamente el genoma proviral que contiene. Esa pequeña proporción de CD4 infectados daría lugar a la producción diaria de  $10^{10}$  viriones que ocasionaría la destrucción de  $10^8$  CD4 cada 36 horas por un efecto citopático directo y la infección de un número similar de células, especialmente linfocitos destinados a restituir los linfocitos destruidos.

Desde una visión meramente descriptiva frente al VIH se produce una respuesta humoral y una respuesta celular, ambas con efectores específicos e inespecíficos. La infección VIH induce una respuesta intensa de Ac (inmunidad humoral específica) frente a las proteínas estructurales y reguladoras del virus. Algunos de los Ac tienen carácter neutralizante y se piensa que podrían ejercer un efecto protector frente a la evolución progresiva de la enfermedad (Ac frente a gp41 y gp120), pero, en contraposición, también se ha descrito Ac frente a la envoltura del VIH que tendrían la misión de facilitar su fagocitosis por las células del sistema monocito-macrófago lo que paradójicamente contribuye a la infección de los macrófagos y a facilitar la infección de nuevas células por el VIH, por lo que se dice que la respuesta inmune es adecuada pero llega un minuto tarde.



### **6.3.2. Propiedades farmacológicas.**

La HCQ es una 4-aminoquinolina que desde principios de los años cincuentas se utiliza en el tratamiento de las enfermedades reumáticas, especialmente en la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico. Es la más prescrita en los Estados Unidos en el tratamiento del lupus eritematoso. Se utiliza también en el tratamiento de erupciones cutáneas fotosensibles (Craig, 1997, Derendorf, 1995).

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

Actualmente se han realizado estudios sobre la toxicidad de la Hidroxicloroquina en pacientes en donde se ha encontrado que los casos de toxicidad son poco probables y se reportan casos aislados.

### **6.3.3. Mecanismo de acción.**

La Hidroxicloroquina presenta actividad antimalárica, también es efector en el tratamiento de lupus eritematoso (sistémico y discoide) y artritis reumatoide aguda y crónica. El mecanismo de acción no se conoce, pero parece estar ligado a la elevación del pH intracitoplasmático (Grace, 1996) lo cual altera el ensamble de las cadenas y de las moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y de esta manera interfiere con el procesamiento antigénico y por tanto, disminuye el estímulo autoinmune de la célula CD4+.

Además inhibe la internalización y subsecuente degradación del complejo IL-2/IL-2R e inhibe la producción de IL-2 por interferir con la transcripción y liberación proteica. In vitro inhibe la producción de citosina por células mononucleares de sangre periférica inducida por fitohemaglutinina y otros agentes (Martindale, 2003).

#### 6.3.4. Farmacocinética.

##### 6.3.4.1 Absorción.

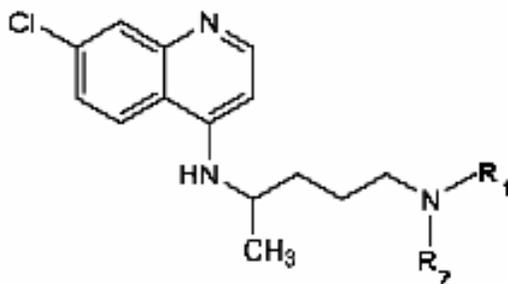
Después de su administración oral, se absorbe rápidamente y casi completamente a lo largo del tracto gastrointestinal, alcanzando niveles máximos de 2 a 4.5 horas con una media de 3.2 horas.

##### 6.3.4.2 Distribución.

La HCQ tiene una gran afinidad por tejidos, especialmente aquellos que contienen melanina, fijándose fuertemente a los mismos. Los enantiómeros de la HCQ y sus metabolitos se fijan de diferente forma a las proteínas plasmáticas. La vida media promedio de eliminación es de 32 días.

##### 6.3.4.3 Metabolismo.

La HCQ es metabolizada en el hígado en tres metabolitos principales: desetilcloroquina, desetilhidroxicloroquina y didesetilcloroquina, cuyas estructuras se presentan en la siguiente figura (Carmem, 2005):



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Hidroxiclороquina (HCQ)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
Desetilhidroxiclороquina (DHCQ)	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
Desetilclороquina (DCQ)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H
Bisdesetilclороquina (BDCQ)	-H	-H

**Figura 6. Estructura de los metabolitos de la HCQ**

#### **6.3.4.4 Eliminación.**

Después de la administración de una dosis oral única, la HCQ se elimina por la orina en un periodo de 10 días y aproximadamente el 25% de HCQ se elimina en forma inalterada (Clarke, 2004). Durante la administración diaria, menos del 13% es eliminado en orina en un periodo de 24 hrs., en un 8% en forma de fármaco inalterado y aproximadamente un 5% en forma de sus tres metabolitos. La depuración de HCQ es de 96 mL/min.

#### **6.3.5. Dosis y vías de administración.**

En un ataque agudo de malaria, la dosis recomendada es de 2 g de sulfato del hidroxiclороquina durante 3 días (1.2 g en el primer día). En artritis reumatoide, 400 a 800 mg diariamente.

#### **6.3.6 Toxicidad.**

##### **6.3.6.1 Signos y síntomas**

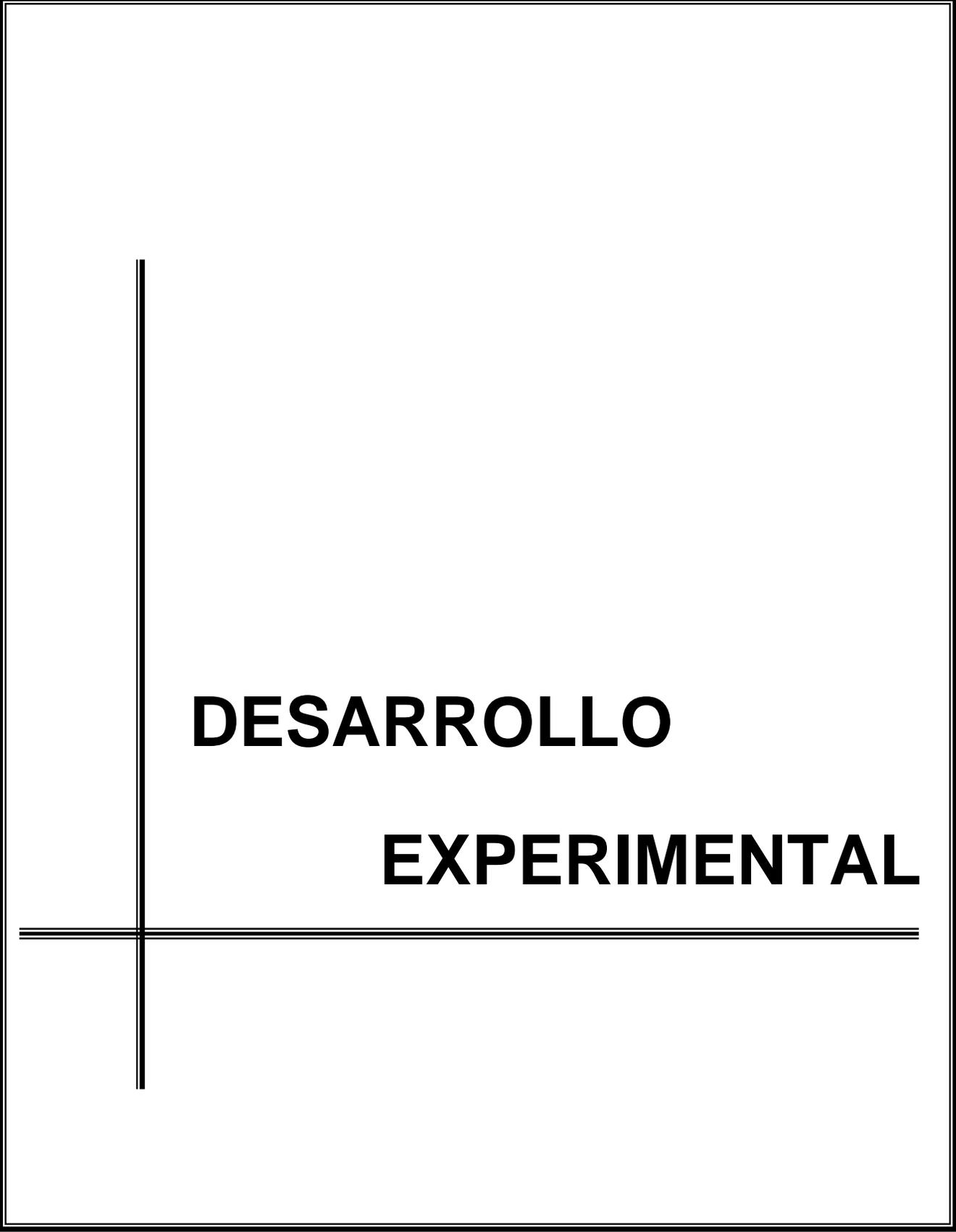
La toxicidad retiniana de la cloroquina fue reportada inicialmente en 1957 por Cambiaggi, en un paciente con lupus eritematoso sistémico. Aunque inicialmente los hallazgos fundoscópicos fueron atribuidos al lupus eritematoso sistémico, los hallazgos histopatológicos reportados años más tarde, comprobaron la toxicidad; sin embargo los casos de toxicidad por la ingestión de este fármaco son pocas en comparación con el número de personas que utilizan este medicamento durante períodos muy prolongados.

Como se mencionó anteriormente, la HCQ presenta mayor actividad y un riesgo de toxicidad mucho menor por lo que puede ser utilizado por largos períodos de tiempo, lo cual se demuestra en que actualmente la HCQ es uno de los fármacos de excelencia en el tratamiento de la artritis reumatoide y el lupus eritematoso (Martindale, 2003).

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

#### **6.3.6.2 Mecanismos de toxicidad**

El mecanismo por el cual este fármaco produce toxicidad es desconocido. La cloroquina y la HCQ se unen a la melanina y por lo tanto se concentran en la urea y el epitelio pigmentario. Los factores que pueden influir en el desarrollo de la toxicidad podrían incluir inhibición enzimática e interferencia con funciones metabólicas de las células del epitelio pigmentario de la retina y/o fotorreceptores. La retención prolongada del fármaco en estos tejidos, probablemente es la responsable de la progresión de la retinopatía o a la aparición de la retinopatía de inicio tardío a pesar de haberse suspendido el consumo del fármaco. Pequeñas cantidades de estos fármacos pueden ser detectadas hasta cinco años después de ser suspendido el tratamiento (Martindale, 2003).



**DESARROLLO**

**EXPERIMENTAL**

## 7.1 Método Analítico para la cuantificación de Hidroxicloroquina en sangre total y tejido linfoide

### 7.1.1 Equipo y reactivos

Sustancia de referencia

Sulfato de Hidroxicloroquina USP; 100 mg de sulfato de HCQ equivalen a 77 mg de HCQ base libre, donado por Sanofi - Aventis.

Reactivos

- ◆ Acetonitrilo HPLC Marca Mallinckrodt
- ◆ Metanol HPLC Marca Mallinckrodt
- ◆ Fosfato de potasio monobásico RA Marca Productos Químicos Monterrey
- ◆ Ácido fosfórico RA Marca Fisher scientific
- ◆ Cloroformo HPLC Marca Baker
- ◆ Agua HPLC Milli-Q Waters system

Equipo

- Centrífuga IEC Clinical
- Agitador horizontal
- Balanza analítica Mettler Toledo
- Potenciómetro Corning
- Cromatógrafo de líquidos Waters consistente en:
  - Bomba Waters<sup>TM</sup> 616
  - Automuestreador Waters<sup>TM</sup>717
  - Detector Arreglo de diodos<sup>TM</sup> 996
  - Controlador Waters<sup>TM</sup> 600
  - Software Empower
- Columna Symmetry de 4.5 x 150 mm de longitud con tamaño de partícula interna 5 µm. Marca Waters.

