



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Monitoreo clínico de ácido micofenólico en
pacientes pediátricos con trasplante renal, por
cromatografía de líquidos de alta resolución**

TESIS

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Rolon Frias Bryan Usiel

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Leticia Cruz Antonio

ASESOR DE TESIS

Dr. Gilberto Castañeda Hernández



Ciudad de México, 2017



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.

Dedicatorias

A la persona que siempre se ha preocupado por mí y que mediante sus esfuerzos, sacrificios y motivaciones me ha llevado por el camino correcto, pero sobre todo a superarme como persona y en el ámbito académico.

Este trabajo, en estas instancias es la evidencia de que tengo a la mejor madre del mundo que me pudo haber dado la vida, que me apoyo en todo. Espero estés orgullosa de mi como yo lo estoy de ti por ser esa persona fuerte que afronto las adversidades para que pudiera cumplir mis metas.

¡Te amo madre Pilar!

Dedicatorias

Para la persona que tuvo que dejar todo (su familia, sus amigos, su hogar, su país) por querer darnos una vida con menos carencias. Ahora te puedo decir que esos sacrificios no fueron en vano ya que, gracias a ti, me diste la oportunidad de continuar con mis estudios de licenciatura, que a pesar de la distancia siempre estuviste pendiente de mi bienestar y de mis progresos académicos, siempre quisiste que tuviéramos una mejor preparación y ahora te puedo decir que lo hemos logrado y que espero estés orgulloso de mi.

Para mi eres el mejor padre del mundo a pesar de las circunstancias y una de mis mayores motivaciones y ejemplos a seguir.

¡Te amo Padre!

Dedicatorias

Para mi viejita que siempre estuvo al pendiente de mis progresos, que no solo me brindó su apoyo incondicionalmente, también me brinda su amor y confianza

¡Gracias abuelita Juana!

Usted también es una de mis grandes motivaciones y también forma parte de este logro.

Dedicatorias

A mis hermanas Monse y Anel que siempre me apoyaron y ayudaron cuando lo necesite, este logro es por ustedes también.

Agradecimientos

A la Dra. Lety Cruz por brindarme la oportunidad de trabajar con ella, además de compartir sus conocimientos y ayudarme a resolver mis dudas con su máximo de paciencia hasta que yo pudiera comprender lo cuestionado. Mis respetos para usted como académica, investigadora y sobre todo como persona.

Agradecimientos

Al Dr. Gilberto Castañeda por su asesoría en mi tesis, por compartir sus experiencias personales y profesionales que me ayudaron a observar y comprender las cosas desde otro punto de vista, además de ser un respetable investigador también es una excelente persona.

Agradecimientos

A la Z.F.B. Lulú por su asesoría técnica en mi trabajo de tesis, por su apoyo y sus consejos cuando me encontraba en situaciones difíciles, por sus castigos y regaños que me ayudaron a comprender de lo que se trata la responsabilidad para poder afrontar esta nueva etapa que inicio como profesional. Sé que la mayoría de las veces fui poco expresivo, pero gracias por todo y sobre todo por ser nuestra segunda madre en el laboratorio.

Agradecimientos

A mis amigos y compañeros del Laboratorio 34 del Departamento de Farmacología del CINESTAV que hicieron a mena mi estancia durante la tesis, porque a pesar de estar en un nivel académico mayor nunca se negaron a ayudarme y a compartir sus conocimientos cuando lo requerí. Al contrario, me incluyeron en su círculo social y gracias a ello pude conocerlos más, solo basta decir que son excelentes personas.

Agradecimientos

A mis amigos de la universidad que siempre me brindaron su amistad y apoyo incondicional desde que inicio la carrera, y en especial a "Los Kakis" los cuales considero también mi familia porque siempre estuvieron en los buenos y malos momentos, tanto académicos como personales, compartiendo gracias y desgracias, son los mejores Axel, Lalo, Punk, Amiguito, Nelly, Danie, Clau, Charbel, Jahziel, Pollo Medel... los amo.

Agradecimientos

A la UNAM por permitirme formar parte de tan grande y reconocida institución, pero sobre todo a la FES Zaragoza y sus docentes por todo lo enseñado y aprendido para mi formación profesional y social.

Contenido

Índice de figuras	2
Índice de tablas	5
Lista de abreviaturas	7
Resumen	10
I. Introducción	11
II. Marco teórico.....	12
A. Trasplante de órganos.....	12
B. Monitorización terapéutica de fármacos	14
C. Aspectos generales en la cuantificación de fármacos en fluidos corporales .	16
D. Fármacos inmunosupresores	20
E. Ácido micofenólico y sus derivados usados como profármacos	22
1. Micofenolato de Mofetilo	23
2. Mecanismo de acción del ácido micofenólico	25
3. Farmacocinética del ácido micofenólico	25
4. Cuantificación de ácido micofenólico	27
F. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	29
G. Desarrollo de métodos cromatográficos	30
H. Validación de métodos analíticos	32
III. Planteamiento del problema.....	34
IV. Justificación	35
V. Objetivos	36
VI. Hipótesis	37
VII. Materiales	38
VIII. Métodos	41
IX. Resultados y análisis de resultados.....	46
X. Conclusiones	72
XI. Perspectivas	73
XII. Referencias.....	74
XIII. Anexos.....	82

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura química del ácido micofenólico [Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446541#section=Top].....	22
Figura 2. Estructura química del micofenolato de mofetilo [Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281078#section=Top].....	24
Figura 3. Señal de ácido micofenólico (A) y diclofenaco sódico (B), generadas con la aplicación de las condiciones del método analítico propuesto en muestras en solución.	48
Figura 4. Selectividad. Señales generadas en la evaluación del plasma humano (A) y señales del AMF y E.I. generadas con la aplicación del método analítico en plasma humano (B).....	49
Figura 5. Curva de calibración promedio evaluada para la cuantificación de AMF en plasma. Cada punto representa el promedio de 3 repeticiones \pm su desviación estándar.	50
Figura 6. Repetibilidad del método. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para las muestras LIC, MCB, MCM, MCA y MCD establecidas para la repetibilidad del método. Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.	52
Figura 7. Reproducibilidad para el LIC. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis del LIC en tres día diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.	54
Figura 8. Reproducibilidad para el MCB. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCB en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.	54
Figura 9. Reproducibilidad para el MCM. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCM en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.	55
Figura 10. Reproducibilidad para el MCA. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCA en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.	55
Figura 11. Reproducibilidad para el MCD. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCD en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.	56
Figura 12. Reproducibilidad promedio para LIC, MCB, MCM, MCA y MCD. Valores del %C.V. promedio de las concentraciones recuperadas para el análisis del LIC, MCB, MCM, MCA y MCD.	56

Figura 13. Señales del AMF y E.I. generadas en la evaluación del LIC aplicando el método analítico propuesto en plasma humano.....	57
Figura 14. Exactitud del método corrida analítica 1. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.....	59
Figura 15. Exactitud del método corrida analítica 2. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.....	59
Figura 16. Exactitud del método corrida analítica 3. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.....	60
Figura 17. Exactitud del método. Promedio de las desviaciones del por ciento recuperado de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud. Cada valor representa el promedio de tres corridas analíticas.....	60
Figura 18. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada para MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis a las 0, 24, 48, y 72 h. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.....	62
Figura 19. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada para MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30 µg/mL) y resguardadas para análisis a las 0, 24, 48, y 72 h. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.....	62
Figura 20. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra procesada para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones...	63
Figura 21. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra procesada para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones...	64
Figura 22. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra no procesada para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones...	64

Figura 23. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra no procesada para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.....	65
Figura 24. Estabilidad a largo plazo para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.	66
Figura 25. Estabilidad a largo plazo para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas (30 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.	66
Figura 26. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave RC807966 a diferentes tiempos.	69
Figura 27. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave AR798458 a diferentes tiempos.	70
Figura 28. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave JC832091 a diferentes tiempos.....	71

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de AMF en plasma.....	42
Tabla 2. Preparación de Muestras Control para cuantificación de AMF en plasma.	43
Tabla 3. Evaluación de Selectividad. Tiempos de retención de los fármacos de uso común y/o uso concomitante con MFM.	50
Tabla 4. Variabilidad de la Curva de Calibración. Relación de Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del AMF/ Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del E.I. Para cada nivel de concentración se presenta su respectivo valor de % de coeficiente de variación.	51
Tabla 5. Curva de Calibración. Concentraciones recuperadas obtenidas al interpolar la relación de áreas calculada en el modelo matemático obtenido de cada curva de calibración. Para cada nivel de concentración se presenta su respectivo valor de % de desviación promedio.	51
Tabla 6. Límite de Cuantificación. Variabilidad presentada como %C.V. y el % de desviación obtenida para la concentración de 5 µg/mL, definida como el LIC.	57
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave RC807966.....	69
Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave AR798458.....	70
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave JC832091.	71
Tabla 10. Repetibilidad del método. Datos y valores de %C.V. de las cantidades recuperadas en las muestras MCB, MCM, MCA, MCD, y LIC, obtenidos en la evaluación del parámetro repetibilidad.....	82
Tabla 11. Resultados obtenidos en la evaluación de reproducibilidad de 3 corridas analíticas en 2 días (precisión inter día).....	82
Tabla 12. Resultados de % desviación calculados para el parámetro de exactitud.	84
Tabla 13. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas.....	85

Tabla 14. Estabilidad, ciclos de congelamiento-descongelamiento, para muestra procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.	86
Tabla 15. Estabilidad, ciclos de congelamiento-descongelamiento, para muestra no procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.	86
Tabla 16. Estabilidad a largo plazo. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser almacenados 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días.	86
Tabla 17. Resultados de la concentración a AMF en muestras del paciente con clave RC807966 a diferentes tiempos.	87
Tabla 18. Resultados de la concentración de AMF en muestras del paciente con clave AR798458 a diferentes tiempos.	87
Tabla 19. Resultados de la concentración de AMF en muestras del paciente con clave JC832091 a diferentes tiempos.	87

Lista de abreviaturas

% desv: por ciento de desviación

%C.V. por ciento coeficiente de variación

°C: grados Celsius

µg: microgramo

µL: microlitro

µm: micrómetro

Ab: anticuerpo

ABC: Área Bajo la Curva

AcMPAG: mycophenolic acid acyl-glucuronide

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Ag: antígeno

AMF: Ácido Micofenólico

C.A.: Corrida Analítica

C: carbono (s)

CAS: Chemical Abstracts Service

CEDIA: Cloned Enzyme Donor Immunoassay

CENATRA: Centro Nacional de Trasplantes

CG: Cromatografía de Gases

CINVESTAV: Centro de Investigación y Estudios Avanzados

CL: Cromatografía de Líquidos

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

C_{max}: concentración máxima

Conc.: concentración

D.E.: desviación estándar

E.I.: estándar interno

EMIT: Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique

FPIA: Fluorescence Polarization Immunoassay

G.I.: gastrointestinal

g: gramos

GTP: Guanosine Triphosphate

h: hora(s)

HLA: Human Leukocyte Antigen

IATDMCT: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology

ICN: Inhibidores de Calcineurina

IgG: Inmunoglobulina G

IMPDH: Inosina 5'-Monofosfato Deshidrogenasa

IUPAC: International Union of Pure Applied Chemistry

L: litro

LIC: límite inferior de cuantificación

M.M.: Masa Molecular

m: masa

M: molar

MC: muestra control

MCA: muestra control alta

MCB: muestra control baja

MCD: muestra control diluida

MCM: muestra control media

MFS: Micofenolato Sódico

mg: miligramos

min: minuto

mL: mililitro

mm: milímetro

MMF: Micofenolato de Mofetilo

MPAG: 7-O-mycophenolic acid glucuronide

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

nm: nanómetros

NOM: Norma Oficial Mexicana

RCA: Rechazo Celular Agudo

RHuA: Rechazo Humoral Agudo

SSA: Secretaria de Salud

t: tiempo

TLC: Thin Layer Chromatography

t_{\max} : tiempo máximo

UDP: Uridine Diphosphate

UV: ultravioleta

v: volumen

z: carga

Resumen

El micofenolato de mofetilo (MMF) y el micofenolato de sodio (MFS) son profármacos que después de su administración son hidrolizados por esterasas a ácido micofenólico (AMF), metabolito activo con funciones inmunosupresoras, que se usa en la profilaxis del rechazo de órganos. Debido a su alta variabilidad intra e interindividual la biodisponibilidad del fármaco también varía, traduciéndose en una mayor probabilidad de presentar una respuesta farmacológica indeseada, por lo que se requiere de su monitorización.

El monitoreo terapéutico, es un procedimiento relevante en el campo clínico para la individualización de dosis con el objetivo de conseguir la máxima eficacia y reducir los efectos tóxicos, haciendo uso de metodologías analíticas adecuadas para la cuantificación del fármaco en muestras biológicas.

Este estudio presenta la metodología analítica por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) propuesta para su uso cotidiano en la monitorización del AMF en plasma humano, basada en una extracción líquido-líquido, una cromatografía fase reversa, usando como fase móvil una mezcla de metanol y una solución de fosfato de potasio monobásico 0.04 M con un pH= 6.0, y con detección ultravioleta, metodología común para la mayoría de los laboratorios analíticos. La metodología implementada se validó conforme a la normatividad nacional vigente que es la NOM-177-SSA1-2013 para asegurar que el método es confiable, preciso y sensible.

La aplicabilidad el método fue establecida a través de la cuantificación del AMF en muestras de plasma de pacientes pediátricos, con los cuales se realizaron las caracterizaciones de sus perfiles farmacocinéticos correspondientes.

I. Introducción

La monitorización terapéutica de fármacos es un procedimiento de gran importancia en el campo clínico para establecer dosis individuales cuando los fármacos presentan un margen terapéutico estrecho y una gran variabilidad inter e intraindividuo ejemplo de esto es el micofenolato de mofetilo, medicamento inmunosupresor ampliamente usado en la profilaxis del rechazo de órganos. Una inadecuada determinación de las concentraciones plasmáticas de este fármaco asociada a la dosis administrada al paciente aumentará probabilidad de que éste pueda presentar una respuesta farmacológica indeseada, sea esta vista como mayores eventos adversos o ineficacia clínica que lleve incluso el rechazo del órgano trasplantado.

Por lo anterior, en el presente estudio se establecieron las condiciones de una metodología analítica sencilla y selectiva usando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, mediante detección ultravioleta y utilizando cromatografía en fase reversa para la cuantificación del ácido micofenólico que es el metabolito activo del micofenolato de mofetilo. La validación del método se realizó conforme lo establece la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013 demostrando que el método establecido es selectivo, preciso y exacto, y por lo tanto confiable para la monitorización del ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal, en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación de Estudios Avanzados (CINVESTAV). La cuantificación del AMF en muestras de pacientes pediátricos permitió la caracterización de los perfiles farmacocinéticos correspondientes, confirmando la utilidad del método analítico para calcular los parámetros farmacocinéticos del ácido micofenólico como son el área bajo la curva, concentración máxima y tiempo máximo, bajo las condiciones establecidas.

II. Marco teórico

A. Trasplante de órganos

El trasplante de órganos es ahora el tratamiento óptimo para muchos pacientes con fracaso orgánico terminal, así como alternativa de varias enfermedades, ya que el trasplante consiste en sustituir un órgano o tejido enfermo por otro que funcione adecuadamente prolongando la supervivencia y calidad de vida del paciente.^{1,2}

En México el Centro Nacional de Trasplantes (CENATRA) en 2007 registró 4 584 receptores en espera de trasplante de riñón, esta cifra aumento de manera alarmante ya que a principios de 2017 se registraron 13 051 receptores en espera de este tipo de trasplante, lo que quiere decir que en los últimos 10 años los receptores en espera de trasplante de riñón se ha casi triplicado. Por lo tanto, en México el riñón es el órgano con mayor demanda para ser trasplantado y el segundo con más trasplantes realizados, solo detrás de los trasplantes de córnea.^{3,4,5}

El diagnóstico del paciente que espera un trasplante de riñón es diverso como son: glomerulopatías, retrasplante, enfermedad poliquística, nefropatía por malformaciones del tracto urinario, entre otras.⁵

Los tipos de donantes que se pueden presentar son:⁶

- Donantes de órganos vivo
- Donante de órganos fallecido

La clasificación del tipo de donantes es importante debido a que la supervivencia del injerto después de un trasplante renal de un donante vivo suele ser mayor que la obtenida después de un trasplante renal de un donante fallecido.⁶

En México en los últimos 5 años se han presentado trasplantes de riñones de donantes vivos en mayor proporción que de donantes fallecidos.⁴

Pero no solo el tipo de donante influye en la supervivencia del injerto u órgano sino también la terapia de inmunodepresión, que es un factor muy importante durante el periodo de post trasplante inicial ya que es donde se presenta una elevada incidencia de rechazo precoz del trasplante.⁶

Los principales tipos de rechazo que se pueden presentar son:

- Rechazo hiperagudo: Se origina al estar en contacto el órgano con la sangre del receptor. Tiene una evolución muy rápida, normalmente dentro de las primeras 48 horas. Es el ataque inmunológico más importante y destructivo contra el injerto. Es consecuencia de anticuerpos (IgG) fijadores de complementos circulantes, con reactividad específica contra un antígeno incompatible del donante, que se acoplan y destruyen el endotelio vascular. Este tipo de rechazo tiene un índice bajo de incidencia.^{6,7}
- Rechazo agudo: Se origina desde varios días a varios meses después del trasplante. Se clasifica en: mediado por linfocitos (RCA) o mediado por anticuerpos o humoral (RHuA). Estos tipos de rechazos son más habituales, aunque el RHuA se presenta con menor frecuencia. Este rechazo es un problema clínico importante principalmente en el trasplante renal y se produce hasta en el 60% de los receptores.^{6,7,8}
- Rechazo crónico: Se utiliza para describir las alteraciones encontradas en la insuficiencia funcional tardía de órganos, tales como el riñón, corazón o pulmón. Se utiliza para referirse a aquellos cambios que están mediados por funciones efectoras del sistema inmune, dado que la insuficiencia tardía de los injertos es un proceso complejo y multifactorial. Este tipo de rechazo es, en la actualidad, muy difícilmente tratable y la causa del mayor número de pérdidas de trasplantes de larga evolución en todos los órganos.^{6,7}

El éxito actual del trasplante de órganos es en gran parte atribuible a los avances en la terapia inmunosupresora ya que muy pocos injertos se pierden como resultado de los rechazos de órganos.⁶ Para la profilaxis del órgano trasplantado los médicos deben prescribir una dosis suficientemente alta de los medicamentos para evitar el rechazo sin poner en riesgo la salud del receptor.¹

B. Monitorización terapéutica de fármacos

El uso racional de los medicamentos requiere de un diagnóstico correcto, un conocimiento adecuado de la enfermedad, la selección del fármaco idóneo y el diseño de una pauta de administración que consiga la máxima eficacia con el mínimo de riesgo.⁹

La rama de la farmacología que abarca estos aspectos es la farmacocinética clínica la cual establece modelos farmacocinéticos que permiten predecir las concentraciones que se van a alcanzar y mantener, así como las dosis necesarias para conseguirlo.⁹

La Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico de Fármacos y Toxicología Clínica (IATDMCT por sus siglas en inglés) define la monitorización terapéutica de fármacos como una especialidad multidisciplinaria clínica destinada a mejorar la atención hacia el paciente, ajustando individualmente las dosis de los fármacos debido a que la experiencia clínica o los ensayos clínicos han demostrado que mejora el resultado en las poblaciones generales o especiales.^{10,11} Por lo tanto, la monitorización terapéutica de fármacos o control del tratamiento farmacológico es la evaluación de la eficacia y de la toxicidad de los fármacos en la práctica clínica con la finalidad de individualizar el tratamiento farmacológico y adaptarlo a las necesidades de cada paciente.^{9,12}

La pauta de administración de un fármaco debe individualizarse teniendo en cuenta las características fisiológicas, patológicas e iatrogénas que puedan alterar la respuesta al tratamiento y debe tener en cuenta los siguientes aspectos:⁹

- Características de la enfermedad, gravedad y urgencia, así como de la respuesta previa a otros tratamientos
- Eficacia y toxicidad del fármaco
- Características farmacocinéticas del fármaco y factores que puedan alterarlas
- Vía de administración
- Forma farmacéutica que se va a utilizar
- Conveniencia de facilitar el cumplimiento terapéutico

- Binomio costo/beneficio

La monitorización de los niveles plasmáticos de fármacos no está justificada para todos los fármacos ni en todos los pacientes o circunstancias, si no solo en aquellos casos en que el beneficio de la determinación supera el costo. Las consideraciones involucradas para que la determinación de los niveles plasmáticos de un fármaco resulte útil en la práctica clínica son:⁹

- i. Aspectos de eficacia/seguridad.
 - a. Asegurar la eficacia o evidenciar la toxicidad
 - b. Dificultad para valorar clínicamente la eficacia o la toxicidad
 - c. Importancia para controlar el cumplimiento de dosificación
 - d. Fármacos de margen terapéutico estrecho
 - e. Dificultad en ajuste de dosis
- ii. Justificar la monitorización debido a:
 - a. Alta variabilidad inter e intraindividual en relación a la dosis y el nivel plasmático
 - b. Correlación entre niveles plasmáticos del principio activo y la eficacia/toxicidad con un intervalo óptimo establecido
 - c. Factores farmacocinéticos y farmacodinámicos que influyen en la respuesta del nivel plasmático
 - d. Exista un método asequible y fiable
- iii. Correcto monitoreo de las concentraciones plasmáticas:
 - a. Métodos de extracción adecuados/correctos
 - b. Disponer de resultados confiables y de forma rápida
 - c. Interpretación farmacocinética y farmacodinámica de forma correcta
 - d. Nivel plasmático del principio activo se utilice en su contexto clínico como una ayuda, no como una guía única de tratamiento.

C. Aspectos generales en la cuantificación de fármacos en fluidos corporales

Un principio básico de la farmacología clínica es que la actividad farmacológica de un agente administrado exógenamente, está relacionada con la concentración del fármaco libre disponible en su receptor o sitio de unión al ligando y por lo tanto está relacionado a los principios farmacocinéticos y la práctica de la terapéutica racional en medicina clínica. Pacientes sometidos a un trasplante, exhiben un comportamiento inmunológico heterogéneo y un umbral toxico extremadamente variable de los medicamentos inmunosupresores, con una considerable variabilidad en su comportamiento farmacocinético.¹³

La aplicación de los principios farmacocinéticos y las relaciones dosis-concentración, son fundamentales para la monitorización de fármacos en la optimización de la dosificación de sus concentraciones objetivo, condición que requiere de métodos que sean sensibles y sencillos debido al gran número de muestras que requieren procesamiento.¹³

El advenimiento del análisis químico moderno permite una mejor y mayor rapidez para la determinación de los fármacos y sus metabolitos en sangre y otros fluidos corporales.¹⁴

Los fluidos corporales que usualmente se utilizan para medir la concentración de un fármaco de interés en un monitoreo terapéutico son el suero o el plasma.¹⁵

Los métodos analíticos se pueden dividir en tres categorías basadas en su precisión y exactitud, utilizando un esquema original desarrollado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés) los cuales son:¹⁴

- Métodos definitivos: son aquellos que presentan la más alta precisión y exactitud. Tienen un error sistemático despreciable con respecto a la aplicación de la medición.¹⁴
- Métodos de referencia: son aquellos que poseen pequeñas inexactitudes estimadas relativas al requisito final de uso final. Son generalmente complejos, pero son más susceptibles de aplicación en los laboratorios clínicos.¹⁴

- Métodos de rutina: son aquellas metodologías que pueden tener una mayor incertidumbre, pero tienen otras ventajas como son la facilidad de aplicación, alto rendimiento y menor costo.¹⁴

La cuantificación de fármacos en muestras biológicas en la monitorización de fármacos dependiendo de la metodología analítica involucra aspectos como: la recuperación de fluidos corporales, tejidos y/u órganos, la separación de los componentes biológicos, la identificación de las especies en cuestión y finalmente la cuantificación de la misma. Idealmente una metodología analítica empleada para estos fines debe:¹⁶

- i. Distinguir entre compuestos de estructura similar: fármaco inalterado y metabolitos.
- ii. Detectar pequeñas cantidades
- iii. Ser simple para utilizarse como un ensayo rutinario
- iv. No afectarse por otros fármacos administrados simultáneamente

Son diversos los métodos analíticos utilizados para analizar muestras biológicas, algunas de éstas se describen brevemente a continuación:¹⁶

- Espectrofotometría y fluorometría: estos métodos proporcionan una cierta simplicidad en el procedimiento del ensayo cuando el nivel de sensibilidad requerido no es demasiado bajo. Sin embargo, algunos de los inconvenientes que presenta la metodología son: grandes volúmenes de muestra, procedimientos de extracción complejos y mayor posibilidad de interferencias por otros compuestos.¹⁶
- Cromatografía de Capa Fina (TLC por sus siglas en inglés): esta metodología posee adecuada resolución para identificar muchos fármacos, pero ésta sufre de inhabilidad para cuantificar con exactitud los productos de interés y el tiempo para su realización suele ser prolongado. Sin embargo, esta técnica es muy utilizada en laboratorios de toxicología.¹⁶

- Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Cromatografía Gas-Líquido: estos son métodos altamente específicos, precisos y sensibles. Se basan en la separación de compuestos presentes en un líquido o gas fluido por su interacción física o química con un material inmóvil, lo que retrasa su movilidad. Los inconvenientes de estas técnicas son:^{14,16}
 - i) Requieren un proceso de extracción
 - ii) Los análisis en serie son lentos
 - iii) Las columnas suelen tener una eficacia finita
 - iv) Los análisis complejos requieren de considerables procesos

La elección entre cromatografía de gases (CG) y cromatografía líquida (CL) se basa generalmente en el compuesto de interés. CG tiene mayor resolución y por lo tanto puede ser útil para lograr una mejor separación del compuesto de interés, pero su principal limitación es que solo puede aplicarse a sustancias volátiles con pesos relativamente bajos. Los compuestos polares tampoco pueden ser analizados por esta técnica. Sin embargo, un compuesto relativamente polar puede ser químicamente convertido en un compuesto no polar (derivatización) para el análisis por CG. Por lo tanto, de estas dos técnicas, la técnica de CLAR resulta superior porque puede usarse para la separación de moléculas polares y no polares, así como compuestos termolábiles que pueden ser analizados sin la necesidad de utilizar la derivatización.^{14,15,16}

- Inmunoensayos: se basan en la alta afinidad y la interacción específica entre un antígeno (Ag) y un anticuerpo (Ab). Tiene alta aplicación en una amplia gama de objetivos moleculares, y una relativa simplicidad en la operación utilizando analizadores automatizados, hace que tales ensayos sean altamente atractivos para los laboratorios clínicos, además de que los ensayos requieren de cantidades muy pequeñas de muestra.^{14,15} Existen varios métodos de inmunoensayo comúnmente utilizados en laboratorios clínicos como EMIT, CEDIA, FPIA, entre otros.^{14,15} La desventaja que presentan estos tipos de ensayos son la especificidad de anticuerpos debido a la interferencia producida por metabolitos endógenos del analito que pueden tener motivos de

reconocimiento estructural muy similares a la molécula de interés y también son desafiados por la reactividad cruzada entre el fármaco, su precursor y el metabolito.^{14,15}

- Radio inmunoensayos: estos son sensitivos, razonablemente precisos, pero requiere del uso de radionucleótidos. La reactividad cruzada con otros fármacos estrechamente reaccionados, es un problema potencial con esta técnica. Además, no es posible encontrar el isómero ópticamente activo. Los peligros de usar material radiactivo es una limitación considerable para este método.¹⁶
- Inmunoensayos enzimáticos: estas técnicas ofrecen algunas ventajas por encima de los radioinmunoensayos, en que no son requeridos trazadores radiactivos. Sin embargo, el potencial de reactividad cruzada aún existe.¹⁶
- Inmunoensayo de polarización fluorescente: el procedimiento de este ensayo combina la unión de proteínas competitivas con la polarización fluorescente para dar una medición directa sin la necesidad de un procedimiento de separación. Las ventajas de este método son exactitud, precisión y un tiempo de respuesta corto.¹⁶
- Espectrometría de masas: técnica que mide la relación masa/carga (m/z) de un ion. Su funcionamiento se basa en una fuente de iones para conseguir la especie molecular cargada en un vapor susceptible de análisis de masa, un analizador de masas para realizar la separación de iones por su m/z y finalmente un detector sensible para detectar y cuantificar los iones que pasan con éxito a través del analizador de masas.^{14,15}

El espectrómetro de masas se usa a menudo como un detector para compuestos que se eluyen a partir de un cromatógrafo de gases o una columna de una CLAR, siendo estas técnicas alternativas muy sensibles y específicas para un analito.^{14,15}

D. Fármacos inmunosupresores

Los fármacos inmunosupresores se utilizan para amortiguar la respuesta inmunitaria en receptores de trasplantes de órganos y en enfermedades autoinmunes. Para la profilaxis inmunodepresora primaria, los fármacos disponibles difieren en sus mecanismos de acción y a menudo se utilizan de forma combinada para obtener un resultado óptimo. Entre los fármacos inmunosupresores se encuentran:^{17,18}

- i. Corticosteroides: Siguen siendo ampliamente considerados como un componente importante de la mayoría de los regímenes inmunosupresores y se usan casi universalmente como el tratamiento de primera línea para el rechazo agudo del injerto. Tienen una variedad de efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Estos actúan sobre varios puntos de la cascada inmunitaria, incluyendo el reconocimiento de antígenos y la producción de linfocinas.

Los efectos perjudiciales del tratamiento con este tipo de inmunosupresores son del tipo metabólico que incluyen la diabetogénesis debido al metabolismo alterado de los carbohidratos, obesidad, debilidad proximal. La terapia a largo plazo da como resultado una supresión suprarrenal y atrofia adrenal. La psicosis, las cataratas, glaucoma, ulceración péptica, estrías, osteoporosis son otros de los problemas comunes.^{1,17,18}

- ii. Inmunosupresores de tipo polipéptido o inhibidores de la calcineurina (ICN): estos evitan la formación de células T citotóxicas al inhibir la activación de la calcineurina, un paso importante en la liberación de interleucina 2 desde las células T cooperadoras.^{1,17,18}

Los ICN se asocian con una serie de eventos adversos específicos, tales como la nefrotoxicidad principalmente, hipertensión, neurotoxicidad y metabólicos. El insomnio, agitación, convulsiones, psicosis, alucinaciones, encefalopatía son otros de los eventos que pueden presentar al administrarse este tipo de inmunosupresores, pero son menos comunes.^{1,17,18}

- iii. Anticuerpos tipo policlonal o monoclonal (productos biológicos): estos como las inmunoglobulinas antilinfocíticas y el muromonab-CD3 se fijan a las células T y extinguen su población.^{1,17,18} La reacción más común es un episodio febril. Otras reacciones incluyen erupción cutánea, prurito, trombocitopenia y raramente shock anafiláctico.^{1,17,18}
- iv. Fármacos antiproliferativos / antimetabólicos: actúan inhibiendo la división celular de los linfocitos, mediante la inhibición de la síntesis de purinas como de pirimidinas que son necesarias para la síntesis de ADN, y por lo tanto inhiben la proliferación celular.^{1,19} Entre los efectos dañinos que se pueden encontrar son la supresión de la médula ósea, deterioro hepático ocasional y los gastrointestinales.^{1,19}
- v. Inhibidores de la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR por sus siglas en inglés): son inhibidores los cuales tienen una consecuencia profunda en la vía de señalización celular requerida para la progresión del ciclo celular y la proliferación celular. El resultado neto es el bloqueo de la activación de las células T.¹

Las pautas de tratamiento inmunodepresoras pueden dividirse según su objetivo:¹⁷

- Prevenir el rechazo inicial tras el trasplante
- Mantener una profilaxis a largo plazo
- Tratar los episodios de rechazo agudo

El trasplante renal es considerado la última opción terapéutica para resolver la fase terminal de insuficiencia renal. No existe un único tratamiento inmunodepresor universalmente aceptado, y diversos centros hospitalarios han obtenido buenos resultados con estrategias diferentes. En la intensidad de la inmunoterapia requerida influyen diversos factores, incluyendo el origen del donante (vivo o fallecido) y el grado de histocompatibilidad HLA, así como la edad, la raza y el título de anticuerpos reactivos del hospedador.¹⁷

Los efectos perjudiciales inespecíficos de la inmunodepresión comprenden mayor riesgo de neoplasias malignas e infecciones. Todos los inmunodepresores también tienen eventos adversos específicos dependientes de la dosis.⁶

E. Ácido micofenólico y sus derivados usados como profármacos

El ácido micofenólico es un compuesto con la fórmula condensada $C_{17}H_{20}O_6$, con una M.M. 320.24 g/mol, punto de fusión 141 °C, y un pKa de 4.5. Insoluble en agua fría y soluble en alcohol. Es un fármaco inmunomodulador de tipo antiproliferativo descubierto originalmente como un producto de fermentación de varias especies de *Penicillium sp.* (Figura 1). Posee propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antitumorales e inmunosupresoras.^{17,20,21}

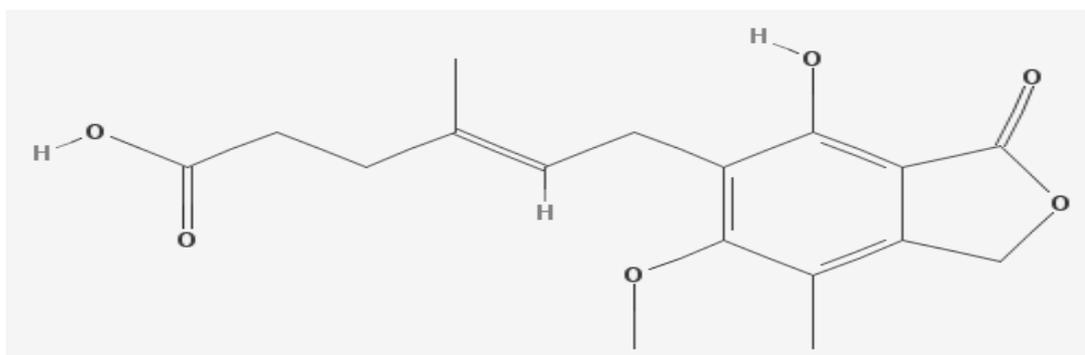


Figura 1. Estructura química del ácido micofenólico [Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/446541#section=Top>]

El AMF se administra en combinación con otros inmunodepresores en el tratamiento y la prevención de los rechazos de trasplantes, también se ha usado en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes o de carácter inflamatorio con una base inmunológica. Se utiliza principalmente en forma de un derivado del morfolinoetilo, el micofenolato de mofetilo y en su sal hidroclicada, el micofenolato sódico.^{22,23}

1. Micofenolato de Mofetilo

El desarrollo de la síntesis de nuevos fármacos derivados del AMF, resulta en compuestos análogos con propiedades muy similares, uno de ellos el micofenolato mofetilo que mostró su eficacia clínica en la prevención del rechazo agudo de trasplantes, ya que la incidencia de rechazo agudo fue notablemente más baja, oscilando entre el 15% y el 35% en los pacientes que recibieron MFM en comparación con aquellos que recibieron azatioprina o algún antimetabolito en combinación con un ICN y corticosteroides. También se ha encontrado que mejora el resultado a 5 años en receptores de trasplante renal pediátrico y por lo tanto prolonga la vida media del injerto.^{8,24,25}