## 7.1.2 Preparación de Estándares y soluciones

### **Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.01 M pH 3.0**

Pesar con exactitud 1.367 g de fosfato monobásico de potasio, transferirlo cuantitativamente a un vaso de precipitados de 1000 mL, agregar al vaso aproximadamente 800 mL de agua desionizada, agitar vigorosamente para solubilizar el fosfato, posteriormente ajustar el pH con la solución de ácido fosfórico al 10% v/v, finalmente transferir la solución a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar a la marca de aforo con agua.

### **Solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 0.1 M pH 2.5**

Pesar con exactitud 13.67 g de fosfato monobásico de potasio, transferirlo cuantitativamente a un vaso de precipitados de 1000 mL, agregar al vaso aproximadamente 800 mL de agua desionizada, agitar vigorosamente para solubilizar el fosfato, posteriormente ajustar el pH con la solución de ácido fosfórico al 10% v/v, finalmente transferir la solución a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar a la marca de aforo con agua.

### **Hidróxido de sodio 0.4 N**

Pesar 4g de Hidróxido de sodio en un vaso de precipitados, disolver con agua desionizada, transferir lo anterior a un matraz volumétrico de 250 mL y llevar al volumen de aforo con agua desionizada.

### **Solución estándar de HCQ [200 µg/mL]**

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

### 7.1.3 Preparación de la curva de calibración del sistema

#### **Solución stock de HCQ [2.0 µg/mL]**

Tomar con una micropipeta 1 mL de la solución de HCQ de 200 µg/mL y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 mL, disolverlo en buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1 M) y llevar a la marca de aforo con el mismo buffer.

#### **Sistema 1 [200 ng/ml]**

De la solución stock de HCQ, tomar con una pipeta volumétrica 1 mL, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1M).

#### **Sistema 2 [400 ng/mL]**

De la solución stock de HCQ, tomar con una pipeta volumétrica 2 mL, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1M).

#### **Sistema 3 [600 ng/mL]**

De la solución stock de HCQ, tomar con una pipeta volumétrica 3 mL, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1M).

#### **Sistema 4 [800 ng/mL]**

De la solución stock de HCQ, tomar con una pipeta volumétrica 4 mL, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1M).

#### **Sistema 5 [1000 ng/mL]**

De la solución stock de HCQ, tomar con una pipeta volumétrica 5 mL, transferirlo a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a la marca de aforo con buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1M).

#### **7.1.4 Preparación de la curva de calibración del método**

##### **Solución stock de HCQ [2.4 µg/mL]**

Con una micropipeta, tomar 1.2 mL de la solución de HCQ de 200 µg/mL y transferirlo a un matraz volumétrico de 100 mL, disolverlo en buffer de fosfatos pH 2.5 (0.1 M) y llevar a la marca de aforo con el mismo buffer.

##### **Preparación de la curva de calibración en sangre**

##### **Concentración 1 [200 ng/mL]**

Tomar con una micropipeta 0.25 mL de la solución stock de HCQ, depositar en un tubo de vidrio de 10 mL y adicionar 2.75 mL de sangre, tapar el tubo y agitar para homogeneizar la solución.

##### **Concentración 2 [400 ng/mL]**

Tomar con una micropipeta 0.50 mL de la solución stock de HCQ, depositar en un tubo de vidrio de 10 mL y adicionar 2.50 mL de sangre, tapar el tubo y agitar para homogeneizar la solución.

##### **Concentración 3 [600 ng/mL]**

Tomar con una micropipeta 0.75 mL de la solución stock de HCQ, depositar en un tubo de vidrio de 10 mL y adicionar 2.25 mL de sangre, tapar el tubo y agitar para homogeneizar la solución.

##### **Concentración 4 [800 ng/mL]**

Tomar con una micropipeta 1.0 mL de la solución stock de HCQ, depositar en un tubo de vidrio de 10 mL y adicionar 2.0 mL de sangre, tapar el tubo y agitar para homogeneizar la solución.

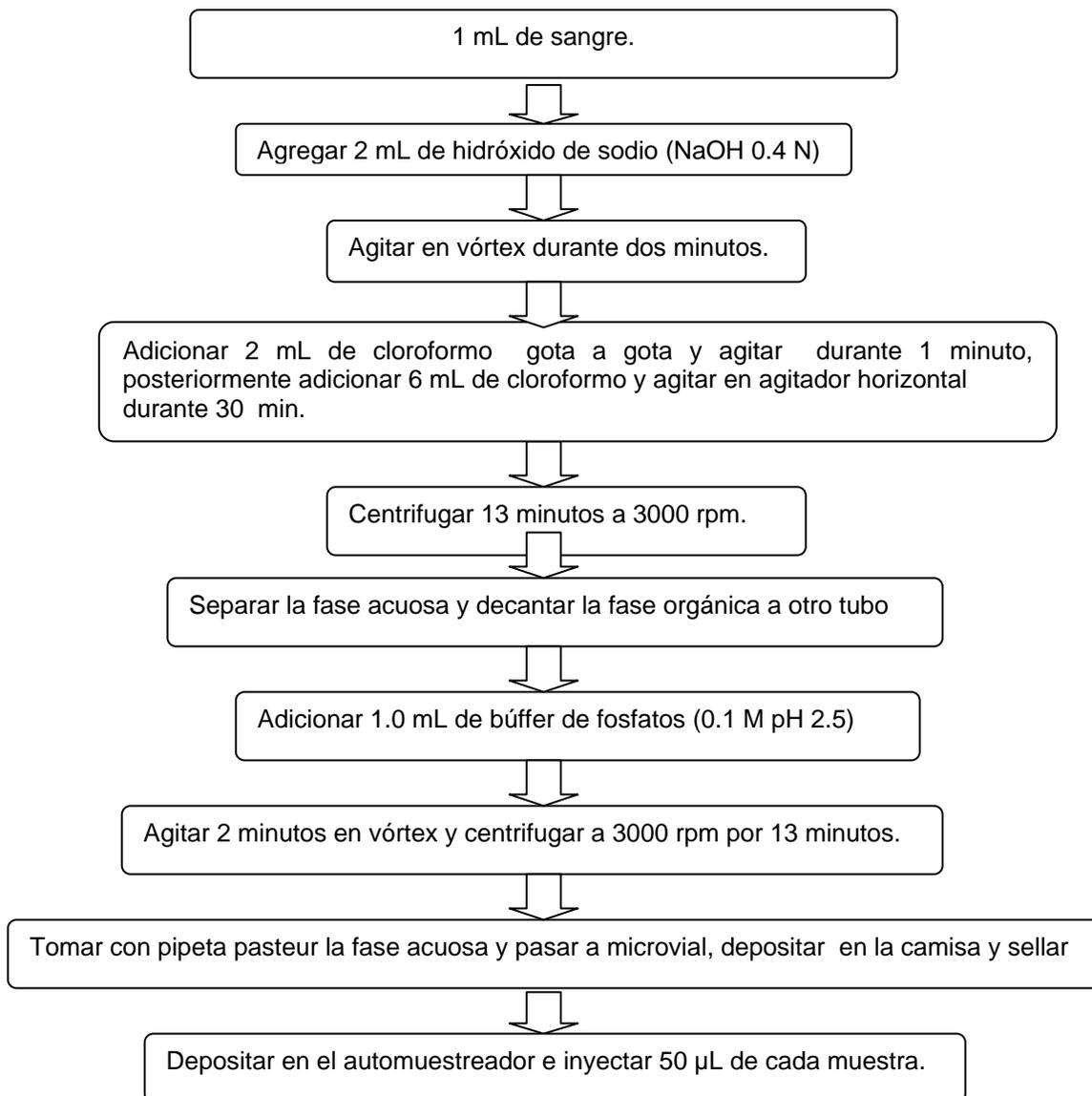
##### **Concentración 5 [1000 ng/mL]:**

Tomar con una micropipeta 1.25 mL de la solución stock de HCQ, depositar en un tubo de vidrio de 10 mL y adicionar 1.75 mL de sangre, tapar el tubo y agitar para homogeneizar la solución.

## 7.1.5 Preparación de la muestra

### 7.1.5.1 Método de extracción de hidroxiclороquina en sangre

El método de extracción empleado para la cuantificación de las muestras sanguíneas fue el siguiente:

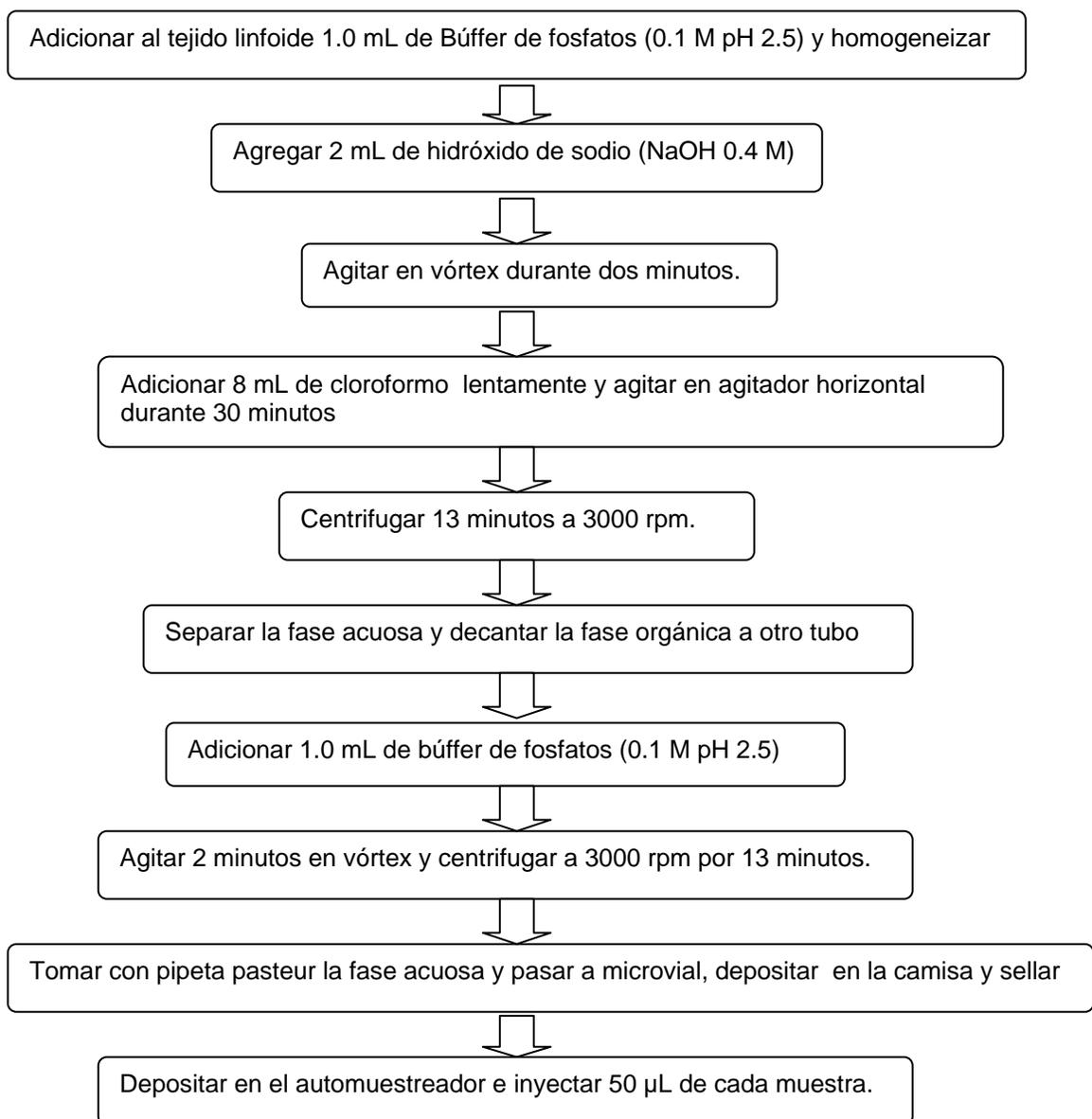


El proceso tiene como paso crítico la decantación de la fase orgánica al retirar la fase acuosa, ya que en el tubo permanecen proteínas inherentes a la sangre que deben ser retiradas para evitar su interferencia con la extracción.