El MFM es actualmente el fármaco inmunosupresor más frecuentemente prescrito a los receptores de trasplante renal pediátrico en los Estados Unidos y en algunos países de Europa. Análisis farmacocinéticos revelaron que las dosis de MFM se pueden determinar con mayor precisión cuando se calcula sobre una base de superficie corporal conduciendo a una exposición comparable de AMF en todo el rango de edad pediátrica.²⁶

El micofenolato de mofetilo, tiene una masa molecular de 433.49 g/mol y una fórmula condensada de $C_{23}H_{31}NO_7$ (Figura 2). Es un polvo cristalino blanco o casi blanco con punto de fusión de entre 93-94 °C y un pKa de 5.6, casi insoluble en agua y ligeramente soluble en etanol. Soluble en acetona y metanol. Este debe protegerse de la luz.^{17,20,21,27}

El MFM es un 2-morfolinoetil éster, del ácido micofenólico, se hidroliza con rapidez a AMF, razón por la cual es considerado como un profármaco del AMF. El micofenolato de mofetilo, es un fármaco de clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica ya que este presenta una baja solubilidad y una alta biodisponibilidad. Los beneficios de la terapia con el MFM en la prevención de episodios de rechazo agudo durante los primeros 12 meses después del trasplante se han demostrado en los estudios de fase III debido a su efecto para la

supervivencia del injerto y del paciente, así como la función renal tanto en adultos como en pacientes pediátricos.^{26,28,29}

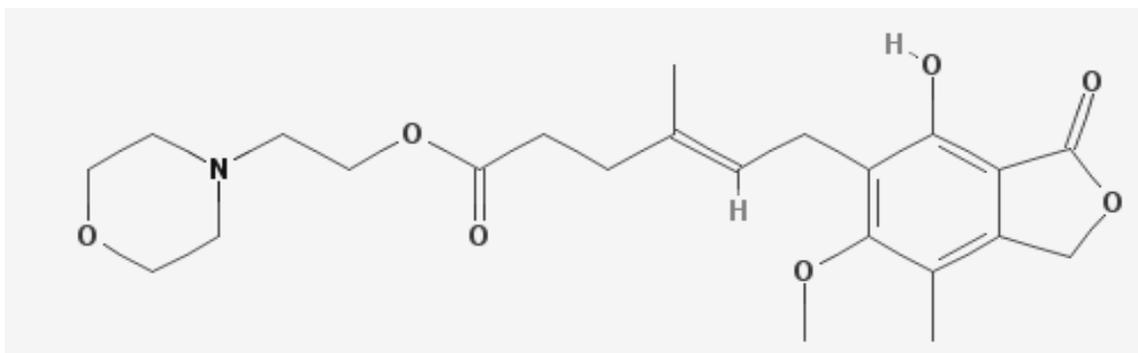


Figura 2. Estructura química del micofenolato de mofetilo [Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281078#section=Top>]

Para que el micofenolato mofetilo tenga su acción terapéutica debe encontrarse como ácido micofenólico, por lo cual el micofenolato mofetilo debe ser hidrolizado para que se encuentre en su forma ácida, dicha hidrólisis la llevan a cabo esterasas localizadas principalmente en intestino, en sangre e hígado.³⁰

El micofenolato de mofetilo se asocia a eventos adversos serios, pero no potencialmente mortales, excepto en casos muy raros., éstos se asocian a altas incidencias de alteraciones gastrointestinales como son diarrea, vómitos, náusea y dolor abdominal superior; también se han descritos casos hematológicos como son hemorragia, perforación gastrointestinal, leucopenia y anemia, lo cual limita la terapia óptima resultando en la necesidad de la reducción, interrupción o discontinuación de la dosis, lo que aumenta el riesgo de rechazo agudo y menor supervivencia del injerto. Los eventos adversos del MFM parecen ser más prominentes en los niños menores de 6 años.^{8,17,22,26,29,31}

La efectividad del MFM no se ve afectada por la hidrólisis, ni parámetros farmacocinéticos como el área bajo la curva (ABC) y la C_{max}, pero si hay disminución de eventos adversos gastrointestinales con la formulación de micofenolato sódico, esto debido a que es una formulación sólida con cubierta entérica que está diseñada para la disminución de eventos adversos GI, retrasando la liberación del AMF hasta alcanzar el intestino delgado.^{29,32,33} La formulación éster se utiliza porque aumenta la absorción del AMF.³¹

2. Mecanismo de acción del ácido micofenólico

AMF es un fármaco inmunomodulador que inhibe de manera selectiva, no competitiva y reversible la enzima inosina 5´-monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), la enzima clave en la biosíntesis de purinas *de novo*, produciendo un potente efecto citostático sobre la proliferación de los linfocitos T y B debido a su fuerte dependencia hacia esta síntesis *de novo*, ya que dependen totalmente de la disponibilidad de suficientes nucleótidos intracelulares para la producción de nuevos ADN, mientras que otras células pueden utilizar otras vías de salvamento para la síntesis de purinas que no se ve afectada por AMF. El tratamiento con AMF conduce a la disminución de los niveles intracelulares de nucleótidos de guanina, produciendo: disminución en los niveles de guanosina trifosfato (GTP), con acción antiproliferativa en la interfaz G1/S del ciclo celular, aumento de la apoptosis y diferenciación terminal de los monocitos, resultando en la inhibición de la formación de anticuerpos, adhesión y migración celular. La selectividad de los efectos inmunorreguladores de AMF se mejora adicionalmente mediante una sensibilidad cinco veces mayor a la isoforma tipo II de IMPDH que se expresa típicamente en antígenos o linfocitos T y B activados con mitógenos. El tipo I se expresa constitutivamente y es la isoforma predominante sobre el tipo II en células normales no replicantes, mientras que la isoforma tipo II se regula selectivamente en células neoplásicas y de replicación, predominando sobre el tipo I.^{18,26,34,35,36,37,38}

3. Farmacocinética del ácido micofenólico

El micofenolato de mofetilo después de la administración oral se absorbe de manera rápida y extensamente en el tubo digestivo con una biodisponibilidad mayor al 90%; el MFM experimenta metabolismo pre sistémico para dar lugar al metabolito activo: ácido micofenólico. Después de una dosis oral, el MFM en la circulación sistémica desaparece rápidamente y la concentración plasmática de AMF se eleva rápidamente alcanzando su máximo de concentración dentro de 1 h.^{34,39}

Mientras que el MFS después de la administración oral presenta una biodisponibilidad del 72%, donde el tiempo de latencia para llegar a aumentar la concentración en sangre oscila entre 0.25 y 1.25 h, y donde el tiempo para llegar a la concentración máxima es de 1.5 y 2.75 h.^{34,40}

El AMF se une ampliamente a la albúmina, el rango de unión a la proteína es de 97 a 99% en pacientes con función renal y hepática normal.^{34,40}

El AMF experimenta circulación enterohepática y, secundariamente se observa un incremento en las concentraciones plasmáticas de AMF; éstas se han detectado después de 6-12 h de administrar una dosis de micofenolato de mofetilo, y después de 6-8 h de administrar micofenolato sódico en particular en los primeros periodos post trasplante.^{12,17,28,34,40,41,42} El AMF es metabolizado en el hígado (y posiblemente por otros tejidos, incluyendo el intestino y el riñón) mediante un proceso de glucuronidación de fase II mediada por las isoformas de UDP-glucuronosiltransferasa a glucurónido del ácido micofenólico (MPAG por sus siglas en inglés), que es inactivo. Además del MPAG, existen otros dos metabolitos los cuales son AMF-acil-glucurónido (AcMPAG por sus siglas en inglés) y AMF-fenilglucósido (glucósido-MPA). La AcMPAG, ha mostrado actividad farmacológica *in vitro* y, potencialmente, es responsable de la toxicidad gastrointestinal del AMF. Estos metabolitos glucurónidos son excretados en la bilis, en un proceso que está mediado por un transportador canalicular y nuevamente se someten a una deglucuronidación para llegar a AMF por enzimas que son producidas por bacterias del colon con actividad de glucuronidasa, el AMF luego se reabsorbe en la circulación sistémica debido a que experimenta la recirculación enterohepática. En consecuencia, dos picos de AMF se observan en el perfil farmacocinético, donde el segundo pico más pequeño representa la absorción del intestino distal después de la recirculación enterohepática. La mayor parte de la dosis de micofenolato se excreta por la orina en forma de glucurónido con cantidades insignificantes de ácido micofenólico; un 6% de la dosis se excreta por heces. Se ha calculado que la vida de eliminación del AMF tras una dosis intravenosa y oral de micofenolato de mofetilo está comprendido entre 16.6 y 17.9 h respectivamente.^{12,17,28,34,40,41,42}

La concentración plasmática del AMF parece estar correlacionada con su eficacia y toxicidad. Los pacientes con concentraciones bajas de AMF pueden tener un mayor riesgo de presentar una reacción de rechazo al trasplante o enfermedad de injerto contra huésped y existen datos de que las concentraciones elevadas de AMF se correlacionan con un aumento de los eventos adversos. Se ha establecido que las dosis únicas de micofenolato de mofetilo causan una exposición variable al AMF.^{12,17,25,26,30,34,40,41,43}

El desarrollo humano puede alterar la acción y respuesta a un fármaco (ontogenia humana), conlleva a la variabilidad de la exposición del fármaco. Entre los factores que se han encontrado y que causan la variabilidad de la exposición del AMF son: el grado de unión a proteínas debido a concentración de albúmina sérica, función renal y coadministración de fármacos que pueden competir con y/o desplazar el AMF desde sus sitios de unión a proteínas, recirculación enterohepática, ingesta de alimentos, género, raza y otros inmunosupresores que son administrados concomitantemente; las características de las formulaciones también contribuyen a la variabilidad del AMF, entre las cuales se deben de tener en cuenta las características del principio activo, la calidad y tipo de la forma farmacéutica, la calidad y tipo de excipientes y los procesos de fabricación son características que pueden alterar las concentraciones de ácido micofenólico, por ello se considera necesario el control de la concentración del micofenolato de mofetilo, para mejorar la eficacia y disminuir toxicidad.^{12,17,25,26,30,34,40,41,43}

4. Cuantificación de ácido micofenólico

Debido a que existe una gran variabilidad inter e intraindividual de la exposición al AMF en el trasplante de órganos sólidos, es relevante la necesidad de monitorizar el fármaco terapéutico para conseguir una dosificación del fármaco más precisa mediante la determinación cuantitativa del AMF. Permitiendo al clínico desarrollar estrategias de terapia inmunosupresora personalizadas para evitar la toxicidad relacionada con el fármaco mientras se mantiene la eficacia. Cabe señalar que el metabolito acil-glucurónido también puede inhibir la IMPDH por lo que puede

complicar aún más la evaluación de la concentración y el resultado de interpretación clínica del AMF.^{12,26,34,42}

Un requisito básico para lograr este objetivo es establecer un método analítico validado, preciso y sensible para determinar AMF con o sin sus metabolitos en fluidos biológicos.⁴⁰ La concentración plasmática y el área bajo la curva de la concentración de AMF y sus parámetros farmacocinéticos se han utilizado para predecir la eficacia o la toxicidad, minimizando el riesgo de rechazo de órganos. La ventana terapéutica actualmente recomendada para la exposición de AMF en el periodo inicial después del trasplante renal pediátrico para minimizar el riesgo de rechazo agudo es de 30 a 60 mg·h/L para CLAR y de 37 a 70 mg·h/L para la técnica EMIT.^{26,42}

Algunas otras razones para monitorizar el nivel de AMF: ⁴⁴

- i. El área bajo la curva del intervalo de dosis de AMF en la curva tiempo vs concentración es predictiva del riesgo de desarrollo de rechazo agudo de órgano si el nivel está por debajo de la concentración terapéutica óptima.
- ii. La variación interindividual es muy significativa, hasta 10 veces, del ABC del AMF en la curva de tiempo vs concentración, en pacientes con trasplante renal que recibieron una dosis fija del fármaco original.
- iii. Pueden producirse cambios sustanciales en las concentraciones de AMF en pacientes que recibieron una dosis fija del fármaco original como resultado de las interacciones fármaco-fármaco debido a la coadministración con otros agentes inmunosupresores
- iv. El efecto de las enfermedades hepáticas y renales en los niveles de AMF total y libre en el cuerpo.
- v. La necesidad de monitorear estrechamente los niveles plasmáticos de AMF cuando se planea un cambio importante en la terapia para la inmunosupresión.

Entre los métodos para determinar las concentraciones de AMF se incluyen la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y una técnica de ensayo

inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT, por sus siglas en inglés). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en la técnica EMIT, el metabolito acilglucurónido del ácido micofenólico puede presentar reacción cruzada, lo que proporciona valores de concentración superiores a los reales. Otro método propuesto es medir directamente la actividad monofosfato de inosina deshidrogenasa (IMPDH) pero este método ha dado resultados variables.³⁴ Otras propuestas de cuantificación de AMF, presentan uno o más de los siguientes inconvenientes:^{41,45} análisis a largo plazo, pretratamiento complejo de muestras (extracción sólida o líquida) y no cuantificación de metabolitos

Entre los numerosos métodos descritos, los análisis basados en CLAR son los métodos estándar para la determinación de AMF y sus metabolitos.⁴⁶

F. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La IUPAC la define como: un método utilizado inicialmente para la separación de los componentes de una muestra en la cual los componentes se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido sobre un soporte sólido, o un gel. La fase estacionaria puede estar contenida en una columna, extendida en forma de capa o dispuesta en forma de película. La fase móvil puede ser gaseosa o líquida.⁴⁷ Los métodos cromatográficos se clasifican atendiendo a la naturaleza de la fase móvil (gas o líquido), de la fase estacionaria (líquido o sólido), del soporte utilizado (columna, papel o placa), del mecanismo de separación (adsorción, reparto, intercambio iónico o permeación en gel) e incluso del tipo de soluto (iones, proteínas, polímeros, entre otros).⁴⁷

La mayor o menor retención de los analitos de una muestra en la fase estacionaria depende de las correspondientes afinidades de éstos. Estas afinidades, a su vez, dependen de diversos factores entre los que cabe mencionar: interacciones iónicas entre especies de carga opuesta, interacciones de van der Waals, del tipo dipolo-dipolo o dipolo-dipolo inducido, interacciones por fuerzas de dispersión o formación de enlaces de hidrógeno.⁴⁷ Las propiedades de difusión de los componentes de las mezclas para las fases estacionarias y móviles conducen a su separación, ya que

ciertos componentes serán más atraídos a la fase móvil y eluirán rápidamente mientras que otros serán retenidos por la fase estacionaria durante más tiempo y por lo tanto eluirán más lentamente.⁴⁸

La combinación del desarrollo tecnológico de los instrumentos perfeccionados con mejoras químicas de columnas (partículas más pequeñas y presiones más elevadas) ha logrado mejores separaciones, con la denominación de la técnica como CLAR.⁴⁸

La técnica de CLAR presenta las siguientes características:⁴⁹

- i. Alta resolución
- ii. Diámetro pequeño, material de acero inoxidable o columna de vidrio que conforman la fase estacionaria
- iii. Análisis rápido
- iv. Presión de fase móvil relativamente más alta
- v. Velocidad de flujo de la fase móvil controlada

Un sistema CLAR básico consta de los depósitos de disolvente, uno para cada uno de los eluyentes de la fase móvil, así como otros depósitos para la jeringa del inyector automático y lavados de línea. Una bomba de alta presión forma el sistema de suministro de disolvente, que genera y mide una velocidad de flujo específica y una válvula de separación de disolventes que permite hacer mezclas de disolventes.⁴⁹

G. Desarrollo de métodos cromatográficos

El desarrollo de métodos para nuevos fármacos y para fármacos ya comercializados se realizan cuando no se cuentan con métodos oficiales disponibles, o incluso como un método alternativo para los fármacos ya existentes con la finalidad de reducir costos y tiempo en el análisis, pero manteniendo o mejorando la precisión y robustez.⁴⁹ Lo cual implica:

- i. Comprender las propiedades fisicoquímicas de la molécula del fármaco: entre las cuales juegan un papel importante la solubilidad, polaridad, pH, y pKa. En este paso permite al analista elegir los disolventes y la composición de la fase móvil y el rango de pH apropiado para los analitos de interés.⁴⁹
- ii. Selección de las condiciones cromatográficas: donde un conjunto de condiciones iniciales (detector, columna, fase móvil) son seleccionadas para obtener los primeros cromatogramas de exploración de la muestra.⁴⁹
- iii. Desarrollar el enfoque del análisis⁴⁹
- iv. Preparación de muestras: Se define como un paso crítico en el desarrollo del método en el cual se investiga y se plantea el procedimiento adecuado que se aplicara a una muestra real en proceso para el análisis, con la finalidad de crear una muestra procesada que conduzca a mejores resultados analíticos en comparación con la muestra inicial. La muestra preparada debe ser una alícuota relativamente libre de interferencias que sea compatible con el método CLAR y no dañe la columna.⁴⁹
- v. Optimización del método: La cual se centra en lograr las mejores condiciones de CLAR. Las composiciones de fase móvil y estacionaria, como son la acidez, el disolvente, el gradiente, la velocidad de flujo, la temperatura, las cantidades de muestra, el volumen de inyección y los diluyentes, todo con el propósito de encontrar un mejor equilibrio entre resolución y tiempo de análisis después de que se ha logrado una selectividad satisfactoria.⁴⁹
- vi. Validación del método: Este es el paso final y más importante para el desarrollo del método cromatográfico ya que es el proceso mediante el cual se establece mediante estudios de laboratorio que las características de rendimiento del método cumplen con los requisitos para la aplicación analítica prevista.⁴⁹