### 7.1.5.2 Método de extracción de hidroxiclороquina en tejido linfoide

Para el procesamiento de muestras de tejido linfoide se requiere homogeneizar la muestra con buffer de fosfatos pH 2.5 y se lleva a cabo el tratamiento que se le da a las muestras sanguíneas, también se decanta la fase orgánica para evitar la interferencia de las proteínas.

El método de extracción empleado para muestras de tejido linfoide fue el siguiente:



### 7.1.5.3 Condiciones cromatográficas

Columna: C<sub>18</sub> Symmetry 4.9 x 150 mm

Fase móvil: Búffer de fosfatos pH 3.0 [0.01M ] : Acetonitrilo 86:14

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min

Volumen de inyección: 50 µL

Longitud de onda: 342.8 nm

## 7.1.6 Validación del método analítico para la cuantificación de HCQ en muestras sanguíneas

### 7.1.6.1 Linealidad del sistema

A partir de una solución stock de 2.0 mcg/mL. se prepararon tres curvas patrón independientes de HCQ a las siguientes concentraciones 200, 400, 600, 800 y 1000 ng/mL,

### 7.1.6.2 Linealidad del método

Se prepararon tres curvas de calibración independientes, de HCQ en sangre, a las concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ng/mL.

### 7.1.6.3 Precisión y Exactitud

Se prepararon soluciones de HCQ a 3 diferentes niveles de concentración por sextuplicado, las cuales fueron de 200,400 y 800 ng/mL.

### 7.1.6.4 Límite de cuantificación y detección (García, A., 2002).

A partir de la curva de calibración del método, se miden las respuestas analíticas. Se calcula el valor de la pendiente ( $b_1$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la desviación estándar del intercepto ( $S_{b0}$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(b_1)$ ). El límite de cuantificación se calcula con la siguiente ecuación.

$$LC = \frac{10 \times S_{b0}}{b_1}$$

y el límite de detección con la ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times S_{b0}}{b_1}$$

## 7.2 Estudio de biodistribución de hidroxiclороquina en conejo

El estudio se llevó a cabo en 18 conejos Nueva Zelanda, con un peso aproximado de 2.4 Kg y un rango de edad de 2 a 3 meses. A cada uno de ellos se les administró una dosis de 15 mg/Kg de hidroxiclороquina por vía subcutánea. Se tomaron muestras de sangre y de los siguientes tejidos: poplíteo, submandibular, preescapular, bazo, femoral y placas de Peyer.

Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 10, 20, 30, 60, 120, 180, 360, 480 y 840 minutos.

Las muestras se mantuvieron en refrigeración, hasta su análisis utilizando el método por CLAR previamente descrito.

### **Análisis estadístico de los datos**

Para evaluar el comportamiento farmacocinético de la HCQ en los diferentes tejidos, se utilizó el programa Win Non Lin versión 4.01

RESULTADOS

Y

ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

---

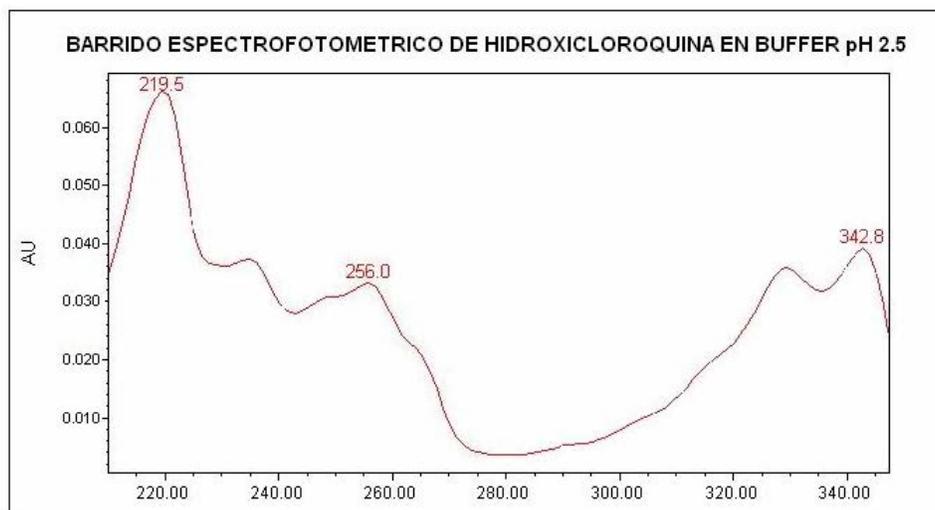
## 8 Resultados y discusión

### 8.1 Método analítico para la cuantificación de hidroxyclorequina en sangre total.

Los resultados obtenidos de la validación del método analítico para demostrar su confiabilidad fueron los siguientes:

#### 8.1.1. Especificidad.

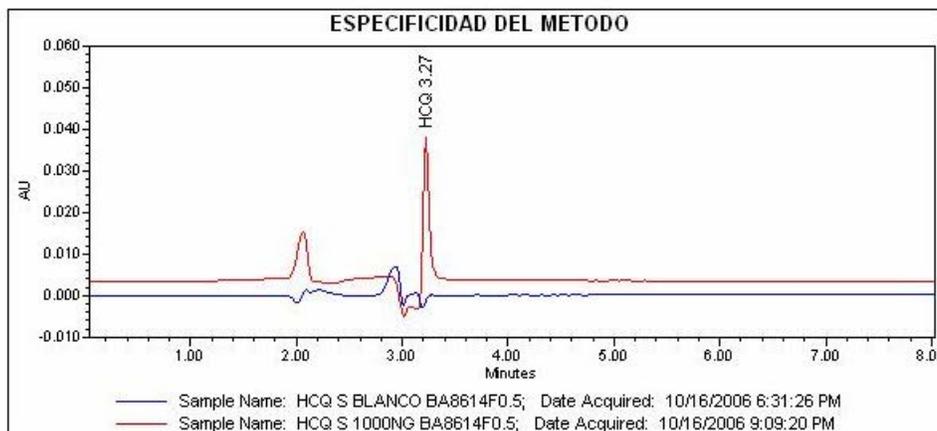
En la figura 7 se muestra el espectro de absorción de la Hidroxyclorequina en solución amortiguadora de fosfatos pH 2.5. En ella se observa que presenta tres máximos. Para realizar el análisis, se eligió la longitud de onda de 342.8 nm ya que a esta longitud de onda existen menos interferencias de los componentes endógenos (ver anexo).



**Figura 7. Espectro de absorción de HCQ en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 2.5**

En la figura 8 se presentan los resultados obtenidos al inyectar un blanco de sangre empleando el procedimiento de extracción, así como el de un blanco de sangre adicionado de hidroxyclorequina a una concentración de 1000 ng/mL.

Se puede observar que al tiempo de retención de la Hidroxicloroquina no existe ninguna otra respuesta, lo que demuestra la especificidad del método analítico.



**Figura 8. Especificidad del método analítico para la cuantificación de HCQ**

### 8.1. 2. Linealidad del sistema.

En la tabla 1 se presentan los valores de respuestas al inyectar HCQ en el rango de concentración de 200 a 1000 ng/mL, mientras que en la figura 9 se presenta la gráfica correspondiente

TABLA 1. Linealidad del sistema para la cuantificación de hidroxicloroquina

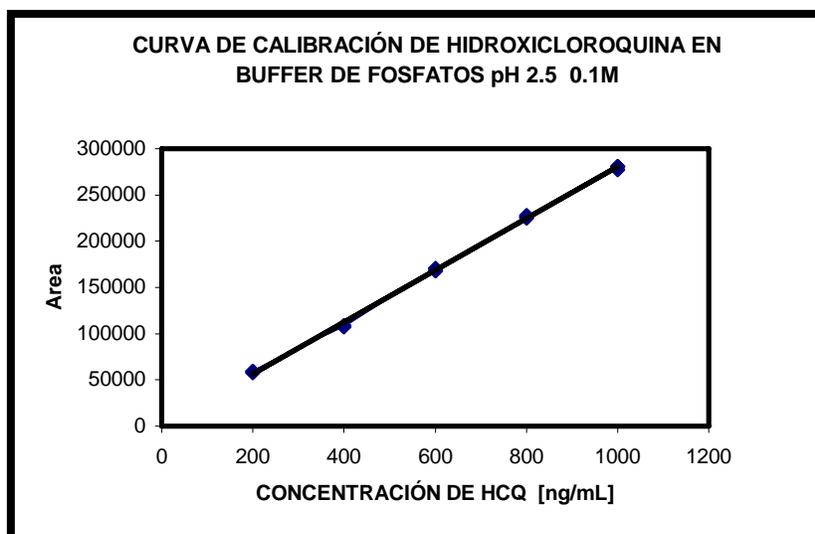
CONCENTRACIÓN ng/ML	RESPUESTA ANALÍTICA		
	Área		
200	55693	55351	55959
400	108500	107274	107922
600	170823	169722	167831
800	226628	227637	225110
1000	280731	277156	280540

En la tabla 2 se presenta la ecuación del análisis de regresión y los parámetros estadísticos obtenidos:

TABLA 2. Parámetros de la linealidad del sistema para la cuantificación de HCQ

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN.	CURVA
Coeficiente de correlación (r)	0.9996
Coeficiente de determinación( $r^2$ )	0.9992
Coeficiente de variación (C.V.)	1.86

$$\text{Respuesta analítica} = 283.9 \text{concentración} - 2060.9$$



**FIGURA 9. Linealidad del sistema para la cuantificación de HCQ**

Dado que los criterios de aceptación establecidos para métodos cromatográficos indican que el C.V. debe ser menor al 2% y se aprecia que el valor obtenido (1.86) es menor al establecido se concluye que el método es lineal en el rango establecido.

### 8.1.3. Linealidad del Método.

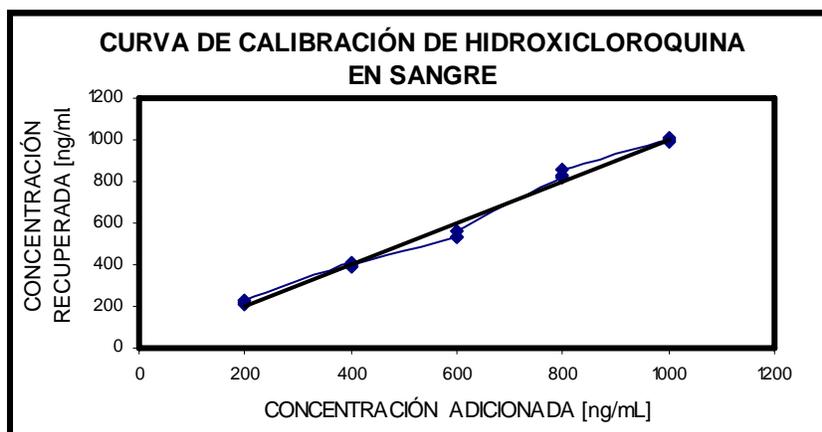
En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de la concentración adicionada en el rango de 200 – 1000 ng/mL, así como la concentración recuperada correspondiente.

TABLA 3. Linealidad del método para la cuantificación de hidroxycloroquina en sangre total

Concentración adicionada [ng/mL]	Concentración recuperada [ng/mL]			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
200	218,62	212,51	228,54	219,89
400	407,38	392,22	398,69	399,43
600	536,04	533,81	560,35	543,40
800	821,78	826,55	857,36	835,23
1000	1004,68	993,24	1007,95	1001,96

La ecuación obtenida a partir de la regresión lineal de la concentración adicionada en función de la concentración recuperada es la siguiente:

$$\text{Concentración recuperada} = \text{Concentración adicionada} - 000.2$$



**FIGURA 10. Linealidad del método para la cuantificación de HCQ**

Los parámetros estadísticos obtenidos a partir de un análisis de regresión se muestran en la tabla 4.