H. Validación de métodos analíticos

La determinación de las concentraciones de fármacos en matrices biológicas (suero, plasma, sangre total, orina y saliva), es un aspecto importante en los resultados de estudios preclínicos o clínicos, incluyendo los estudios de bioequivalencia. Es esencial contar con metodologías bien caracterizadas para producir resultados fiables que pueden ser interpretados de manera satisfactoria. Los métodos y/o técnicas de bio-análisis cambian continuamente y en muchos casos, están a la vanguardia de la tecnología. Los métodos bio-analíticos tienen sus propias características, varían de analito a analito y están influenciados por el objetivo del estudio.⁵⁰

Se debe analizar el fármaco inalterado a menos que no sea posible su cuantificación por limitaciones analíticas, debido a una biotransformación rápida o necesidad específica del estudio, en cuyo caso, se debe incluir una justificación científica apropiada en el protocolo clínico correspondiente, para el (los) analito(s) que será(n) evaluado(s).⁵¹ Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de fármacos en muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente.⁵¹

Una vez establecidas las condiciones analíticas; la validación del método debe incluir como mínimo:

- i. Selectividad. Es la demostración de la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, al considerar también posibles interferencias de fármacos de uso común, metabolitos, anticoagulantes u otras sustancias que puedan estar presentes en la matriz biológica.^{50,51,52}
- ii. Límite inferior de cuantificación. El cual, se debe determinar con base en el 5% de la concentración máxima (C_{max}) reportado para el analito de interés, a menos que los objetivos del estudio especifiquen otra cosa. El límite inferior

de cuantificación deberá cumplir con la precisión y exactitud definida en el método.^{50,51,52}

- iii. Curva de calibración. Que es el intervalo de concentraciones de la curva de calibración en función de las concentraciones esperadas de analito a cuantificar durante el análisis de las muestras. La curva definirá un modelo matemático que describa adecuadamente la relación entre concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo de la curva de calibración.^{50,51,52}
- iv. Precisión. Determinada en dos aspectos
Repetibilidad. Expresa el grado de concordancia o la precisión de una serie de mediciones bajo las mismas condiciones de operación dentro de un intervalo de tiempo corto. También es llamado precisión intra-ensayo.^{50,51,52}
Reproducibilidad. Refleja la precisión entre diferentes sitios de análisis, es decir, si un método puede ser utilizado en diferentes laboratorios.^{50,51,52}
- v. Exactitud. Expresa la desviación del valor medio de una gran serie de mediciones a partir del valor de referencia aceptado y se puede expresar en términos de sesgo. Debido a la gran carga de trabajo de análisis de series grandes, la veracidad se determina por lo general a partir de los resultados de un gran número de muestras de control de calidad (puntos o muestras control).^{50,51,52}
- vi. Estabilidad de la muestra. Determina las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el fármaco permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico.^{50,51,52}

III. Planteamiento del problema

Existen estudios que indican que posterior a un trasplante renal a un paciente, cuya farmacoterapéutica incluye la administración de micofenolato de mofetilo pro-fármaco de ácido micofenólico conlleva su respectivo monitoreo clínico. La farmacocinética de ácido micofenólico revela una alta variación inter e intra sujeto en sus concentraciones plasmáticas, que resalta la importancia de establecer y controlar las dosis adecuadas para cada paciente. Concentraciones del ácido micofenólico (metabolito activo del micofenolato de mofetilo) en los extremos del margen terapéutico pueden provocar consecuencias graves en los pacientes tales como el aumento de eventos adversos e incluso el rechazo del trasplante realizado.^{53,54,55,56}

En la literatura especializada existen reportes para cuantificar ácido micofenólico en fluidos biológicos, sin embargo, estos reportes describen condiciones que no se encuentran al alcance y/o son difíciles de implementar para una sencilla, rápida y confiable metodología analítica para ser aplicable como análisis rutinario para el monitoreo clínico de AMF como el que se pretende establecer para el Laboratorio de Farmacología en el CINVESTAV.^{57,58,59,60,61}

IV. Justificación

La individualización de tratamientos farmacológicos de fármacos con margen terapéutico estrecho, tales como el ácido micofenólico, hace necesario implementar y contar con metodologías analíticas sencillas, rápidas, confiables e idóneas para determinar fármacos en matrices biológicas sin la interferencia de sustancias endógenas o fármacos administrados concomitantemente; lo cual las hace indispensables para ser aplicados como análisis rutinarios y así, poder llevar a cabo el monitoreo clínico de fármacos tales como micofenolato de mofetilo a través de su metabolito activo el ácido micofenólico en pacientes con trasplante renal, que contribuya a la visión integradora de diversos aspectos (analíticos, farmacocinéticos, farmacodinámico, evolución del paciente, entre otros) para evitar que se produzca el rechazo del órgano trasplantado y la mejor profilaxis del paciente a largo plazo.

V. Objetivos

Objetivo general

- Establecer un método analítico para cuantificar ácido micofenólico en plasma humano.

Objetivos particulares

- Obtener las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación cuantitativa de ácido micofenólico en plasma humano usando CLAR con detección ultravioleta.
- Validar la metodología analítica para la determinación cuantitativa de ácido micofenólico en plasma humano usando CLAR con detección ultravioleta.
- Evidenciar la aplicabilidad del método en muestras plasmáticas de pacientes con trasplante renal, para determinar ácido micofenólico.

VI. Hipótesis

Al conseguir las condiciones físicas (tipo y proporción de fase móvil, velocidad de flujo) que logren separar adecuadamente los componentes de interés (ácido micofenólico y estándar interno) a una determinada longitud de onda por CLAR, de los componentes restantes en una muestra plasmática procesada proveniente de pacientes pediátricos con trasplante renal, se podrá determinar cuantitativamente dicho inmunosupresor y caracterizar las concentraciones plasmáticas de dicho fármaco con respecto al tiempo después de la administración del medicamento.

VII. Materiales

A. Equipos:

- Sistema cromatográfico marca HITACHI, ELITE LaChrom:
 - Módulo de detector UV modelo L-2400
 - Módulo de horno de columna modelo L-2300
 - Módulo de automuestrador modelo L-2200
 - Módulo de bomba modelo L-2130
- Columna marca Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 μm .
- Agitador vortex marca Scientific Industries, modelo Genie 2
- Agitador vortex multi-tubo marca IKA, modelo MS 3 Digital
- Centrifuga marca Eppendorf, modelo MiniSpin
- Balanza analítica marca Sartorius, modelo BL 210S
- Baño de ultrasonido marca Cole-Parmer, modelo 8845-40
- Baño de ultrasonido marca Bransonic, modelo 3510-R-MT
- Potenciómetro marca Beckman, modelo pH 32
- Placa de calentamiento y agitación marca Bearnstead/Thermolyne, modelo SP46925
- Ultra congelador marca ScienTemp, modelo 80-9.4A
- Pipeta de repetición electrónica marca Gilson, modelo Repetman
- Pipeta de repetición marca Eppendorf, modelo 4780
- Pipeta de volumen variable de 100-1000 μL , marca Dragon Lab
- Pipeta de volumen variable de 10-100 μL , marca Dragon Lab
- Refrigerador marca Metalfrio, modelo REB301

B. Materiales diversos

- Matraces volumétricos de 25, 20 y 1000 mL
- Probeta graduada de 500 y 1000 mL
- Puntas para pipeta de repetición
- Viales para automuestreador de 2 mL
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitado de vidrio de 50, 100, 250 y 1000 mL
- Gradillas
- Microtubos de 2 mL
- Puntas para pipeta de volumen ajustable de 100-1000 μ L
- Puntas para pipeta de volumen ajustable de 10-100 μ L
- Espátula
- Guantes de nitrilo
- Filtro tipo HVLP, 45 μ m

C. Sustancias de referencia

- Ácido micofenólico, Sigma-Aldrich, hecho en Israel, pureza \geq 98%, Lote: -#124M4011V, CAS 2428-93-1.
- Diclofenaco sódico, Sigma-Aldrich, hecho en China, pureza \geq 98.5%, Lote: #BCBN3367V, CAS 15307-79-6

D. Reactivos y disolventes

- Agua desionizada, tratada en el laboratorio de trabajo con sistema Millipore
- Metanol grado cromatográfico, CAS 67-56-1, J. T. Baker
- Acetonitrilo grado cromatográfico, CAS 75-05-8, Honeywell
- Fosfato de potasio monobásico cristal, CAS 7778-77-0, J.T. Baker
- Hidróxido de sodio, CAS 1310-73-2, J.T. Baker

VIII. Métodos

A. Establecimiento de condiciones.

Para el establecimiento de las condiciones cromatográficas, se llevó a cabo un análisis bibliográfico de reportes previos, y se propuso llevar a cabo el análisis bajo los siguientes escenarios:

- Fase móvil: acetonitrilio-fosfato de potasio monobásico (0.04 M, pH 6.0) en una proporción 40:60 v/v respectivamente
- Longitud de onda: 215 nm
- Columna: Xterra C-18, 3.5 μ m, 55 mm
- Sistema cromatográfico: HITACHI, ELITE LaChrom; módulo de detector UV modelo L-2400, módulo de horno de columna modelo L-2300, módulo de automuestrador modelo L-2200, módulo de bomba modelo L-2130
- Velocidad de flujo: 1.2 mL/min
- Temperatura: 40 °C
- Estándar interno: acemetacina

B. Preparación de soluciones:

- Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico, 0.04 M, pH 6.0 en agua. Se pesó 5.44 g de fosfato de potasio monobásico, se diluyó en un vaso de precipitado de 1000 mL con agua grado cromatográfico hasta disolver completamente, se ajustó el pH con una solución de NaOH concentrada a pH 6.0, se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó al aforo.
- Fase móvil. Mezcla de metanol:solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico, 0.04 M, pH 6.0 en una proporción 54:46 v/v respectivamente. Se midió en una probeta graduada 540 mL de metanol y 460 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico, transfiriendo en primer lugar la fase orgánica (metanol) y posteriormente la fase acuosa (solución de fosfatos) a un frasco de vidrio de 1000 mL con tapa de rosca. Se filtró con agitación y se sometió a baño de ultrasonido.

- Solución de lavado. Mezcla de acetonitrilo:agua (50:50 v/v). Se midió en una probeta graduada 500 mL de acetonitrilo y 500 mL de agua y se transfirieron a un frasco de vidrio con tapa de rosca de 1000 mL, se filtró con agitación y se sonico.
- Solución estándar de trabajo A (AMF, 250 µg/mL). Se pesó el equivalente a 5.0 mg de sustancia de referencia de AMF y se transfirió a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó al aforo con metanol.
- Solución estándar de trabajo B (AMF, 5 µg/mL). Se transfirió de la solución de trabajo A un volumen de 0.5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó al aforo con metanol.
- Solución de estándar interno (diclofenaco sódico, 200 µg/mL). Se pesó el equivalente a 5.0 mg de diclofenaco sódico y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se disolvió y se llevó al aforo con metanol.

C. Preparación de la curva estándar y muestras control en plasma.

En las tablas 1 y 2 se esquematiza la preparación de los puntos correspondientes a la curva de calibración y las muestras control en plasma.

Curva de calibración						
Punto	Concentración (µg/mL)	AMF Solución A (µL)	AMF Solución B (µL)	Diclofenaco Sódico E.I (µL)	Volumen de plasma (µL)	Volumen de extrayente MeOH (µL)
Blanco	-	-	-	-	100	900
0	0	-	-	50	100	850
1	0.5	-	100	50	100	750
2	1	-	200	50	100	650
3	5	20	-	50	100	830
4	10	40	-	50	100	810
5	20	80	-	50	100	770
6	40	160	-	50	100	690

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de AMF en plasma.

Muestras Control						
Control	Concentración (µg/mL)	AMF Solución A (µL)	AMF Solución B (µL)	Diclofenaco Sódico E.I (µL)	Volumen de plasma (µL)	Volumen de extrayente MeOH (µL)
Bajo	0.8	-	160	-	100	690
Medio	7.5	30	-	50	100	820
Alto	30.0	120	-	50	100	710
Diluido*	7.5	-	-	50	100	650

Tabla 2. Preparación de Muestras Control para cuantificación de AMF en plasma.

* La muestra control diluida (MCD) se obtuvo, realizando una muestra de plasma cargado de 75 µg/mL (esta se preparó agregando 300 µL de la solución de AMF de concentración 250 µg/mL y completando a 1 mL con plasma)

D. Extracción líquido-líquido

En un tubo eppendorf de 2 mL, se colocaron los volúmenes correspondientes de cada solución según lo indicado en las tablas 1 y 2. Se agitaron a 3000 rpm durante 200 segundos y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a viales con inserto y se inyectaron 60 µL al sistema cromatográfico.

E. Condiciones cromatográficas finales

- Fase móvil: metanol:fosfato de potasio monobásico (0.04 M, pH 6.0) en una proporción 54:46 v/v respectivamente.
- Longitud de onda: 215 nm
- Velocidad de Flujo: 1.5 mL/min
- Columna: ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 µm

F. Validación del método analítico para la cuantificación de AMF en plasma

- Selectividad. Se analizaron de forma individual 6 muestras plasmáticas de origen diferente usando las condiciones cromatográficas establecidas. Así como también soluciones de fármacos de uso común y que tienen una alta probabilidad de ser administrados concomitantemente con el AMF según lo descrito en la literatura.

- Curva de calibración. El intervalo de trabajo definido para este parámetro fue de 0.5 a 40 µg/mL, sin incluir la muestra blanco y la muestra cero. Se analizaron 3 curvas de calibración, (incluyendo para cada curva una muestra blanco de matriz y muestra cero). Se definió el modelo matemático que describiera adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta de cada curva.
- Límite inferior de cuantificación. Se evaluó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración.
- Precisión
 - Repetibilidad: Se analizaron en un mismo día, cinco réplicas de muestras control: límite inferior de cuantificación(LIC), muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM), muestra control alta (MCA) y muestra control diluida (MCD).
 - Reproducibilidad: Se evaluaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días las muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD.
- Exactitud. A partir de los datos de precisión, se calcularon los por ciento de recobro para cada muestra de control analizada.
- Estabilidad a corto plazo de la muestra procesada. Se evaluaron por triplicado la MCB y MCA después de su preparación y se almacenaron en condiciones de refrigeración (- 4°C) para su posterior análisis a las 24, 48 y 72 h.
- Estabilidad ciclo de congelamiento-descongelamiento de la muestra procesada. Se evaluaron por triplicado la MCB y la MCA después de su preparación y se almacenaron en condiciones de congelamiento (-40 °C) para su posterior descongelamiento (ciclo) y análisis, y repitiendo el mismo proceso de congelamiento-descongelamiento hasta haber completado 3 ciclos.

- Estabilidad ciclo de congelamiento-descongelamiento de la muestra no procesada. Se evaluaron por triplicado la MCB y la MCA donde posterior a su análisis inicial el fármaco en contacto con la matriz biológica se almacenó en condiciones de congelamiento (-40 °C) y posteriormente se descongeló para su análisis y repitiendo este mismo proceso hasta haber completado 3 ciclos.
- Estabilidad a largo plazo. Se evaluaron por triplicado las MCB y MCA que se almacenaron en condiciones de congelamiento (-40 °C) para su posterior análisis a los 0, 1, 2, 5, 7, 15, 30, 45 y 60 días.

G. Aplicabilidad del método, perfiles farmacocinéticos

Se determinó el contenido de ácido micofenólico a las muestras plasmáticas provenientes de cada paciente pediátrico con trasplante renal del que se tuvo disponibilidad, usando el método previamente validado. Se construyeron curvas concentración de ácido micofenólico contra tiempo para las muestras de los pacientes y se determinaron los parámetros farmacocinéticos: la concentración máxima alcanzada (C_{max}), el tiempo al que se alcanza la concentración máxima (t_{max}) y el Área Bajo de la Curva de tiempo 0 hasta 12 h.

IX. Resultados y análisis de resultados

El ácido micofenólico es un fármaco inmunosupresor usado ampliamente dentro de la farmacoterapia de pacientes con trasplante renal, entre otros. Para mejorar la biodisponibilidad oral del ácido micofenólico, se administra como micofenolato de mofetilo, el cual es absorbido rápidamente e hidrolizado por las esterasas a ácido micofenólico.^{22,26}

Diversos métodos han sido reportados para el análisis de AMF y sus metabolitos en diferentes fluidos biológicos, tales como: electroforesis, técnicas de inmunoensayos y cromatografía de líquidos, ésta última usando arreglo de diodos, fluorescencia, espectroscopia de masas y ultravioleta.^{44,46}

No obstante, la amplia variedad de métodos analíticos para la cuantificación de AMF, no todos ellos presentan la ventaja de ser sencillos, rápidos y adaptables a laboratorios analíticos de investigación o dentro de clínicas u hospitales donde el monitoreo del AMF es necesario. Bajo este contexto nuestro estudio se enfocó primeramente a analizar las metodologías analíticas por CLAR con detección ultravioleta, sin arreglo de diodos y sin uso de gradiente para la mezcla de fase móvil, dado que son condiciones no disponibles dentro de nuestro laboratorio y que pudieran ser por tanto aplicables a nuestros objetivos. Bajo estos importantes antecedentes y considerando la conversión de micofenolato de mofetilo a ácido micofenólico, las siguientes condiciones se propusieron como inicio para mostrar que la señal obtenida en el método fuera atribuida al AMF y/o las señales que pudieran observarse pudieran identificarse claramente para AMF y MFM además de la señal atribuida al estándar interno.

Fase móvil: acetonitrilo-fosfato de potasio monobásico (0.04 M, pH 6.0) en una proporción 40:60 v/v respectivamente; $\lambda = 215$ nm; columna: Xterra C-18, 3.5 μ m, 55 mm; velocidad de flujo: 1.2 mL/min; temperatura: 40 °C y el fármaco utilizado como estándar interno fue acemetacina.