**TABLA 4. Parámetros de la linealidad del método**

<b>PARÁMETROS ESTADÍSTICOS DE LA REGRESIÓN.</b>	<b>CURVA</b>
Coeficiente de correlación (r)	0.9934
Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	0.987
Coeficiente de variación (CV.)	6.98
Pendiente	1.004
Intercepto	-3.48
Intervalo de confianza pendiente	0.931 – 1.069
Intervalo de confianza intercepto	-46.006 – 46.006

#### 8.1.4. Precisión y exactitud del método

En la tabla 5 se presentan los resultados de precisión y la exactitud del método analítico. En ella se puede observar que el coeficiente de variación no excede el 15% en ninguna de las concentraciones.

Tabla 5. Exactitud y precisión del método para cuantificar HCQ en sangre

Replica	Concentración Adicionada [ng/mL]		
	200	400	800
1	202.680	371.365	792.255
2	231.495	454.574	821.777
3	215.684	425.006	776.094
4	214.203	407.376	826.551
5	247.435	392.222	857.360
6	233.404	398.685	785.434
Desviación estándar	16.207	28.762	30.736
Promedio	224.150	408.205	809.912
CV (%)	7.230	7.046	3.795
Desviación absoluta	12.08	2.05	1.24

### 8.1.5 Límite de cuantificación

De la curva de calibración del método (figura 10), se determinaron los siguientes parámetros estadísticos y se aplicó la ecuación de la página 31 para determinar el límite de cuantificación y detección, obteniéndose lo siguiente:

$$r^2 = 0.987$$

$$m = 1.004$$

$$b = -3.48$$

$$S_{b0} = 12.873$$

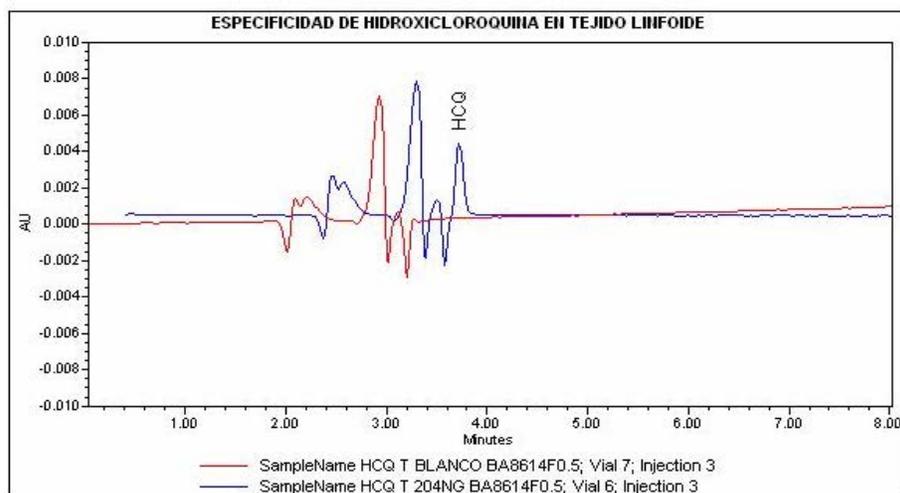
$$LC = (10 \times 12.87) / 1.004 = 128.73 \text{ ng/mL}$$

$$LD = (3.3 \times 12.87) / 1.004 = 42.48 \text{ ng/mL}$$

### 8.1.6. Selectividad del método para la cuantificación en tejidos.

Debido a que en el estudio se precisaba cuantificar HCQ en sangre y tejido linfoide, se realizaron pruebas para determinar si algún componente inherente al tejido provoca alguna modificación en su respuesta.

En la figura 11 se presentan los cromatogramas resultantes de un blanco de tejido linfóide, así como de un blanco adicionado de hidroxiclорокина, los cuales fueron procesados de acuerdo al método descrito en la sección 7.1.5.2. Como se puede observar, no se detecta ningún pico que interfiera con el tiempo de retención del analito, lo cual indica que el método puede aplicarse para cuantificar el fármaco en sangre así como en los diferentes tejidos.



**Figura 11. Cromatograma de tejido blanco y tejido con HCQ.**

## 8.2 ESTUDIO DE BIODISTRIBUCIÓN DE HIDROXICLOROQUINA EN TEJIDO LINFOIDE.

### 8.2.1 Farmacocinética de hidroxiclорокина en sangre

En la tabla 7 se presentan los resultados promedio de Concentración sanguínea de hidroxiclорокина a los diferentes tiempos de muestreo, después de la administración de una dosis de 15 mg/kg por vía intramuscular a conejos, mientras que la gráfica correspondiente se presenta en la figura 12.

Tabla 6. Concentración de hidroxiclорокина a los diferentes tiempos de muestreo.

Tiempo (min.)	Concentración de HCQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]
10	1,637( $\pm 0.0678$ )
20	2,348 ( $\pm 0.2408$ )
30	4,767 ( $\pm 0.583$ )
60	3,188 ( $\pm 0.1492$ )
120	1,574 ( $\pm 0.1357$ )
180	1,160 ( $\pm 0.1285$ )
360	0,752 ( $\pm 0.0286$ )
480	0,922 ( $\pm 0.2258$ )
840	0,633 ( $\pm 0.0888$ )

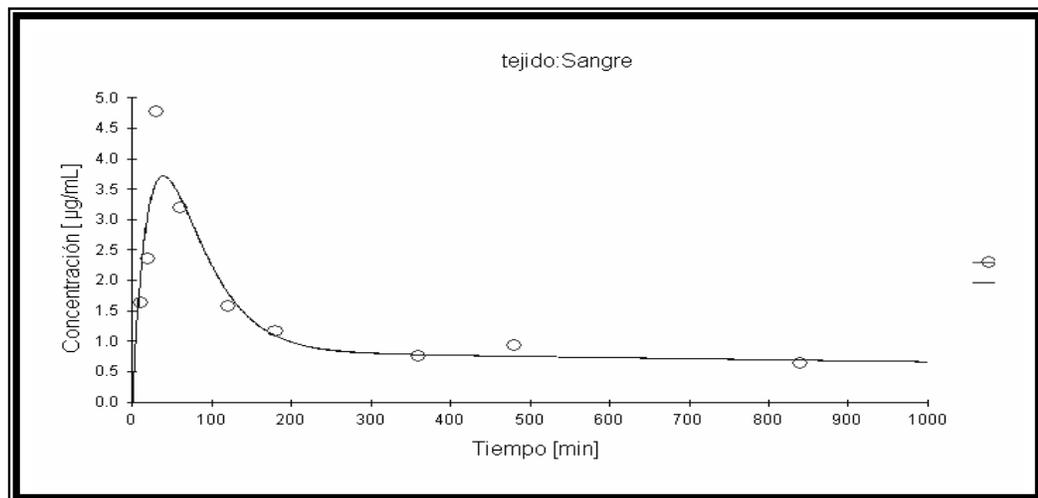


Figura 12. Representación gráfica de la Concentración de HCQ en sangre en función del tiempo.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos al utilizar programa Win Nonlin, y un modelo no compartimental, se muestran en la tabla 8:

Tejido	C <sub>máx.</sub> ( $\mu\text{g}$ )	T <sub>máx.</sub> (min)	K ( $\text{min}^{-1}$ )	V <sub>F</sub> (mL)	Cl ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ )	T <sub>1/2</sub> (min)
sangre	4.498	30	0.0011	9.4774	0.0103	637.21

Tabla 7. Parámetros Farmacocinéticos de HCQ

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados en un estudio previo en plasma, se encontró que los niveles de hidroxiclороquina en sangre son mucho mayores a los de plasma (Sharyon, 1988), lo cual indica que la Hidroxiclороquina tiene una alta afinidad por el paquete globular.

### 8.2.2 Biodistribución de HCQ en Tejidos Linfoides.

En la tabla 9 se presentan los resultados de cantidad de HCQ (en  $\mu\text{g}$  /gramo de tejido) en los diferentes tejidos linfoides, mientras que el perfil de biodistribución se presenta en la figura 13.

Tabla 8. Cantidad de HCQ [ $\mu\text{g/g}$ ] en función del tiempo después de la administración de una dosis de 15 mg/K a conejos.

Tiempo (min.)	POPLITEO	SUBMAND	FEMORAL	PREESCAPULAR	BAZO	PLACAS PEYER
	$\mu\text{g HCQ / g tejido}$					
10	29.178	15.242	8.312	---	30.674	36.977
20	21.915	57.501	43.237	113.917	58.198	361.255
30	10.397	8.142	6.177	21.224	61.743	10.970
60	8.324	16.409	11.042	16.599	39.173	10.787
120	12.705	17.184	9.780	11.023	50.853	17.054
180	10.184	14.891	8.854	4.706	11.557	11.444
360	5.028	14.238	3.053	4.222	39.402	9.927
480	6.874	7.601	6.464	3.184	38.936	8.626
840	9.217	4.695	----	7.870	46.002	5.888

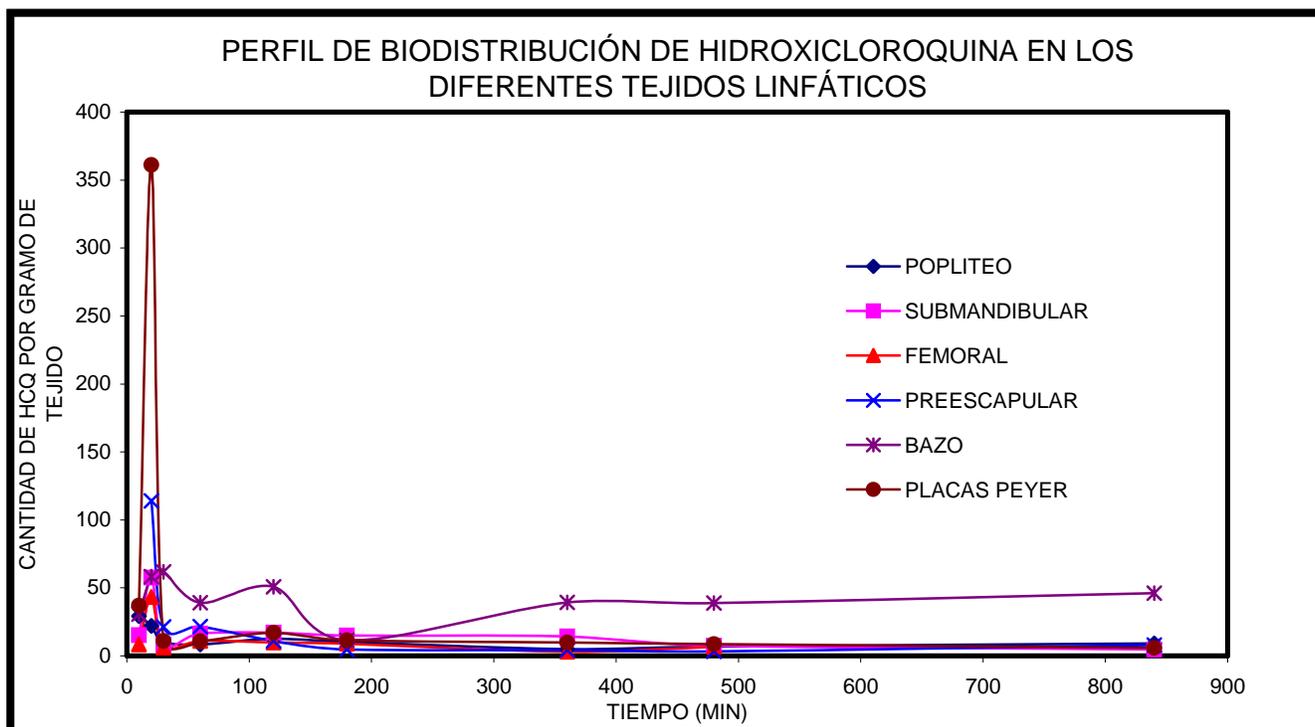


Figura 13. Gráfico del perfil de biodistribución de HCQ en los diferentes tejidos linfáticos.