Las condiciones señaladas anteriormente produjeron señales que no permitían la resolución del AMF ya que se presentaban señales sin las características típicas de picos de resolución adecuada, las cuales no permitían que la señal del ácido micofenólico lograra alcanzar que partiera y llegara a línea base, condición que no permitía una correcta integración del pico y por lo tanto el método no resultaba reproducible ni exacto.

Para resolver este problema se decidió modificar la proporción de la fase móvil hasta obtener una mejor separación, pero no se logró dicho objetivo, como consecuencia se optó por cambiar uno de los componentes de la fase móvil y usar como fase orgánica metanol, el cual era el mismo solvente que se utilizaba como extrayente para la preparación de las muestras tratando así de homogenizar el tipo de solvente utilizado. Se realizaron las pruebas con la nueva fase móvil resultando en una mejor resolución en la señal del AMF, pero que presentó un inicio por encima de la línea base, la cual, no obstante que se realizaron otros cambios de proporción de fase móvil, el problema persistió. Aunado a estos cambios, el tiempo de la señal del E.I. (acemetacina) se modificó presentando un tiempo de retención mucho mayor al ya establecido con la fase móvil anterior, por lo cual se decidió cambiar el estándar interno por otro fármaco que presentaran una detección a la longitud de onda de 215 nm.

Indometacina, naproxeno sódico y diclofenaco sódico se probaron como posibles estándar interno. El diclofenaco sódico fue quien presentó una mejor resolución, y un tiempo de retención aceptable dentro del criterio que se estableció para una corrida analítica de máximo 10 minutos. Ya con una señal definida del estándar interno, se decidió aumentar la velocidad de flujo y modificar la proporción de la fase móvil para reducir el tiempo de la corrida analítica, lográndose una corrida analítica de 8 minutos aproximadamente sin incremento significativo de la presión, resultando en una separación de señales como lo muestra el cromatograma de la figura 3. En el cual se puede observar que no obstante hay una adecuada resolución entre las señales de interés (AMF y el diclofenaco como estándar interno), ambas señales no presentan simetría en el pico obtenido como señal. Condición que no impide sean

seleccionadas como adecuadas en el método, en virtud a que con ayuda del software puede definirse la correcta integración de los mismos, bajo esta justificación se define finalmente que las condiciones mencionadas en el apartado VIII inciso E, y que generaron estas señales se eligieron como condiciones finales para la separación cromatográfica.

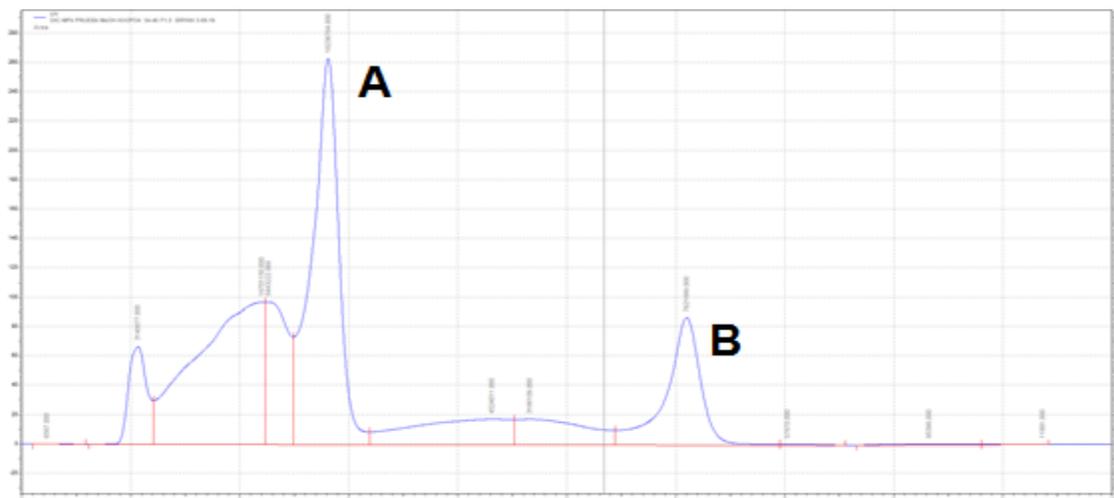


Figura 3. Señal de ácido micofenólico (A) y diclofenaco sódico (B), generadas con la aplicación de las condiciones del método analítico propuesto en muestras en solución.

Dado que la validación de una metodología analítica permite el conocimiento de las características de funcionamiento de la misma y proporciona su grado de confiabilidad en los resultados obtenidos al aplicarlo, una vez definidas las mejores señales bajo las condiciones de experimentación estudiadas se procedió a la siguiente etapa de este estudio que fue la validación del método.^{49,50}

Para el parámetro de selectividad, la evaluación de seis plasmas individuales analizados, no evidenciaron alguna interferencia por parte de la matriz biológica con los tiempos de retención del analito de interés (2.96 min) y el E.I. (7.17 min) utilizados, ya que durante la corrida analítica no se observó ninguna señal, como lo muestra el cromatograma de la figura 4 inciso A. Una diferencia de 4.21 minutos entre las señales de los compuestos mencionados, indica que cumple uno de los requisitos para una resolución adecuada de los compuestos (figura 4, inciso B), no obstante, persiste la no simetría de las señales.

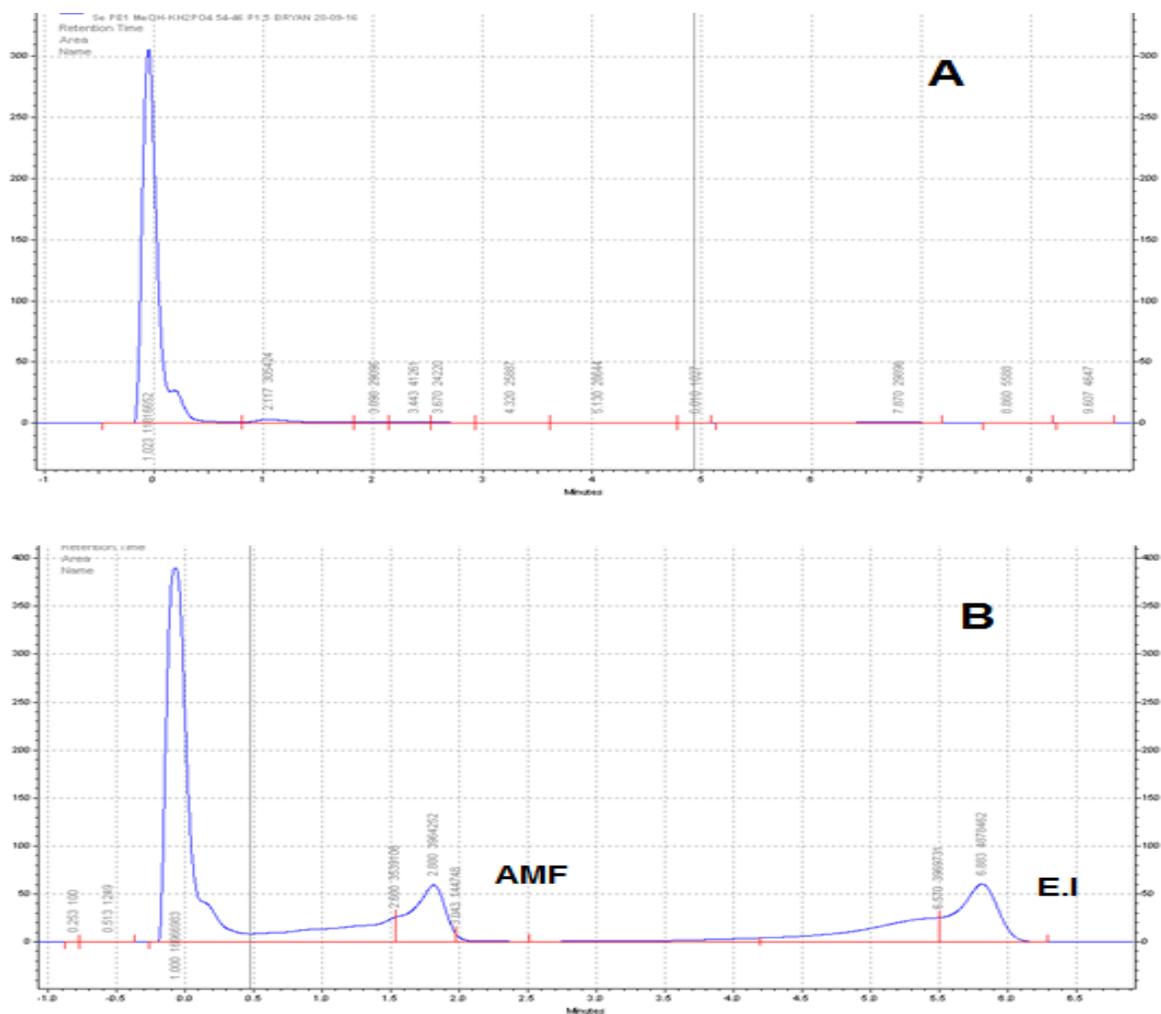


Figura 4. Selectividad. Señales generadas en la evaluación del plasma humano (A) y señales del AMF y E.I. generadas con la aplicación del método analítico en plasma humano (B).

En virtud a que se pretende que el método sea aplicado a muestras de pacientes, la evaluación del parámetro de selectividad también se determinó en las muestras plasmáticas con la presencia de fármacos de uso común y/o uso concomitante con MFM. En la tabla 3 se presentan los fármacos evaluados para este parámetro y sus respectivos tiempos de retención en los cuales emitieron una señal, al ser comparados con los tiempos de retención de AMF y el E.I., nos permiten sugerir que no se evidenció interferencia de estos fármacos con los tiempos de retención del AMF y el E.I. debido a que en ningún caso se presentó una señal significativa que pudiese interferir durante la corrida analítica con las condiciones establecidas.

Fármaco	Tiempo de retención (min)
Ácido acetilsalicílico	1.2
Ácido salicílico	1.2
Ambroxol	0.8
Bromhexina	2.0, 2.5
Dapsona	1.2
Pravastatina	0.8
Cafeína	1.8
Ciclosporina A	2.0
Acetaminofén	1.2
Captopril	-
Pseudoefedrina	1.3

Tabla 3. Evaluación de Selectividad. Tiempos de retención de los fármacos de uso común y/o uso concomitante con MFM.

El intervalo de concentraciones de AMF definido para evaluar la proporción entre la concentración del mismo y su respuesta analítica (Relación de Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del AMF/ Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del E.I) dio como resultado un gráfico como el que se muestra en la siguiente figura 5.

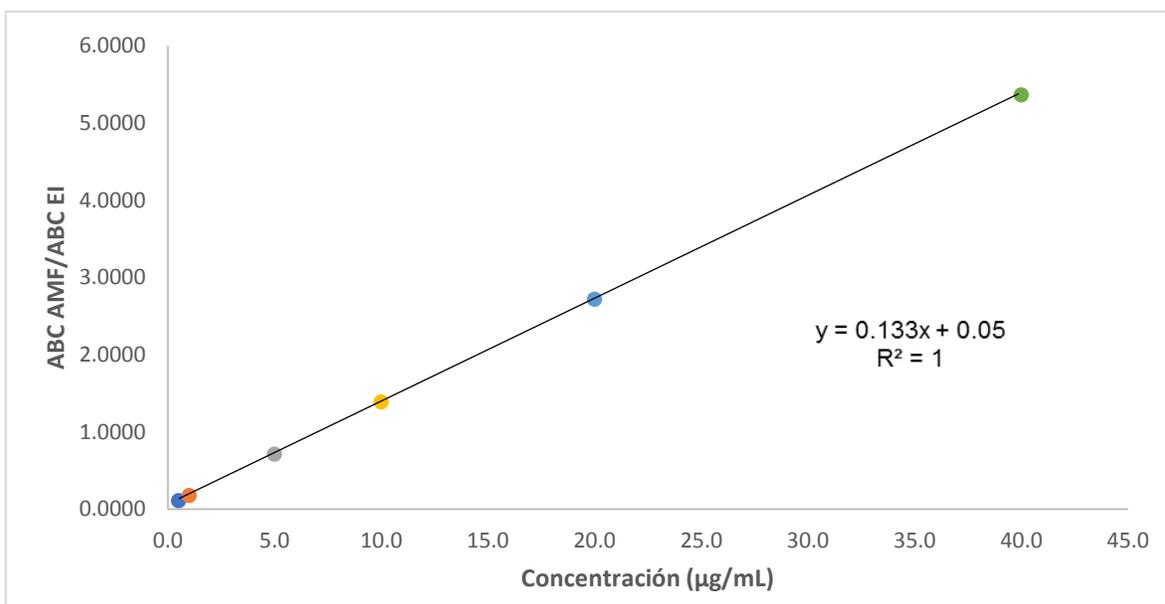


Figura 5. Curva de calibración promedio evaluada para la cuantificación de AMF en plasma. Cada punto representa el promedio de 3 repeticiones \pm su desviación estándar.

El valor alto del coeficiente de determinación obtenido ($r^2 > 0.99$) para los datos representados en la figura 3, generó una proporción lineal alta del tipo $y = mx + b$. Indicando que el método propuesto en el intervalo de trabajo analizado (0.5 – 40 $\mu\text{g/mL}$) tiene la capacidad para obtener una respuesta proporcional a la concentración de AMF en muestras plasmáticas, no evidenciándose un coeficiente de variación mayor a 15 % en los niveles de concentración analizados por triplicado en una corrida analítica, además de un % de desviación no mayor a 20 % para el nivel más bajo de la curva y 15 % para los otros niveles de la curva de calibración (véase Tabla 4 y 5).

Conc. nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Relación de áreas			Promedio	% C.V.
	Curva A	Curva B	Curva C		
Blanco	-	-	-	-	-
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5	0,1117	0,1189	0,1045	0,1117	1.5572
1.0	0,1763	0,1769	0,1756	0,1763	0.0731
5.0	0,7138	0,7260	0,7045	0,7147	0.2156
10.0	1,3813	1,3879	1,4000	1,3897	0.0938
20.0	2,7350	2,7290	2,6903	2,7181	0.1208
40.0	5,3787	5,3647	5,3466	5,3633	0.0402

r^2	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
m	0.1335	0.1329	0.1325	0.1330
b	0.0475	0.0556	0.0469	0.0500

Tabla 4. Variabilidad de la Curva de Calibración. Relación de Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del AMF/ Área Bajo la Curva del pico cromatográfico del E.I. Para cada nivel de concentración se presenta su respectivo valor de % de coeficiente de variación.

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			Conc. Recuperada Promedio ($\mu\text{g/mL}$)	% de desviación promedio
	Curva A	Curva B	Curva C		
Blanco	-	-	-	-	-
0.0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5	0.4811	0.4764	0.4345	0.4640	-7.1943
1.0	0.9651	0.9126	0.9706	0.9494	-5.0597
5.0	4.9912	5.0426	4.9610	4.9983	-0.0346
10.0	9.9922	10.0216	10.2080	10.0737	0.7367
20.0	20.1327	20.1103	19.9430	20.0622	0.3111
40.0	39.9378	39.9366	39.9829	39.9524	-0.1190

Tabla 5. Curva de Calibración. Concentraciones recuperadas obtenidas al interpolar la relación de áreas calculada en el modelo matemático obtenido de cada curva de calibración. Para cada nivel de concentración se presenta su respectivo valor de % de desviación promedio.

La evaluación de la precisión del método se determinó en términos de repetibilidad y reproducibilidad analizando las muestras control (MC) mencionadas en la metodología (apartado VIII, inciso F).

Las concentraciones obtenidas de las MC obtenidas al interpolar las respuestas (ABC AMF/ABC E.I) en el modelo matemático de la corrida analítica previamente analizada para determinar la repetibilidad o precisión intra día, indican que en ningún nivel de las MC (alto: 30.0 µg/mL, medio 7.5 µg/mL, bajo 0.8 µg/mL o de dilución 7.5 µg/mL) o límite de cuantificación (0.5 µg/mL), se alcanzó un %C.V. mayor al especificado en el límite de especificación establecido es decir, 15% para las MCB, MCM, MCA y MCD, y para el LIC del 20%.⁵¹ Tal como puede observarse en la figura 6.

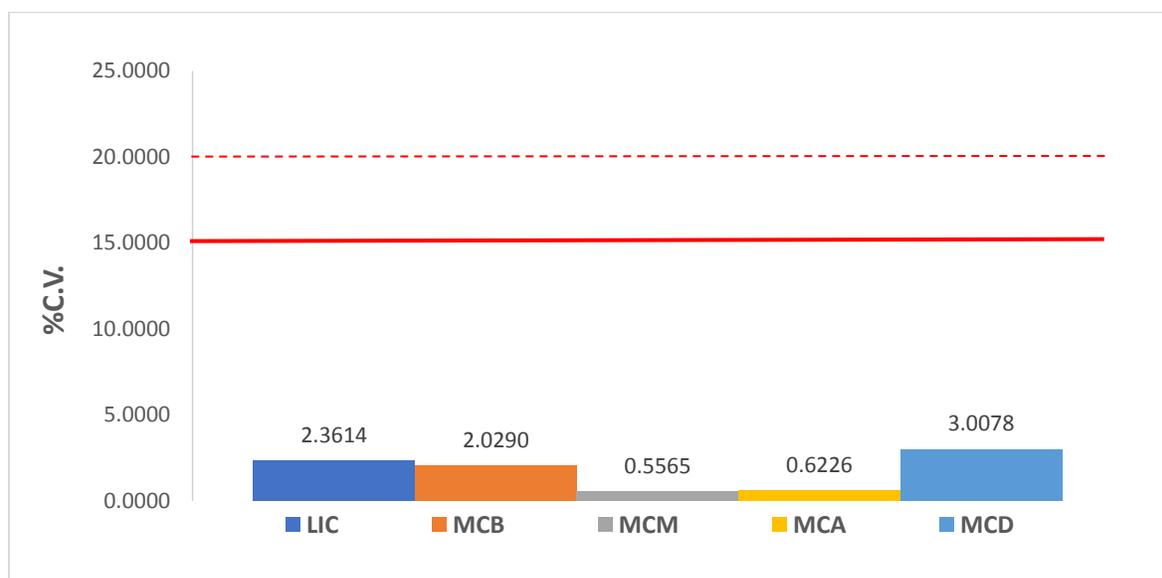


Figura 6. Repetibilidad del método. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para las muestras LIC, MCB, MCM, MCA y MCD establecidas para la repetibilidad del método. Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.

Los resultados obtenidos en la figura 6, sugieren que el método analítico tiene un alto grado de concordancia entre los resultados experimentales cuando se aplicó el método cinco veces bajo las mismas condiciones (en un mismo día) en cada nivel de concentración establecido (MCB, MCM, MCA y MCD, y LIC), no mostrando la

presencia de errores sistemáticos atribuidos a la metodología y/o analista de forma significativa como puede observarse en los valores individuales para cada nivel de muestras control. (Tabla 10 en el anexo A).

Los resultados del análisis de muestras plasmáticas adicionadas con AMF por quintuplicado en dos días diferentes, para determinar la reproducibilidad del método se presentan en las figuras 7-12. En ellas se pueden observar las variaciones (representadas como %C.V.) de las concentraciones recuperadas obtenidas por los cinco niveles de concentración evaluados: MCB, MCM, MCA, MCD, y LIC por día de análisis.

En las figuras 7-11 también, se puede observar que los valores %C.V. determinados en cada día de análisis se encuentran muy por debajo de las especificaciones para las MCB, MCM, MCA y MCD menor o igual del 15%, y para el LIC menor o igual al 20% como lo establece la NOM-177-SSA1-2013.

Las muestras control de LIC y MCB para este parámetro fueron las que presentaron una variación mayor del porcentaje recuperado, pero sin salir del criterio de aceptación establecido.⁵¹ La mayor variación observada para estas concentraciones es explicada por el hecho que para obtener o preparar estas concentraciones las condiciones experimentales parten de la obtención de soluciones y/o volúmenes pequeños en los cuales la probabilidad de incurrir en imprecisiones al medirlos es alta. La mayor variabilidad en las concentraciones para el LIC y MCB también se puede observar en la Figura 12, donde se han representado los %C.V. del valor promedio de las determinaciones en los 2 días en que se realizó la reproducibilidad del método. Los valores individuales para cada muestra control en los diferentes días de análisis se presentan en la tabla 11 del anexo A.

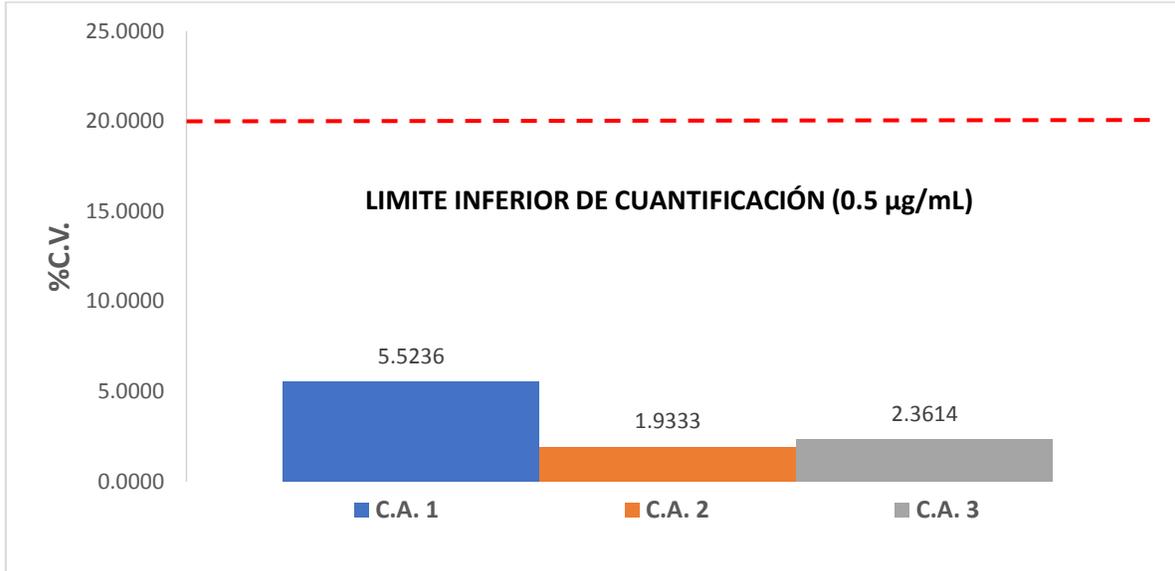


Figura 7. Reproducibilidad para el LIC. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis del LIC en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.

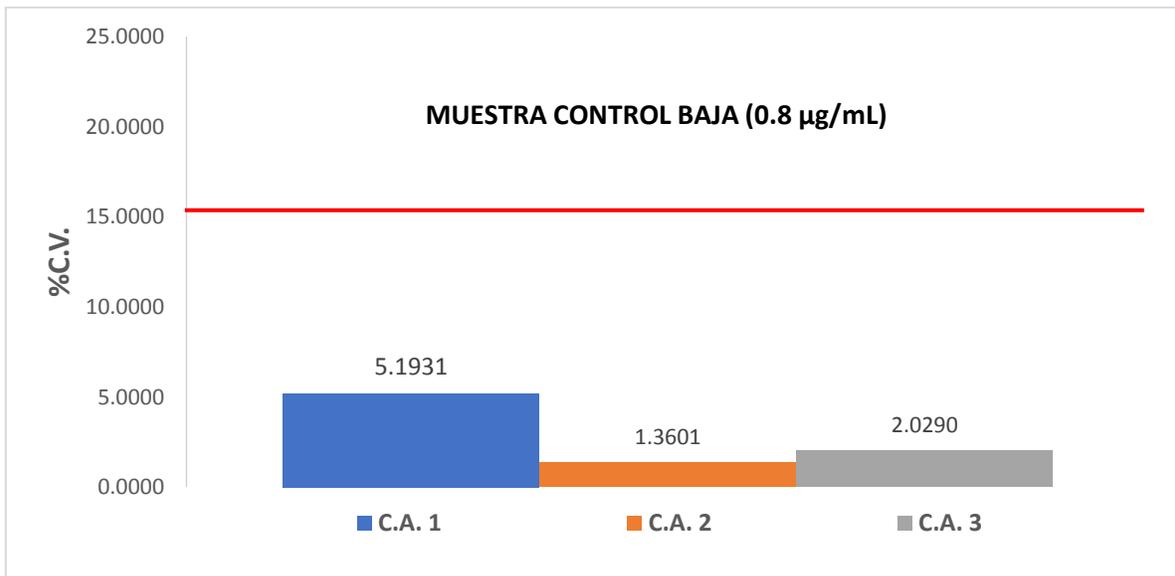


Figura 8. Reproducibilidad para el MCB. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCB en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el % C.V. de 5 réplicas.

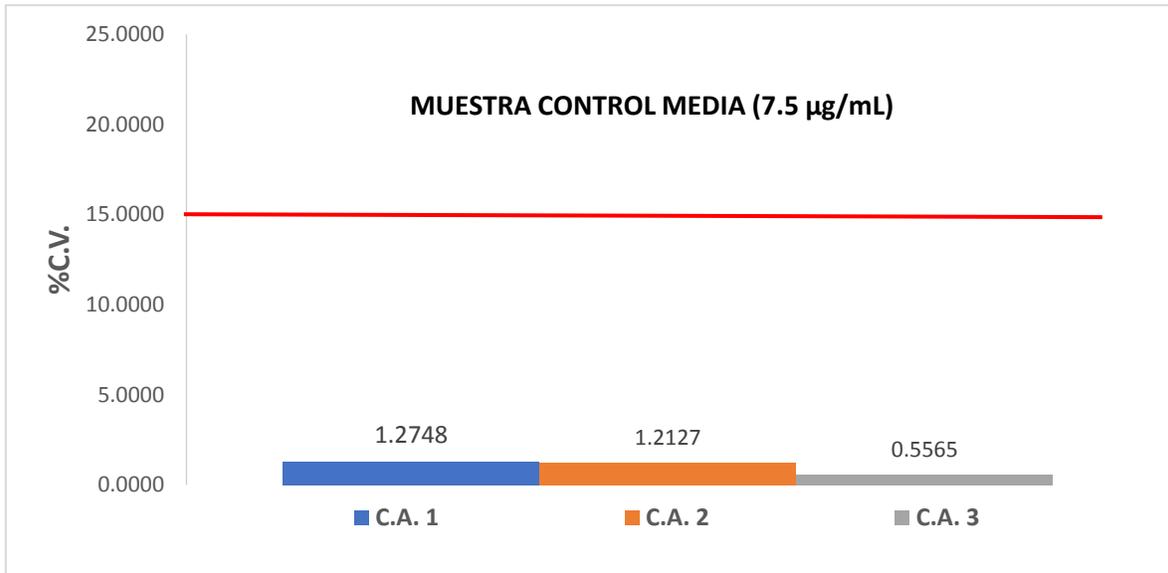


Figura 9. Reproducibilidad para el MCM. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCM en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.

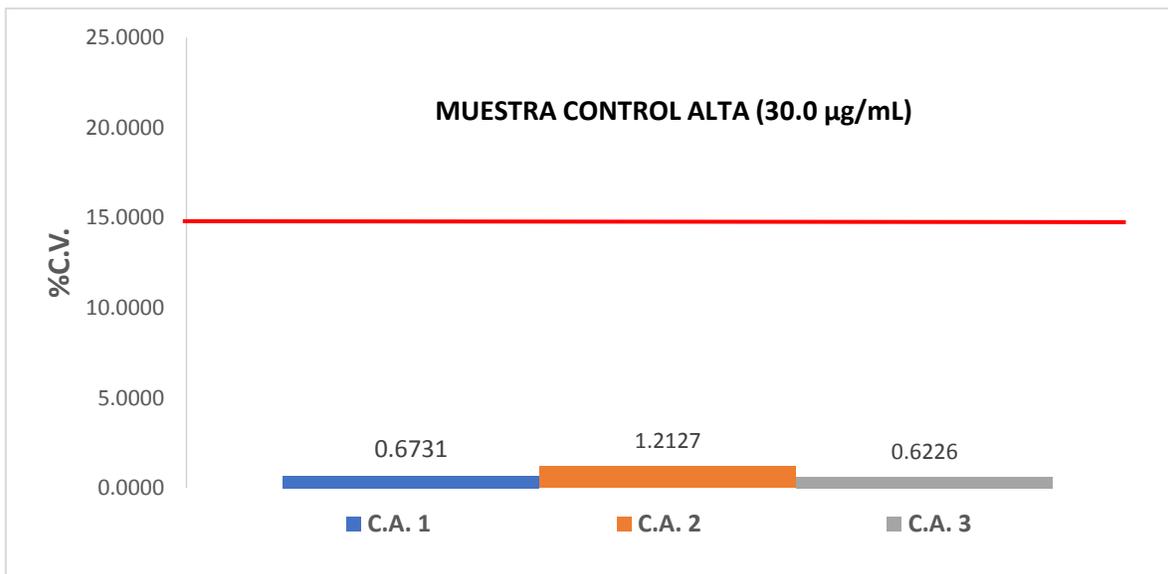


Figura 10. Reproducibilidad para el MCA. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCA en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.

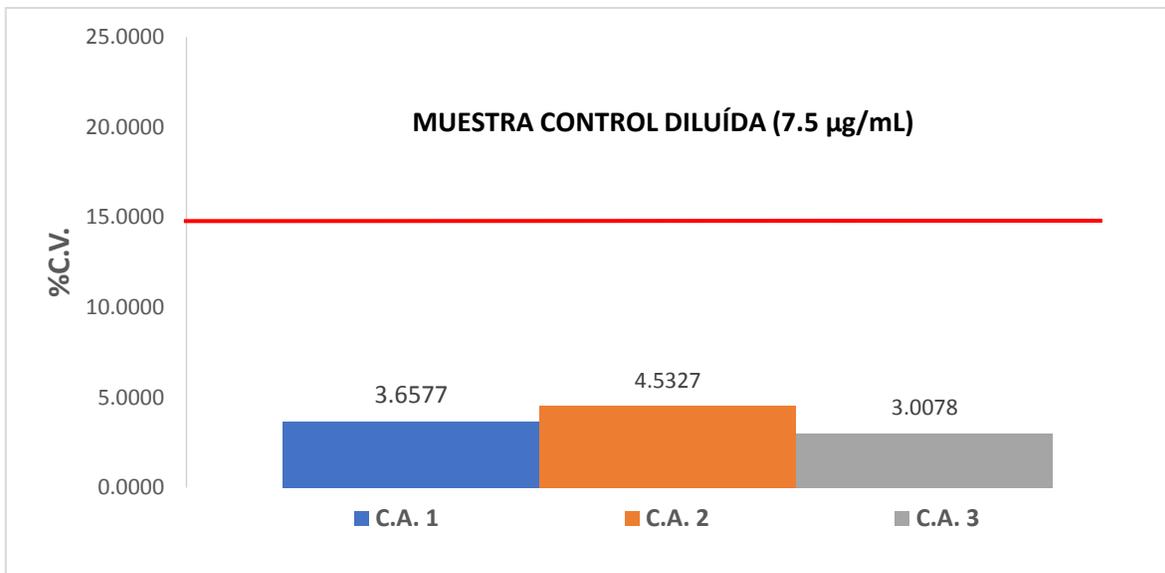


Figura 11. Reproducibilidad para el MCD. Valores del %C.V. de las concentraciones recuperadas para el análisis de las MCD en dos días diferentes (C.A.1, C.A.2, y C.A.3). Cada valor representa el %C.V. de 5 réplicas.

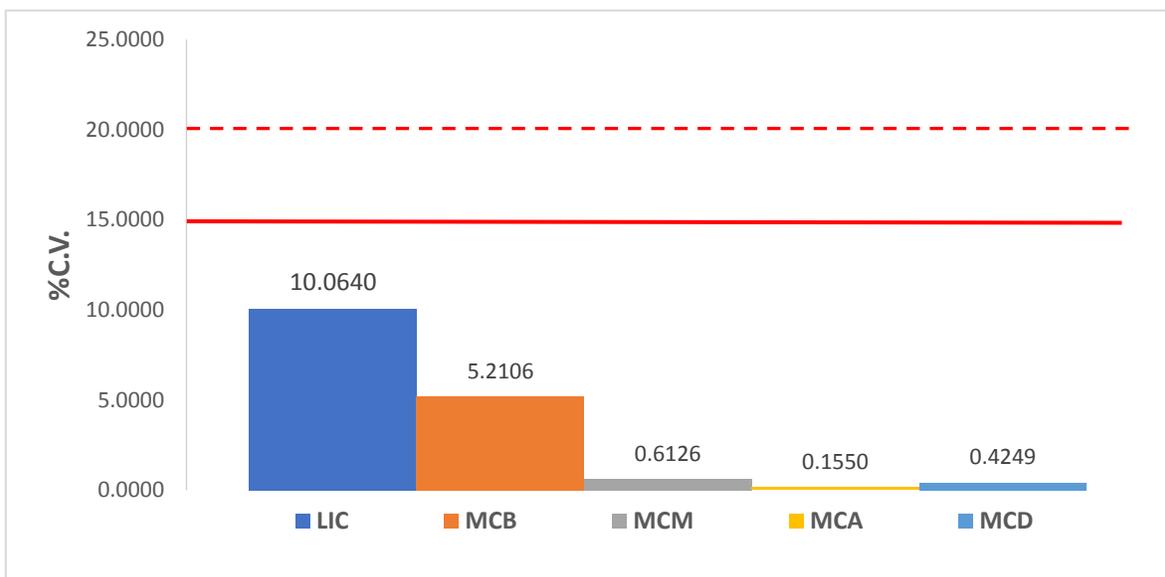


Figura 12. Reproducibilidad promedio para LIC, MCB, MCM, MCA y MCD. Valores del %C.V. promedio de las concentraciones recuperadas para el análisis del LIC, MCB, MCM, MCA y MCD.

La evaluación del límite inferior de cuantificación en la validación, se tornó crítica en el estudio, considerando la no simetría en nuestras señales. En el cromatograma presentado en la figura 13, se puede observar que la señal generada por el AMF

La capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles a un valor verdadero (exactitud) fue determinada a partir de los análisis realizados para determinar la precisión del método. En las figuras 14-17 se observan los porcentajes recuperados promedio y la de desviación correspondientes al valor nominal (100%) para cada muestra control (MC) en tres corridas diferentes. En todos los casos se puede observar que las desviaciones no son más grandes del 10 por ciento, excepto para la muestra diluida.

La muestra diluida alcanza en dos corridas 15 y 17 %, más del por ciento de recuperación del valor nominal (100%), los cuales aun cuando son mayores a los obtenidos en las restantes MC analizadas no sobrepasan el criterio de aceptación (20 % de desviación para concentraciones bajas).