De los datos de la tabla 9, y la figura 13, se puede observar, que la distribución de la HCQ es muy rápida. En cinco de los seis tejidos estudiados, la concentración máxima se alcanza a los 20 minutos, mientras que en el bazo se alcanza a los 30 minutos. Los niveles de concentración más altos, se encontraron en tejido preescapular y en las placas de peyer.

En la figura 13 se observa que aún cuando el tejido en el que alcanza más rápidamente la concentración sanguínea máxima es el poplíteo, las concentraciones en tejidos, como el submandibular, el femoral, el preescapular y las placas de Peyer, son mayores, lo cual indica que existe una mayor afinidad hacia estos últimos.

En la figura 14 se observa el perfil de biodistribución de la HCQ en el bazo. En ella se puede observar que a diferencia de los otros órganos, se presenta una tendencia a mantener los niveles de concentración por un período más prolongado de tiempo. Dicho efecto puede deberse a que el bazo funciona como un órgano de almacenamiento de sangre (Ross, 2005), lo que hace que exista un equilibrio y por lo tanto se mantengan los niveles del fármaco

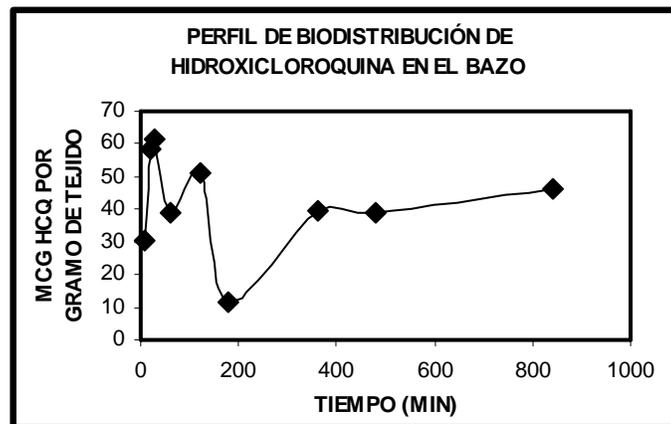
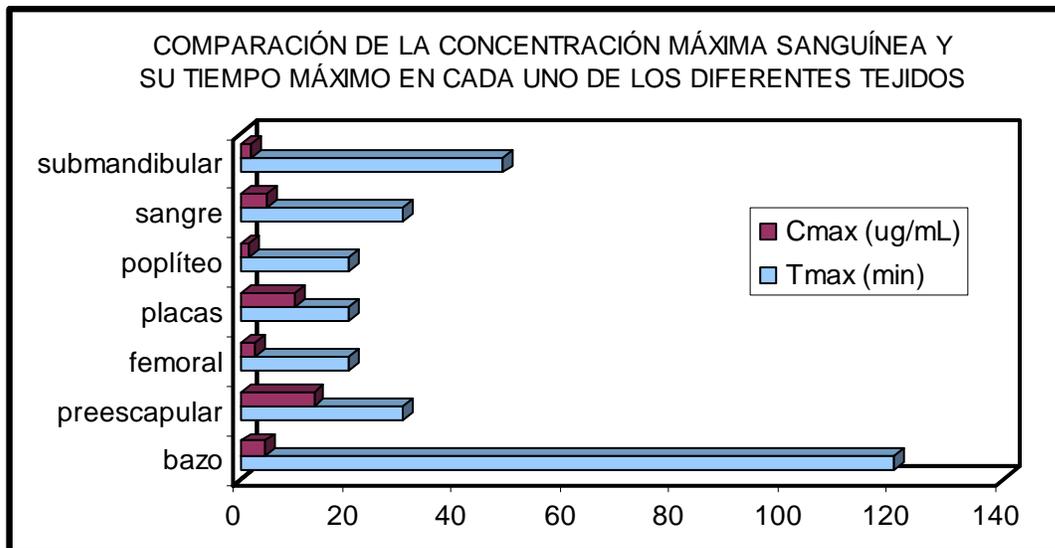


Figura 14. Gráfico del perfil de biodistribución de HCQ en el Bazo.

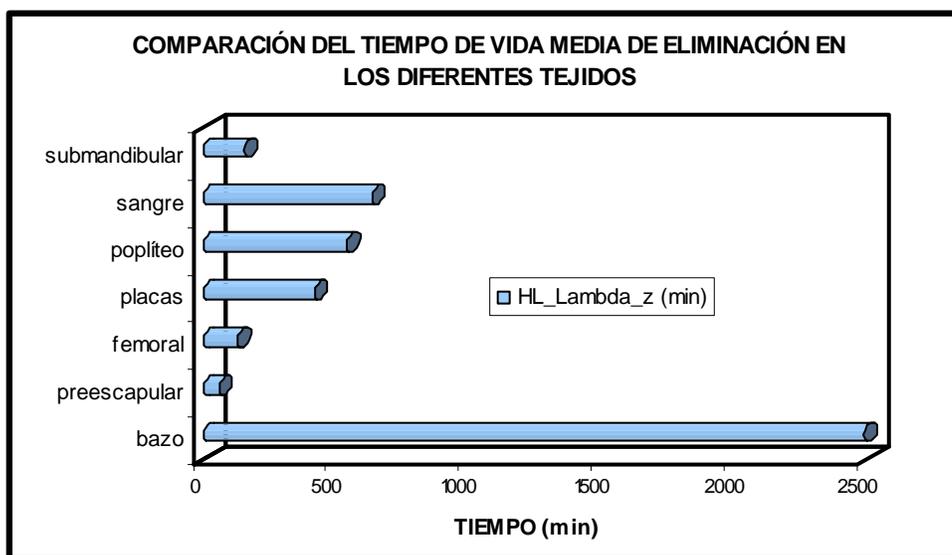
De los datos de la tabla 10, y en la figura 15 se observa que el orden decreciente en la concentración máxima es: Preescapular, Placas de Peyer, sangre, bazo, femoral, submandibular y poplíteo. (El valor del tiempo del tejido submandibular debe multiplicarse por 10, para tener el valor real, debido a que su tiempo es muy largo y por lo tanto ya no se observarían los valores más pequeños por la escala)



**Figura 15. Gráfico de la C<sub>máx.</sub> y del T<sub>máx.</sub> de HCQ en los diferentes tejidos.**

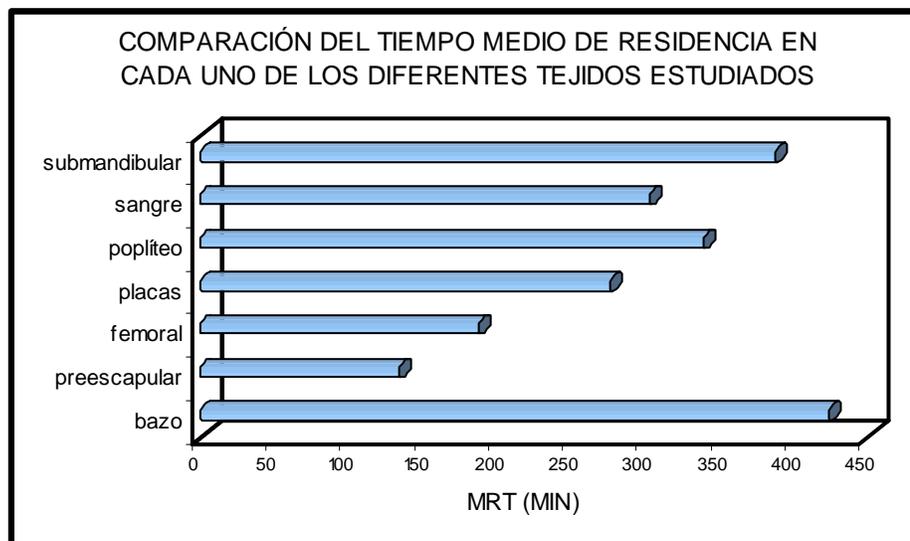
Al analizar los datos de tiempo de vida media, se encontró que el mayor valor de vida media fue en el bazo, lo cual puede deberse a su función como reservorio de sangre.

En tejidos submandibular, preescapular y femoral, la vida media fue más corta, mientras que en placas de Peyer y poplíteo fue semejante que en sangre (Figura 16).



**Figura 16. Gráfico del tiempo de vida media de eliminación de HCQ en los diferentes tejidos.**

Un parámetro farmacocinético más, que puede ser comparable en función de cada tejido, es el Tiempo medio de residencia (TRM), en el gráfico número 17 se observa que, en orden decreciente en el TRM es el siguiente: Bazo, submandibular, poplíteo, sangre, placas de peyer, femoral y brazo.



**Figura 17. Gráfico del tiempo medio de residencia de HCQ en los diferentes tejidos.**

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos de HCQ en los 6 diferentes tejidos linfoides y sangre

Tejido	Coeficiente de correlación ( r )	Lambda_ z (1/min)	HL_Lambda z (min)	Tmax (min)	Cmax (µg/mL)	AUClast (min*µg/mL)	AUCINF obs (min*µg/mL)	Vz_F_obs (mL)	Cl_F_obs (mL/min)	MRTlast (min)	MRTINF_obs (min)
bazo	0.054	0.0003	2490.109	120	4.598	2185.665	12812.184	8411.839	2.342	423.174	3748.511
preescapular	0.847	0.0115	60.373	30	13.515	1234.065	1250.614	2089.361	23.988	133.999	144.494
femoral	0.994	0.0053	129.955	20	2.591	140.310	195.431	28780.333	153.507	187.523	322.895
placas	0.906	0.0017	418.759	20	9.880	453.175	572.795	31641.787	52.375	275.361	519.444
popliteo	0.723	0.0013	542.805	20	1.628	316.630	513.972	45708.842	58.369	339.173	832.143
sangre	0.753	0.0011	637.724	30	4.767	960.310	1542.697	17891.566	19.447	303.050	853.082
submandibular	0.912	0.0045	154.883	480	1.935	972.850	1026.254	6531.986	29.233	387.004	422.205

Lambda z): Constante de eliminación

Cmáx: Concentración máxima

AUC: Área Bajo la Curva

HL\_ Lambda: tiempo de vida media

Tmáx: Tiempo en el cual se alcanza la máxima concentración

MRT: Tiempo medio de residencia

### 8.2.3. Comparación de niveles de Hidroxicloroquina en sangre y tejido linfoide

En la tabla 11 se muestran los resultados de la comparación de los niveles de HCQ encontrados en sangre y en tejido linfoide, a los diferentes tiempos de muestreo. En ella se puede observar que la HCQ tiene mayor afinidad por el tejido linfoide que por la sangre periférica, en específico por las placas de peyer en la cual llega a concentraciones muy elevadas ya que la relación existente es mas del 160 %, el tejido siguiente en el cual existe mayor afinidad es el bazo, el tercer tejido es el preescapular, el cual presenta una relación mayor del 50 % y por ultimo el submandibular, el femoral y el poplíteo.

Tabla 10. Relación de los niveles encontrados de HCQ en los diferentes tejidos en

Relación sangre-tejido							
Tiempo (min)	POPLITEO mcg HCQ/g tejido	SUBMAND mcg HCQ/g tejido	FEMORAL mcg HCQ/g tejido	PREESCAPULAR mcg HCQ/g tejido	BAZO mcg HCQ/g tejido	PLACAS PEYER mcg HCQ/g tejido	Sangre mcg HCQ/g sangre
10	18.90	9.87	5.38	----	19.87	23.95	1
20	9.89	<b>25.96</b>	<b>19.52</b>	<b>51.44</b>	26.28	<b>163.11</b>	1
30	2.31	1.81	1.37	4.72	13.73	2.44	1
60	2.77	5.46	3.67	7.15	13.02	3.59	1
120	8.55	11.57	6.59	7.42	34.24	11.48	1
180	<b>9.30</b>	13.61	8.09	4.30	10.56	10.46	1
360	7.09	20.07	4.30	5.95	55.53	13.99	1
480	7.90	8.74	7.43	3.66	44.77	9.92	1
840	15.44	7.87	----	13.19	<b>77.09</b>	9.87	1

Grace y Colaboradores (1996) llevaron a cabo un estudio *in vitro* utilizando células T y células monocíticas, en el cual se demostró que la hidroxiclороquina presenta actividad antiretroviral en células infectadas crónicamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que “*in vivo*” el fármaco tiene una alta afinidad por el tejido linfoide, el cual es sitio blanco de las infecciones. El fármaco llega rápidamente a las placas de Peyer, lo cual es importante ya que la absorción de los antígenos proteínicos, en particular de proteínas bacterianas y virales se lleva a cabo en dichas placas. Así mismo su vida media en bazo es larga. Dado que en este órgano existen células T y B que llevan a cabo funciones inmunitarias, así como macrófagos que destruyen los microbios patógenos provenientes de la sangre por fagocitosis, la mayor residencia del fármaco en bazo permitiría una mayor protección contra el virus. La información obtenida en el presente trabajo indica que la HCQ podría presentar una alternativa para el tratamiento del VIH en combinación con otros fármacos.

# CONCLUSIONES

---

---

## CONCLUSIONES

El método analítico para la cuantificación de HCQ en sangre fue lineal, preciso y exacto en el rango de concentración de 200 a 1000 ng/mL

Al administrar la Hidroxicloroquina por vía subcutánea en conejos, el fármaco se absorbe y distribuye rápidamente alcanzando la concentración máxima en sangre a los 30 minutos.

El fármaco se elimina lentamente con una vida media de 24 horas.

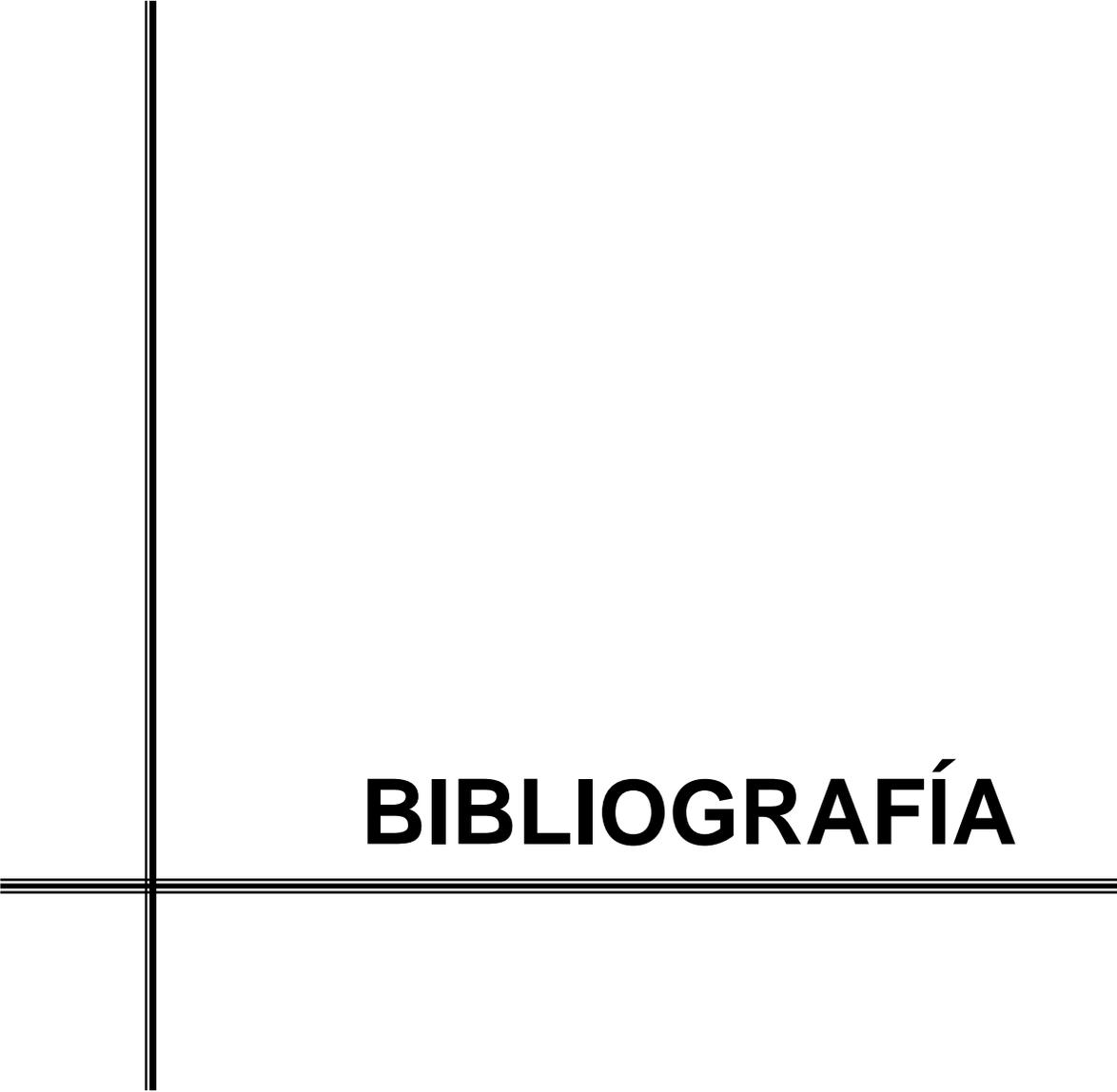
La Hidroxicloroquina se distribuye ampliamente en el tejido linfoide, como: Submandibular [57.5 µg/g], preescapular [113.9 µg/g], bazo [61.7 µg/g], placas de Peyer [361.2 µg/g], femoral [43.27 µg/g] y poplíteo [29.1 µg/g].

La Hidroxicloroquina presenta una mayor afinidad por el tejido linfoide como es: submandibular, preescapular, bazo, placas de Peyer, femoral y poplíteo, que por sangre.

Su amplia biodistribución aunado a su actividad inmunosupresora, lo hace un buen candidato para el tratamiento de VIH en combinación con otros fármacos.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



---

**BIBLIOGRAFIA**

Abbas, A. (2002). Inmunología celular y molecular. Madrid. Mc-Graw Hill Interamericana.

Aiache (1992). Biofarmacia. México. Manual Moderno. 487

Brown, R. R., R. M. Stroshane, et al. (1986). "High-performance liquid chromatographic assay for hydroxychloroquine and three of its major metabolites, desethylhydroxychloroquine, desethylchloroquine and bidesethylchloroquine, in human plasma." J Chromatogr **377**: 454-9.

Carmem, C. D. and P. S. Bonato (2005). "Enantioselective analysis of the metabolites of hydroxychloroquine and application to an in vitro metabolic study." J Pharm Biomed Anal **37**(4): 703-8.

Clarke (2004). Isolation and Identification of drug. London the pharmaceutical Press. 374-375

Craig. (1997). Modern pharmacology with clinical application. USA. 644.

Croes, K., P. T. McCarthy, et al. (1994). "Simple and rapid HPLC of quinine, hydroxychloroquine, chloroquine, and desethylchloroquine in serum, whole blood, and filter paper-adsorbed dry blood." J Anal Toxicol **18**(5): 255-60.

Diez, D., Fernández, J. (2003). Manual de enfermería. Gráficas mármol. España. 822

Fieger, H., J. Iredale, et al. (1993). "Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of a reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio." Chirality **5**(2): 65-70.

Gallo RC., M. L. (2002). "Prospect for the future." Science **298**: 1730-1731.

Garcia, A. (2002). Métodos Analíticos. Guía de validación. México. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. 123.

Grace, Ch., M. Sassaroli, et al. (1996). "Inhibition of HIV-1 replication by hydroxychloroquine: mechanism of action and comparison with zidovudine." Clin Ther **18**(6): 1080-92.

Martindale (2003). Guia completa de consulta fármaco terapéutica. Barcelona España. Pharma.

McLachlan, A. J., S. E. Tett, et al. (1991). "High-performance liquid chromatographic separation of the enantiomers of hydroxychloroquine and its major metabolites in biological fluids using an alpha 1-acid glycoprotein stationary phase." J Chromatogr **570**(1): 119-27.

Neu Josef, (1996). Gastroenterología neonatal. McGraw Hill Interamericana. México. Vol 23 (2): 159 - 274

Parslow, T. (2001). Inmunología básica y clínica. México. El manual moderno. 917

Roitt M, B. J. (2003). Fundamentos de Inmunología. Buenos Aires. Medica panamericana. 423

Ross (2005). Histologia: texto y atlas color con biología celular y molecular. Buenos Aires. Medica panamericana. 817

Sharyon, B. (1988). "Análisis of blood and urine samples for hydroxychloroquine and three major metabolites by high performance liquid chromatography with fluorescence detection." Journal of Chromatography. **433**(1988) 197-206.

Sperber, K., T. H. Kalb, et al. (1993). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by hydroxychloroquine in T cells and monocytes." AIDS Res Hum Retroviruses **9**(1): 91-8.

Sperber, K., M. Louie, et al. (1995). "Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1." Clin Ther **17**(4): 622-36.

Tett, S. E., D. J. Cutler, et al. (1985). "High-performance liquid chromatographic assay for hydroxychloroquine and metabolites in blood and plasma, using a stationary phase of poly(styrene divinylbenzene) and a mobile phase at pH 11, with fluorimetric detection." J Chromatogr **344**: 241-8.

Tortora (2002). Principios de anatomía y fisiología. Mexico. Oxford University. 1172

Williams, S. B. (1988). "Analysis of blood and urine samples for Hydroxychloroquine and three major metabolites by high performance liquid chromatography with fluorescencia detection." Journal of Chromatography **433**: 197-206.

Williams, S. B., L. C. Patchen, et al. (1988). "Analysis of blood and urine samples for hydroxychloroquine and three major metabolites by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection." J Chromatogr **433**: 197-206.

Zheng, C., A. Voutetakis, et al. (2006). "Toxicity and biodistribution of a first-generation recombinant adenoviral vector, in the presence of hydroxychloroquine, following retroductal delivery to a single rat submandibular gland." Oral Dis **12**(2): 137-44.

*Software* ACD/ChemSketch. (1994-1998). Advanced Chemistry Development Inc.