Considerando que todos los niveles de concentración de las muestras control analizadas se encuentran dentro del límite de especificación menor o igual al 15 % para cada MC incluso el límite de cuantificación ⁵¹. A diferencia de la precisión, que refleja el error aleatorio, la exactitud refleja el error sistemático o la tendencia a él, cuando existen interferencias en el método por falta de selectividad, o cuando existen condiciones que pueden contribuir al error sistemático tal como la etapa extracción líquido-líquido en nuestro método. Los resultados obtenidos muestran que errores como los mencionados están controlados, se presentan de forma constante y no contribuyen a una desviación mayor a la estipulada en el criterio de aceptación normativo, aun cuando se obtiene el promedio en las tres corridas analíticas como puede observarse en la figura 17. Los valores numéricos individuales para cada muestra control que se representan en las figuras 14 a 17, se encuentran en la tabla 12 del anexo A.

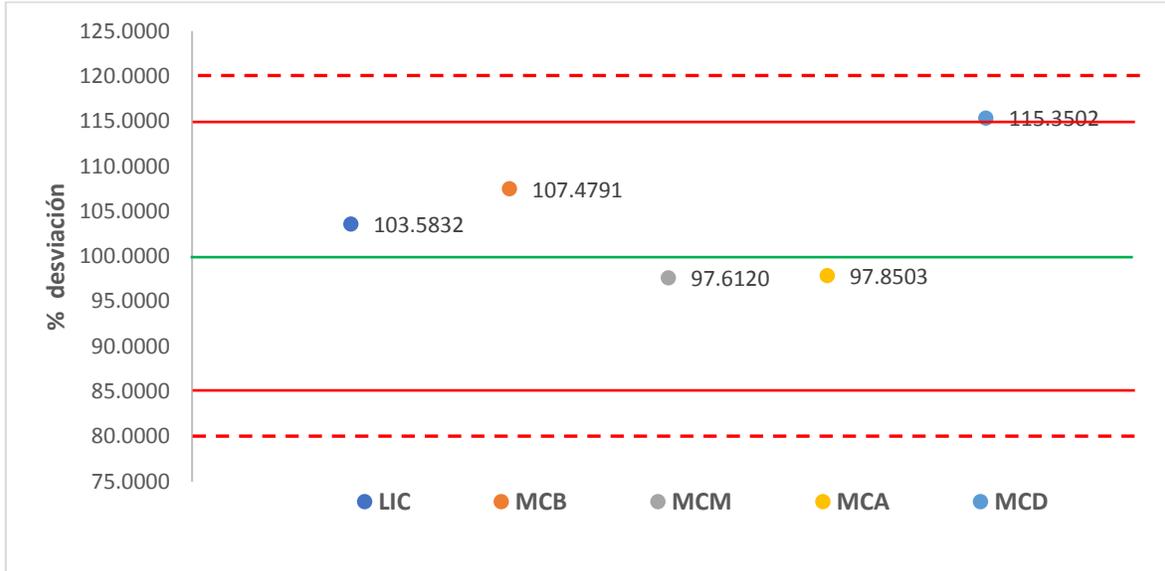


Figura 14. Exactitud del método corrida analítica 1. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.

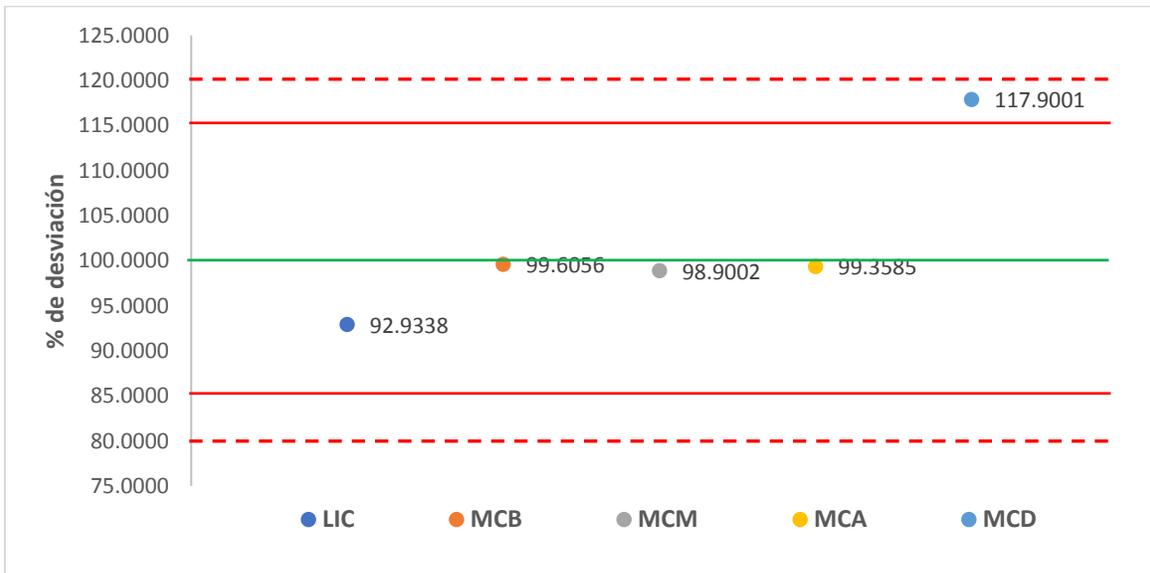


Figura 15. Exactitud del método corrida analítica 2. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.

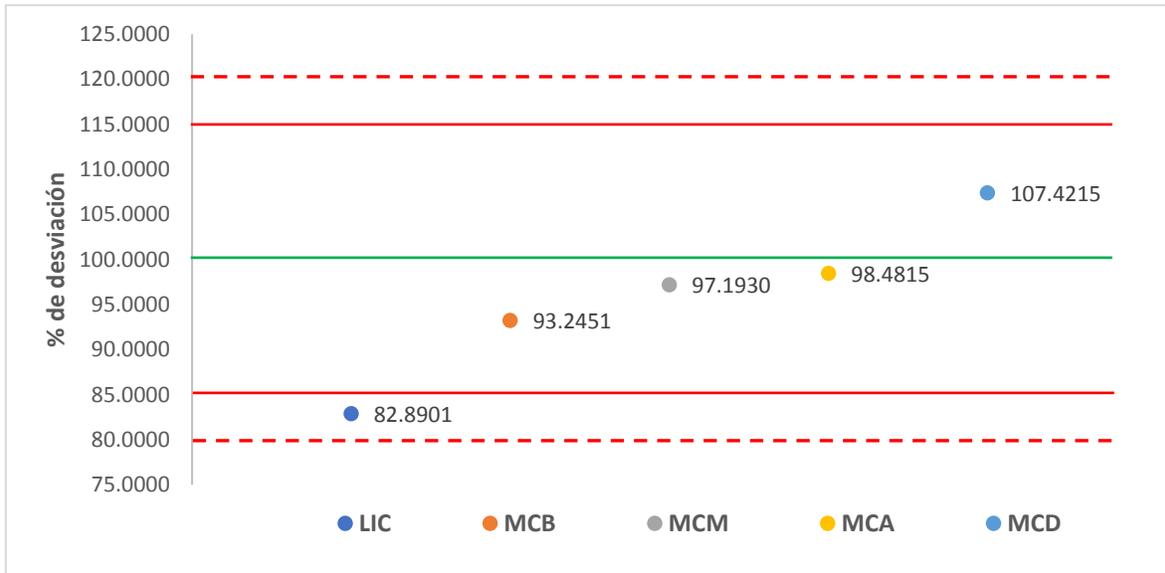


Figura 16. Exactitud del método corrida analítica 3. Desviaciones del por ciento recuperado promedio de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud.

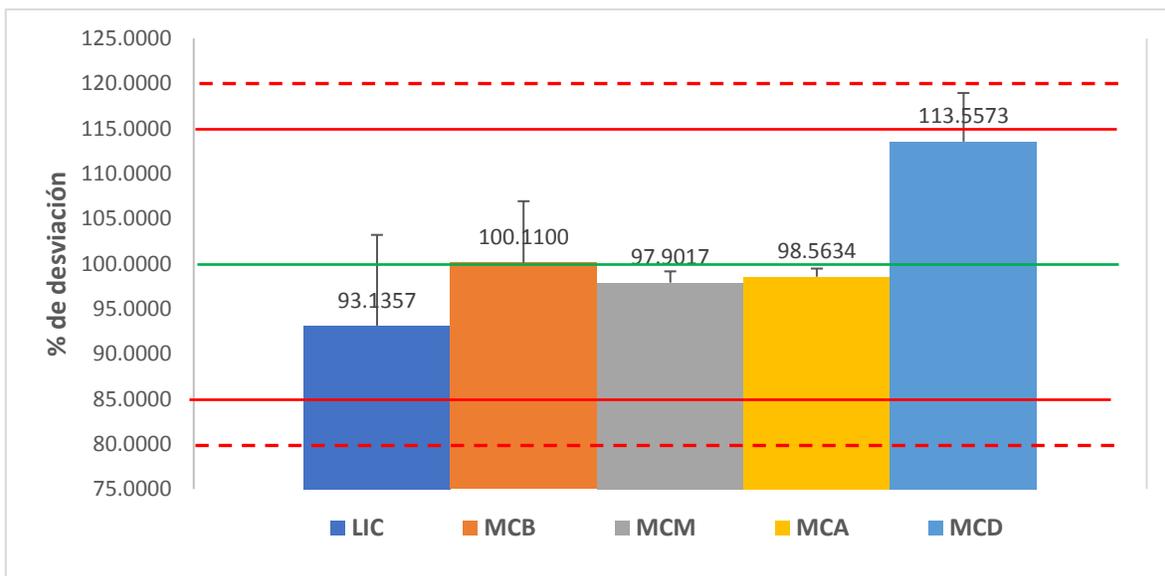


Figura 17. Exactitud del método. Promedio de las desviaciones del por ciento recuperado de muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA y MCD con respecto a valor nominal de 100 % obtenidos para la evaluación del parámetro de exactitud. Cada valor representa el promedio de tres corridas analíticas.

Asegurar la estabilidad del producto de interés (analito) es otro de los parámetros contemplados en la validación de un método bioanalítico.⁶² Por lo general para este tipo de estudio los análisis no se realizan inmediatamente después de la colección de las muestras biológicas, es esencial que el producto de interés se mantenga en las condiciones de almacenamiento definidas, para garantizar que los resultados de concentración obtenidos no muestren cambios significativos después del muestreo y resguardo de las muestras.⁶³⁻⁶⁴ La evaluación de la estabilidad debe llevarse a cabo para garantizar que cada etapa del análisis de la muestra asegure la integridad del analito, lo que significa que las condiciones aplicadas a los ensayos de estabilidad, como la matriz de la muestra, el anticoagulante, los materiales del envase, las condiciones de almacenamiento y condiciones analíticas, deben ser similares a las utilizadas para las muestras de estudio reales.⁶⁵⁻⁶⁷ La normatividad mexicana (NOM-177-SSA1-2013), señala la evaluación de la estabilidad a corto plazo, a largo plazo, la estabilidad de la muestra procesada, estabilidad en el automuestreador y estabilidad ciclos de congelación-descongelación. En nuestro estudio, se realizó la estabilidad a corto plazo de muestra procesada y la evaluación de ciclos de congelación y descongelación de la muestra procesada.

En las figuras 18 y 19 se presentan los resultados obtenidos de la estabilidad para las muestras control bajo (0.8 µg/mL) y la muestra control alta (30.0 µg/mL), cuando se realizó una estabilidad de muestra procesada a corto plazo (24, 48 y 72 h). Los resultados presentados de la MCB muestran desviaciones al valor teórico, pero éstas no contribuyen para que los valores obtenidos estén fuera de los límites de especificación establecidos en la NOM-177-SSA1-2013. Los resultados obtenidos para la MCA indican también una exactitud y precisión adecuada y suficiente para cumplir con los criterios establecidos para el parámetro, con lo cual se puede sugerir que las muestras procesadas y resguardadas en refrigeración (-4°C) pueden ser analizadas tres días después de ser procesadas y asegurar que los resultados obtenidos son confiables. Los valores individuales que se representan en las figuras 18 y 19, se encuentran en la tabla 13 del anexo A.

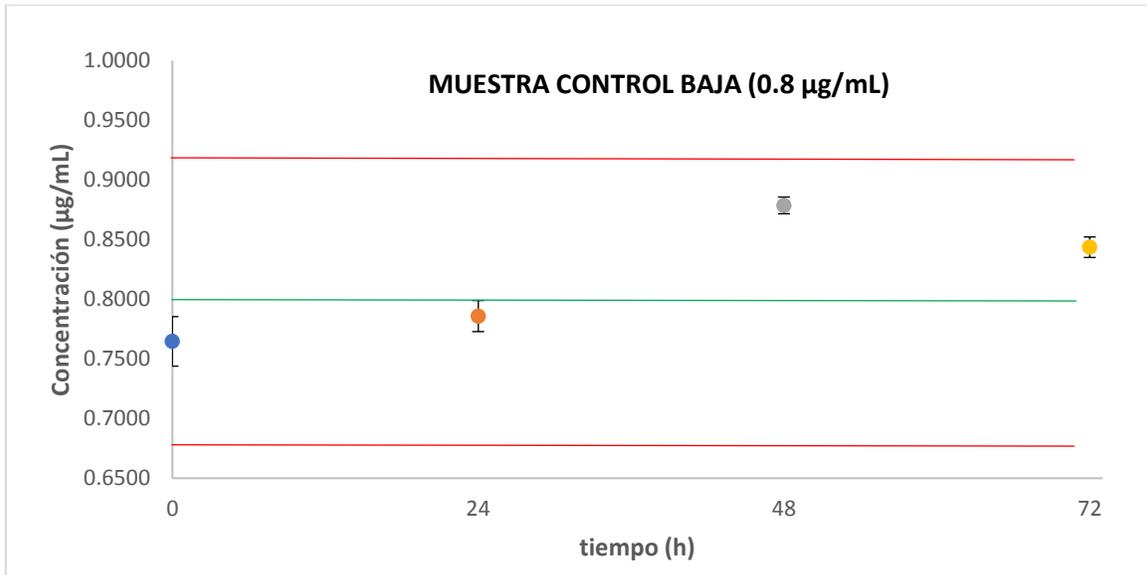


Figura 18. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada para MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis a las 0, 24, 48, y 72 h. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

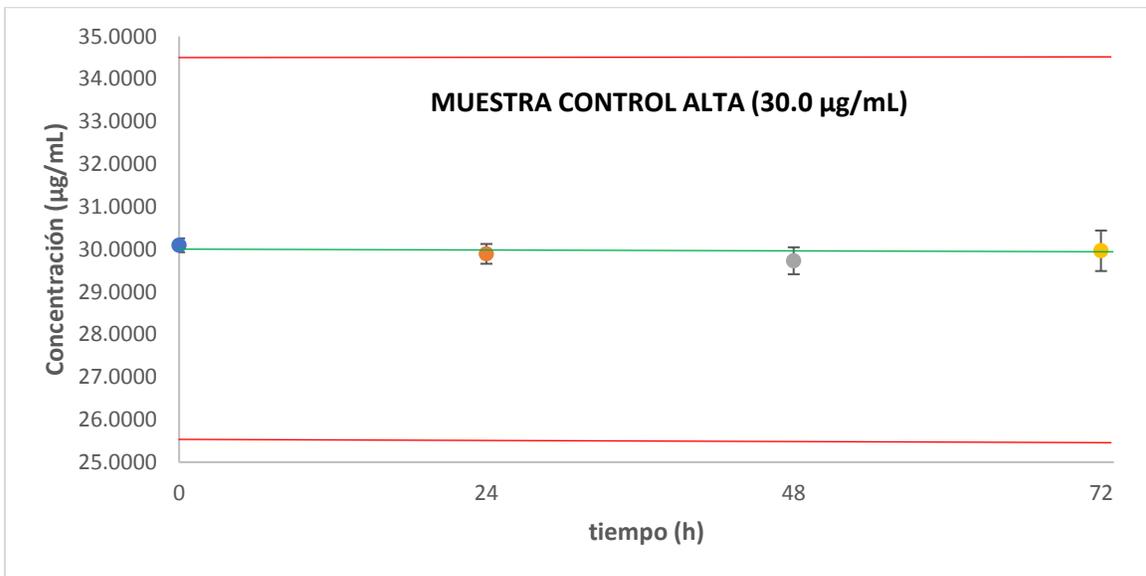


Figura 19. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada para MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30.0 µg/mL) y resguardadas para análisis a las 0, 24, 48, y 72 h. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

Otro aspecto de la estabilidad del AMF en nuestro estudio, fue retar a muestras control (MCB y MCA) procesadas y sin procesar a ciclos de congelamiento-descongelamiento. El promedio de las concentraciones recuperadas de las muestras control obtenido en tres ciclos de congelamiento-descongelamiento cuando éstas fueron procesadas y cuando estuvo en contacto directo con la matriz biológica y fueron procesada antes del análisis, se presentan en las figuras 20 y 21 y figuras 22 y 23 respectivamente. En ambos casos se evidencia que, durante todos los análisis posteriores a los ciclos de congelamiento-descongelamiento, las muestras continuaron cumpliendo el criterio establecido para la estabilidad: la concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal⁵¹. Dado que la desviación observada en ningún caso sobrepaso los límites de especificación establecidos para ambos niveles de concentración estudiados (MCB=0.8 µg/mL y MCA= 30.0 µg/mL). Se concluye que las muestras después de tres ciclos de congelación-descongelación siguen manteniendo sus propiedades, por lo que un análisis posterior a estos ciclos como máximo, permitirá la obtención de resultados confiables. Los valores individuales que se representan en las figuras 20 y 21 y figuras 22 y 23, se encuentran en las tablas 14 y 15 respectivamente del anexo A.