*Software* WinNonLin. Versión 4.1

[http://www.biocab.org/VIH\\_SIDA.html#anchor\\_1005](http://www.biocab.org/VIH_SIDA.html#anchor_1005)

<http://www.globalhealthfacts.org/topic.jsp?i=1>

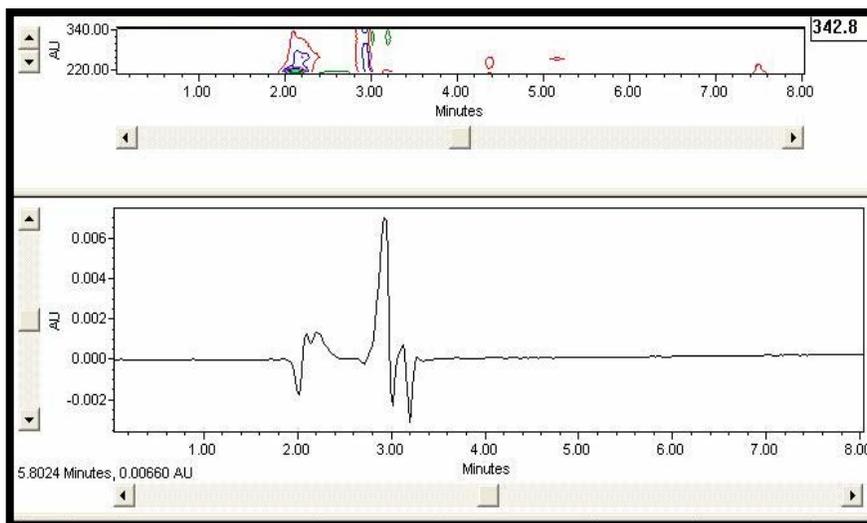
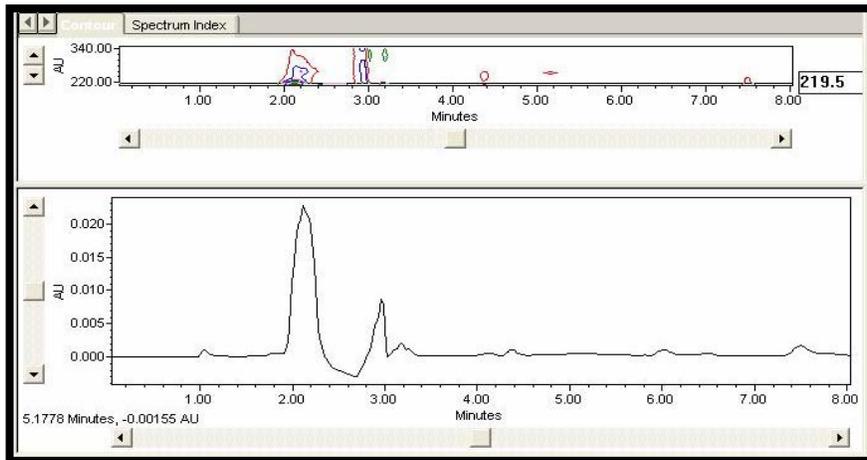
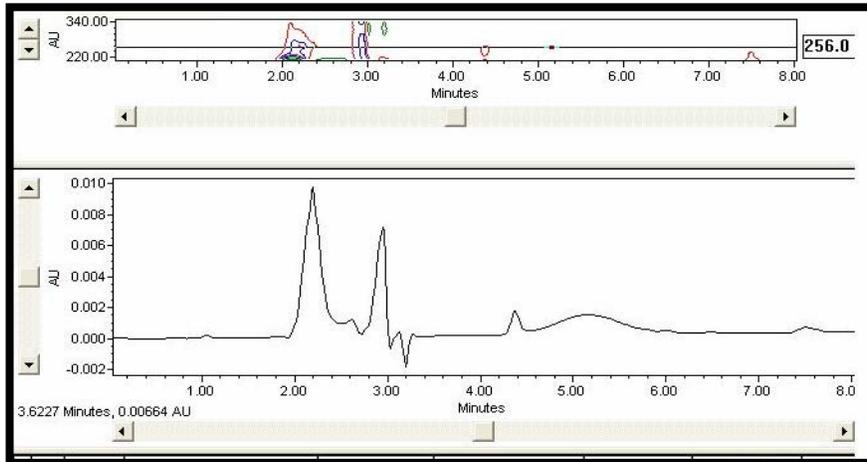
<http://www.sexovida.com,2005>

<http://www.tusalud.com.mx/120005.htm>

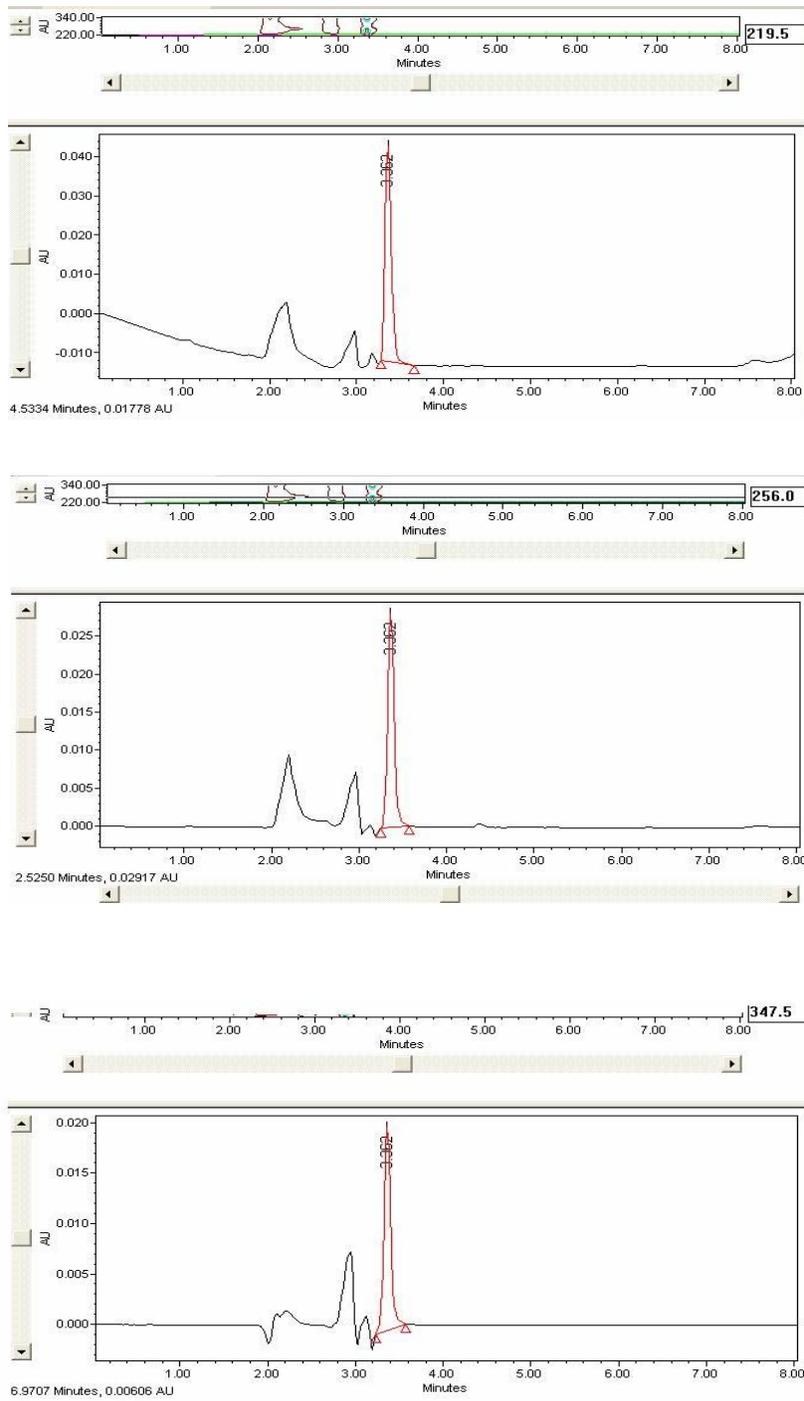
<http://www.salud.gob.mx/conasida/links.htm>

**ANEXOS**

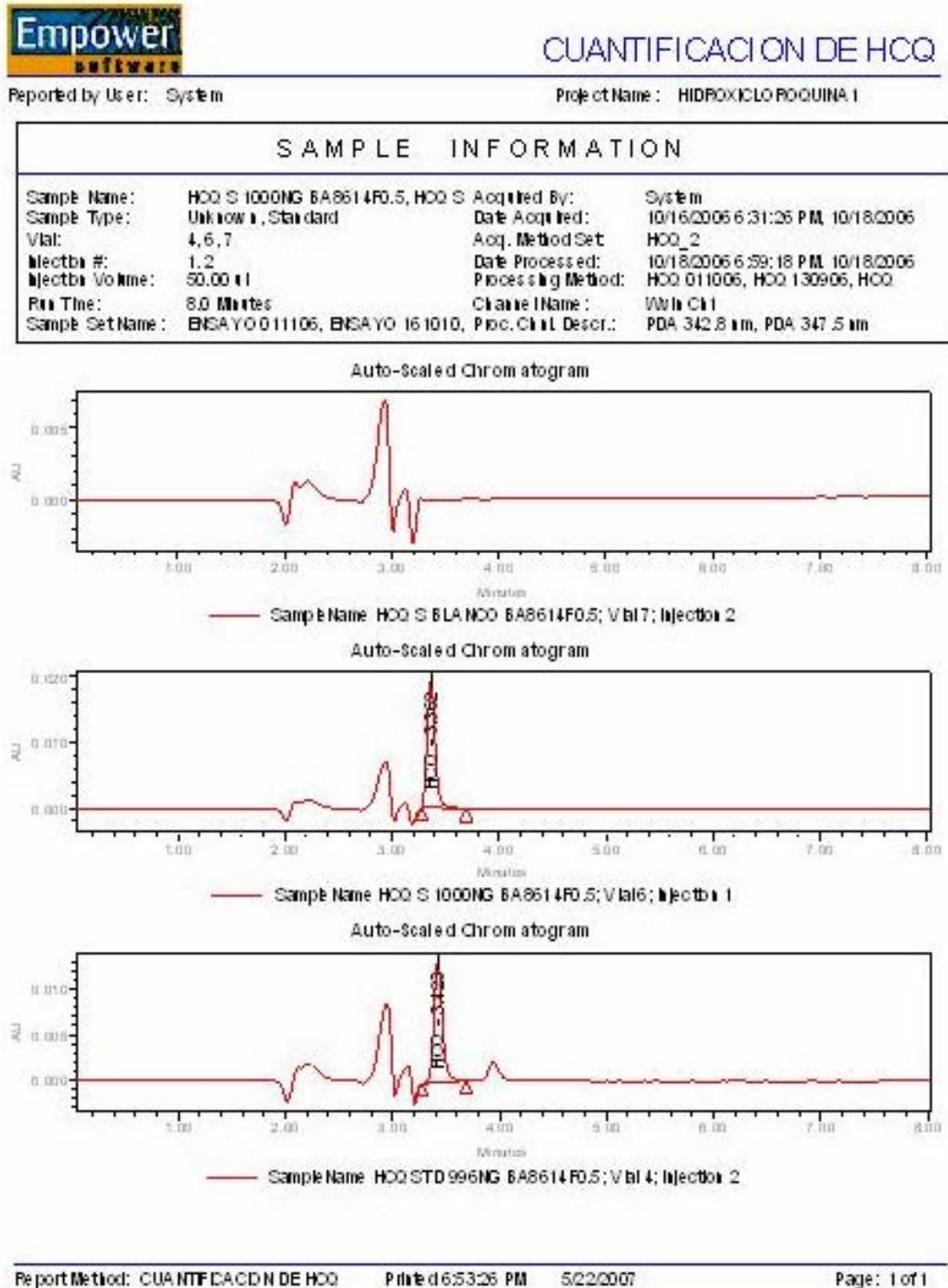
**Selección de la longitud de onda.**



Cromatogramas de Hidroxicloroquina a diferentes longitudes de onda.



**Cromatogramas de sangre blanco, Hidroxicloroquina en sangre e Hidroxicloroquina estándar.**



**Cromatogramas de Hidroxicloroquina en los diferentes tejidos.**



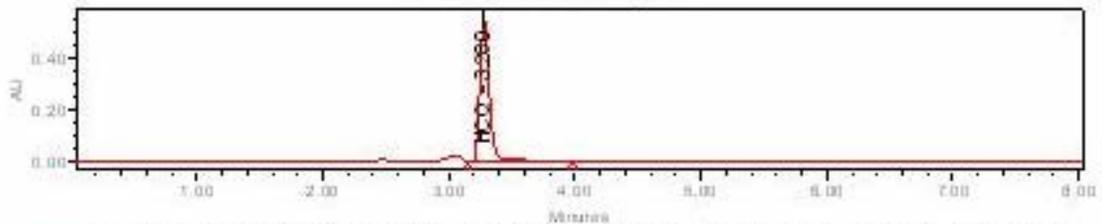
Untitled

Reported by User: System

Project Name: HIDROXICLOROQUINA 1

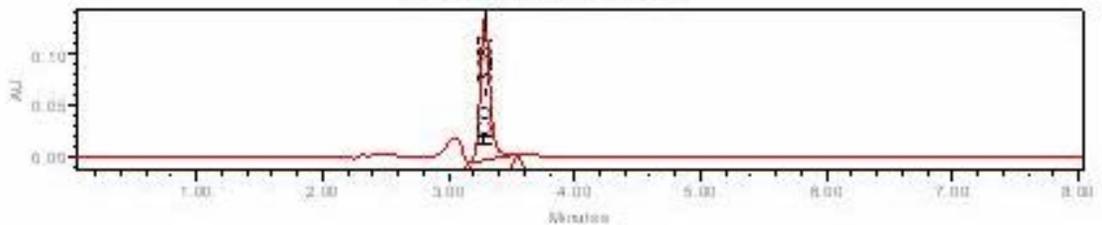
SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	HCO BAZO 20MIN BA8614F0.5,	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	11/22/2006 3:32:46 A.M., 11/22/2006
Vial:	15, 16, 17, 18	Acq. Method Set:	HCO_2
Injecta #:	1, 2, 3	Date Processed:	11/28/2006 6:15:07 P.M., 11/28/2006
Injecta Volume:	50.00 µl	Processing Method:	HCO 221106
Run Time:	8.0 Minutes	Channel Name:	WV1 Ch1
Sample Set Name:	ESTUDIO TEJIDO 211106, ESTUDD	Proc. Chnl Descr.:	PDA 342.8 nm

Auto-Scaled Chromatogram



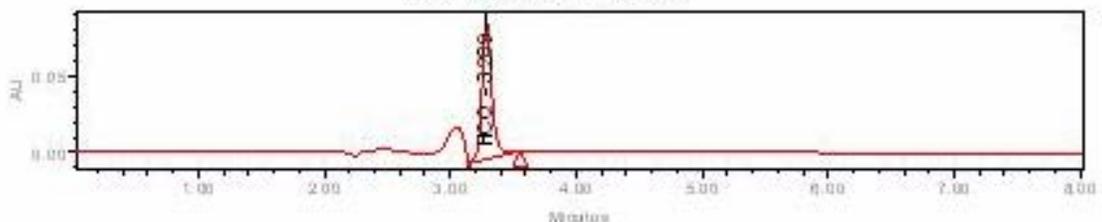
Sample Name: HCO PLACAS 20MIN BA8614F0.4; Vial 15; Injection 2; Channel 1996; Date Acquired: 11/22/2006 3:32:46 A.M.

Auto-Scaled Chromatogram



Sample Name: HCO POLITED 20MIN BA8614F0.4; Vial 16; Injection 3; Channel 1996; Date Acquired: 11/22/2006 4:11:43 A.M.

Auto-Scaled Chromatogram



Sample Name: HCO SUBMUNDO 20MIN BA8614F0.4; Vial 17; Injection 3; Channel 1996; Date Acquired: 11/22/2006 4:42:10 A.M.

### Cromatogramas de Hidroxicloroquina en los diferentes tejidos.

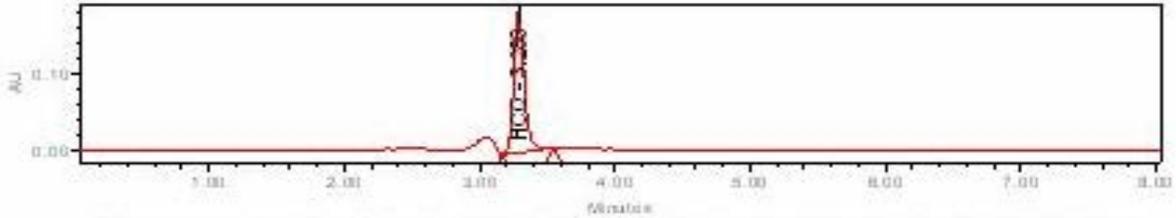


Untitled

Reported by User: System

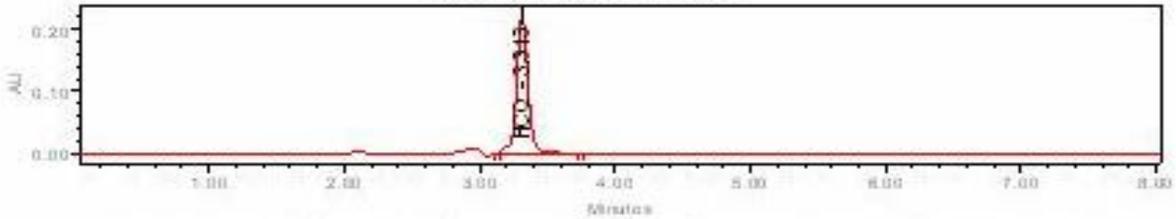
Project Name: HIDROXICLOROQUINA 1

Auto-Scaled Chromatogram



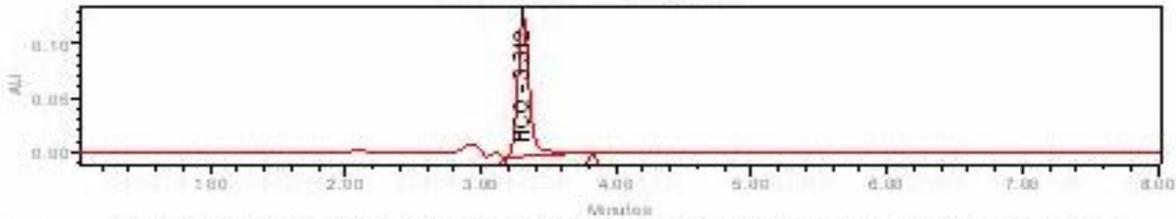
Sample Name HQQ FEMORAL 20MIN BA8614F0.4; Vial 18; Injection 3; Channel 1996; Date Acquired 11/22/2006 5:21:09 AM

Auto-Scaled Chromatogram



Sample Name HQQ BRAZO 20MIN BA8614F0.5; Vial 17; Injection 3; Channel 1996; Date Acquired 11/23/2006 2:50:27 AM

Auto-Scaled Chromatogram



Sample Name HQQ BRAZO 20MIN BA8614F0.5; Vial 18; Injection 1; Channel 1996; Date Acquired 11/23/2006 3:00:39 AM

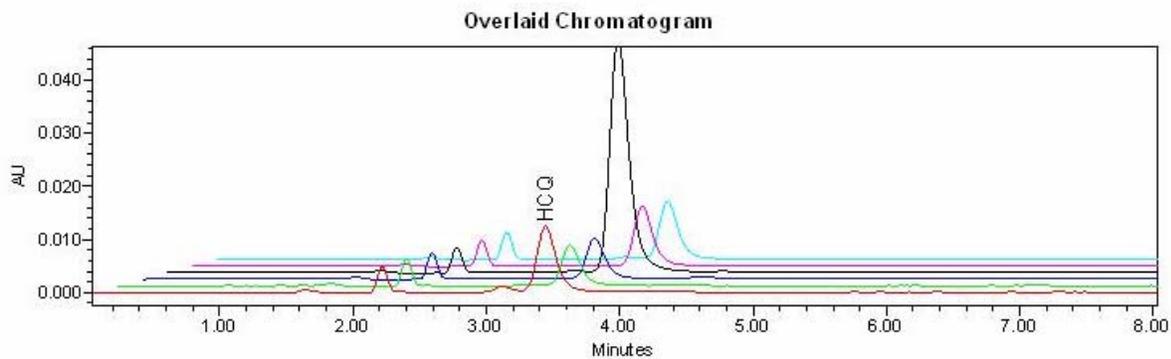
## Cromatogramas de Hidroxicloroquina en los diferentes tejidos.



Untitled

Reported by User: System

Project Name: HIDROXICLOROQUINA1



- SampleName HCQ SUBMAND 120 MIN BA8614 F0.8; Vial23; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/25/2006 10:23:51 PM
- SampleName HCQ FEMORAL 120 MIN BA8614 F0.8; Vial 24; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/25/2006 10:48:06 PM
- SampleName HCQ BRAZO 120 MIN BA8614 F0.8; Vial 25; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/25/2006 11:06:53 PM
- SampleName HCQ BAZO 120 MIN BA8614 F0.8; Vial 26; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/25/2006 11:31:08 PM
- SampleName HCQ FLACAS 120 MIN BA8614 F0.8; Vial 27; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/25/2006 11:49:52 PM
- SampleName HCQ POPLITEO 180 MIN BA8614 F0.8; Vial 28; Injection 1; Channel 996 ; Date Acquired 11/26/2006 12:14:05 AM

**Datos experimentales de hidroxiclороquina en tejido linfoide.**

tiempo (min)	tejido	Area	Conc_rec prom (mcg/mL)	Cant_rec prom (mcg)	peso prom (g)	mcg HCQ/g tejido
10	Popliteo	270831.0	0.934	0.934	0.032	29.178
20	Popliteo	211685.3	0.730	0.730	0.033	21.915
30	Popliteo	65144.0	0.225	0.225	0.022	10.397
60	Popliteo	87704.5	0.428	0.428	0.051	8.324
120	Popliteo	106298.5	0.628	0.628	0.049	12.705
180	Popliteo	89898.0	0.581	0.581	0.057	10.184
360	Popliteo	35000.5	0.279	0.279	0.056	5.028
480	Popliteo	58990.8	0.308	0.308	0.045	6.874
840	Popliteo	26451.5	0.252	0.252	0.027	9.217
10	submandibular	163589.7	0.564	0.564	0.037	15.242
20	submandibular	476192.7	1.642	1.642	0.029	57.501
30	submandibular	63748.0	0.348	0.348	0.043	8.142
60	submandibular	177781.5	0.706	0.706	0.043	16.409
120	submandibular	211469.5	0.977	0.977	0.057	17.184
180	submandibular	145996.5	0.771	0.771	0.052	14.891
360	submandibular	146613.0	0.765	0.765	0.054	14.238
480	submandibular	81620.5	0.426	0.426	0.056	7.601
840	submandibular	45874.5	0.239	0.239	0.051	4.695
10	femoral	93061.0	0.321	0.321	0.039	8.312
20	femoral	482854.7	1.665	1.665	0.039	43.237
30	femoral	62894.0	0.217	0.217	0.035	6.177
60	femoral	37214.0	0.220	0.220	0.020	11.042
120	femoral	78927.8	0.466	0.466	0.048	9.780
180	femoral	54347.0	0.307	0.307	0.035	8.854
360	femoral	18590.0	0.154	0.154	0.051	3.053
480	femoral	39885.0	0.294	0.294	0.046	6.464
840	femoral					
10	brazo					
20	brazo	1242441.7	4.283	4.283	0.038	113.917
30	brazo	209319.3	0.722	0.722	0.034	21.224
60	brazo	211801.5	0.940	0.940	0.044	21.507
120	brazo	74301.5	0.439	0.439	0.040	11.023
180	brazo	31962.0	0.189	0.189	0.040	4.706
360	brazo	35537.5	0.185	0.185	0.044	4.222
480	brazo	39199.0	0.204	0.204	0.064	3.184
840	brazo	36370.5	0.190	0.190	0.024	7.870

**Datos experimentales de hidroxiclороquina en tejido linfoide.**

tiempo (min)	tejido	Area	Conc_rec prom (mcg/mL)	Cant_rec prom (mcg)	peso prom (g)	mcg HCQ/g tejido
10	bazo	304297.0	1.049	1.049	0.034	30.674
20	bazo	793423.3	2.735	2.735	0.047	58.198
30	bazo	591019.0	2.038	2.038	0.033	61.743
60	bazo	262058.5	1.547	1.547	0.040	39.173
120	bazo	440954.0	2.604	2.604	0.051	50.853
180	bazo	125656.0	0.742	0.742	0.064	11.557
360	bazo	376424.0	1.789	1.789	0.045	39.402
480	bazo	469633.3	2.449	2.449	0.063	38.936
840	bazo	636627.0	2.958	2.958	0.064	46.002
10	placas	265997.0	0.917	0.917	0.025	36.977
20	placas	2865960.4	9.880	9.880	0.027	361.255
30	placas	138715.7	0.386	0.386	0.035	10.970
60	placas	83856.5	0.495	0.495	0.046	10.787
120	placas	132717.0	0.784	0.784	0.046	17.054
180	placas	115643.0	0.510	0.510	0.045	11.444
360	placas	92075.0	0.427	0.427	0.043	9.927
480	placas	102188.0	0.447	0.447	0.052	8.626
840	placas	35578.0	0.198	0.198	0.034	5.888