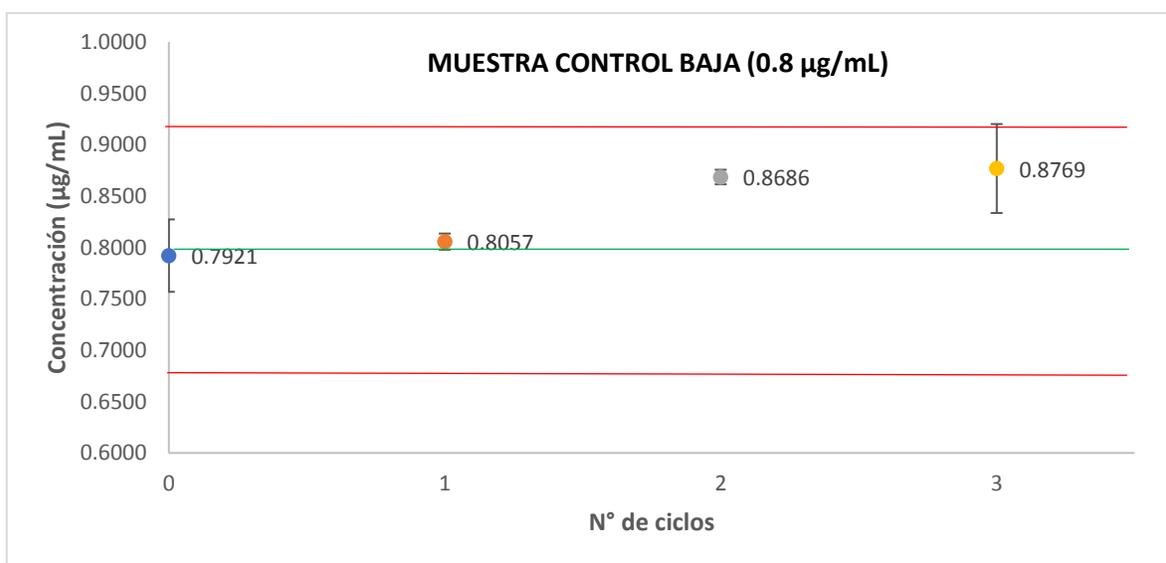


Figura 20. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra procesada para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

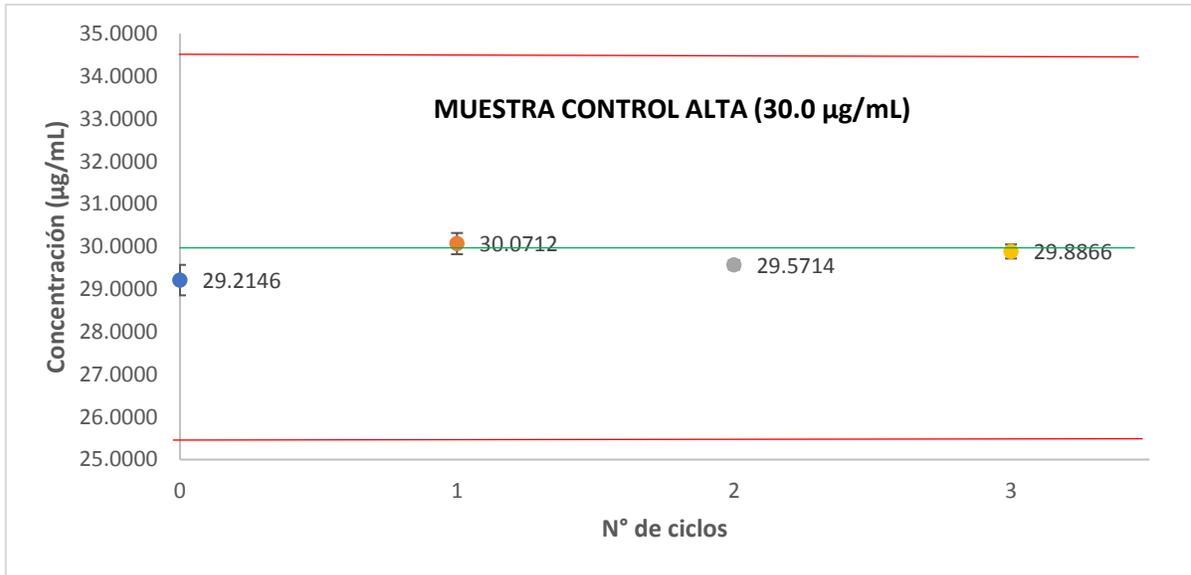


Figura 21. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra procesada para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30.0 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

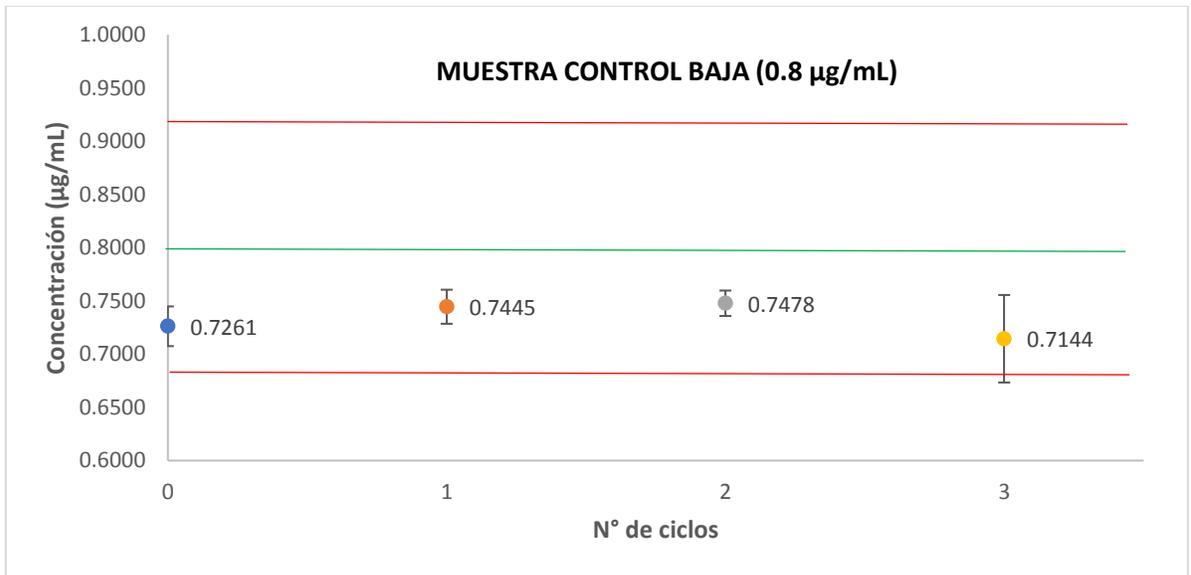


Figura 22. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra no procesada para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas procesadas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

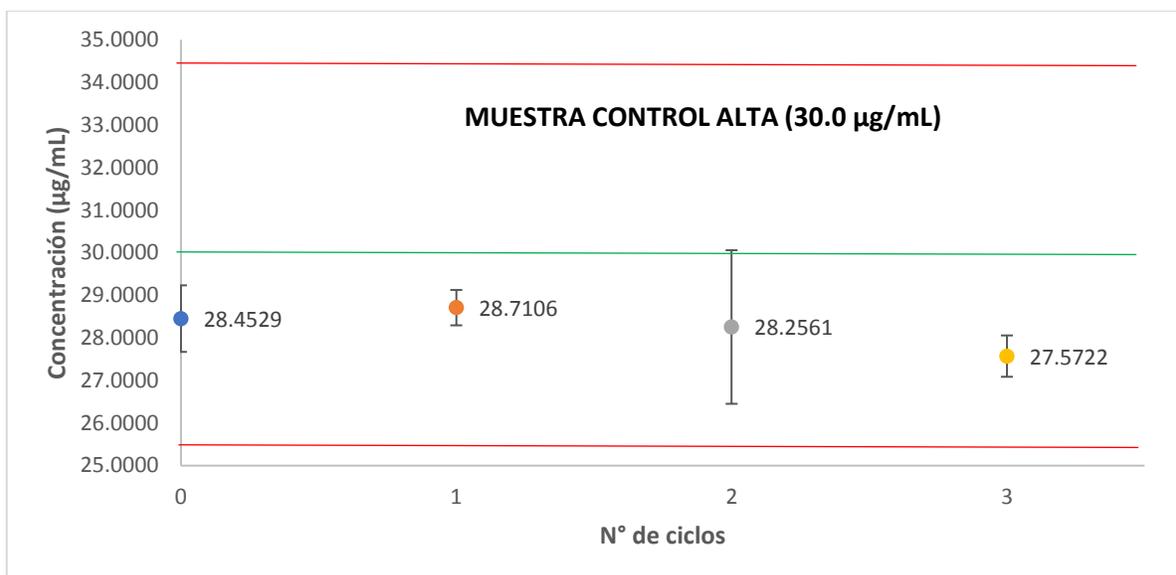


Figura 23. Ciclos congelamiento-descongelamiento de muestra no procesada para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas procesadas (30.0 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

Finalmente para concluir con el parámetro de estabilidad, la evaluación de las muestras control bajas y altas almacenadas bajo condiciones de congelamiento a largo plazo, evidencio que las MC mantienen sus propiedades hasta 60 días, que fue el tiempo máximo que se realizó la prueba, ya que durante todos los análisis de la muestra a diferentes tiempos aunque hubo una ligera variación en las concentraciones obtenidas, éstas se mantienen dentro de las especificaciones marcadas en la NOM-177-SSA1-2013, donde el por ciento de desviación fue menor al 15 % en todos los casos de las MCB y MCA como se muestra en las figuras 24 y 25 respectivamente, dando como resultado que un análisis de muestras problema almacenadas hasta dos meses como máximo bajo las condiciones de almacenamiento evaluadas arrojaran resultados confiables. Los valores individuales que se representan en las figuras 24 y 25, se encuentran en la tabla 16 del anexo A.

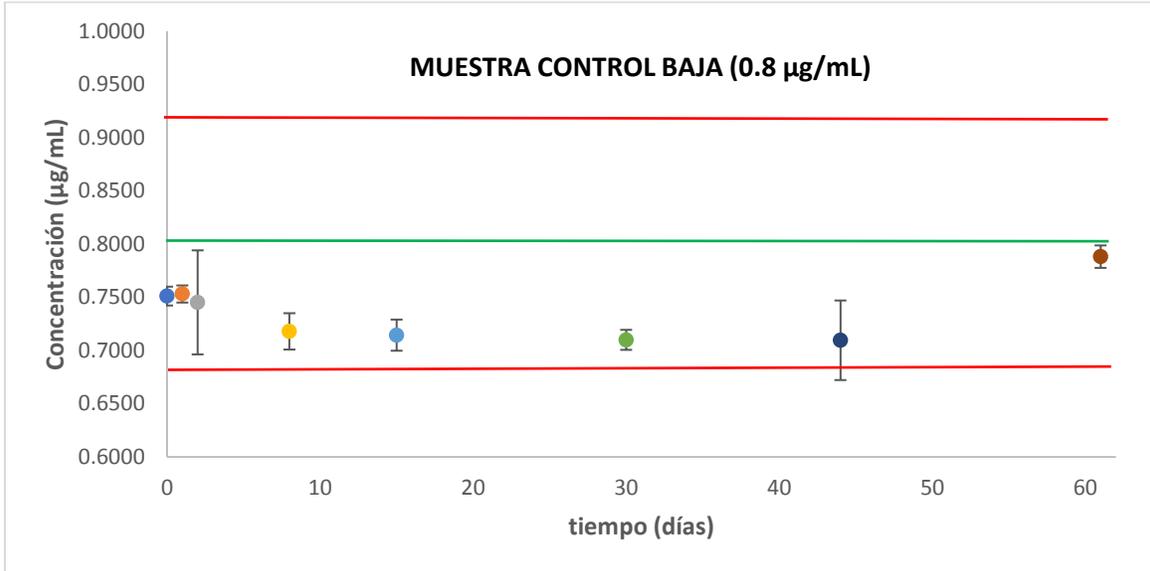


Figura 24. Estabilidad a largo plazo para la MCB. Concentraciones obtenidas de muestras control bajas (0.8 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

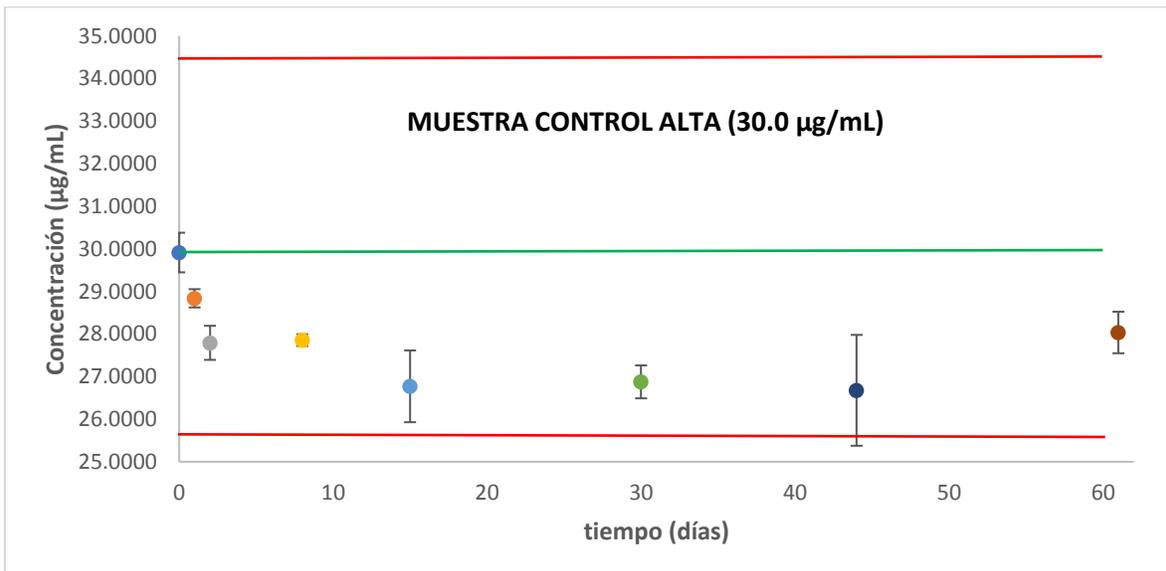


Figura 25. Estabilidad a largo plazo para la MCA. Concentraciones obtenidas de muestras control altas (30.0 µg/mL) y resguardadas para análisis después de 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

Posteriormente a la aprobación de la validación del método analítico, se procedió al análisis de las muestras plasmáticas provenientes de pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México Federico Gómez para obtener sus correspondientes perfiles farmacocinéticos, como la vía de demostración de la aplicabilidad del método validado.

Al realizar el análisis de las primeras muestras se observó presentaban una concentración menor a la del límite inferior de cuantificación ($0.5 \mu\text{g/mL}$) establecido en la validación de nuestro método, lo cual resultaba en datos inexactos e imprecisos ya que no se encontraban dentro del intervalo de trabajo validado. Para solucionar el problema se procedió a repetir el análisis de las muestras, pero adicionando a las mismas una concentración conocida de AMF ($5.0 \mu\text{g/mL}$) para aumentar la señal del analito y se lograra cuantificar dentro del intervalo de trabajo establecido. Usando esta técnica, todos los análisis realizados aplicando el método analítico generaron respuestas analíticas que fueron interpolables dentro del intervalo de concentración de la curva de calibración validada.

Una vez determinadas las concentraciones de AMF en las muestras de los pacientes se procedió a la caracterización de los perfiles farmacocinéticos, para lo cual con ayuda del software Phoenix WinNonLin, se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos correspondientes, aplicando un análisis no compartimental.

Las figuras 26-28 presentan el perfil farmacocinético de concentración de AMF vs tiempo en muestras plasmáticas en tres pacientes. En ellos puede observarse un comportamiento similar respecto a que tienen un incremento de concentraciones de AMF hasta alcanzar una concentración máxima para posterior a ésta, observarse una disminución de concentraciones, comportamiento característico de una administración oral del medicamento.

Para el caso específico de este estudio (pacientes administrados con MFM y cuantificación del metabolito activo AMF) el perfil de AMF se observa un segundo pico explicado por la recirculación entero-hepática del MPA.⁵⁴

Al comparar los tres perfiles plasmáticos obtenidos, puede observarse la variabilidad en cuanto al valor de la concentración máxima obtenida y el tiempo al que alcanza ésta, la cual coincide con lo reportado en literatura. De la misma forma para el valor ABC obtenido y la concentración al tiempo 12 horas.

La variabilidad de concentraciones de AMF y el comportamiento farmacocinético del mismo observada en estos pacientes, es la razón que evidencia la necesidad de contar con el método analítico validado, como una herramienta para llevar a cabo una monitorización del AMF en pacientes que llevan la farmacoterapia inmunosupresora con MFM y mejorar sus resultados clínicos.

Como es conocido aumentar la eficacia de un medicamento y limitar los eventos adversos del mismo a través de la monitorización de fármacos, no es tarea que se cubra únicamente con la determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco de interés, es una labor multidisciplinaria que requiere conocer el fármaco, su perfil farmacocinético, la(s) pautas de tratamiento, condiciones clínicas del paciente, su farmacoterapia concomitante, entre otras. El objetivo de esta tesis es contar con una metodología analítica confiable para ser aplicable como análisis rutinario para el monitoreo clínico de AMF que se pretende establecer en el Laboratorio de Farmacología en el CINVESTAV. Los perfiles farmacocinéticos de AMF, obtenidos en la aplicabilidad del método indican que el fármaco de interés es sensible para cuantificar AMF y es capaz de detectar diferencias de su comportamiento en muestras de pacientes, tal como se muestra en los perfiles obtenidos. Y se establece las limitantes de las consideraciones de interpretación de resultados farmacocinéticos-farmacodinámicos para el ajuste de la dosis y la comunicación de las recomendaciones para mantener, cambiar o suspender la medicación y garantizar la eficacia del medicamento, dado que no se cuenta con la información suficiente de otros aspectos involucrado en el paciente que se relacionan directamente con los perfiles farmacocinéticos obtenidos.

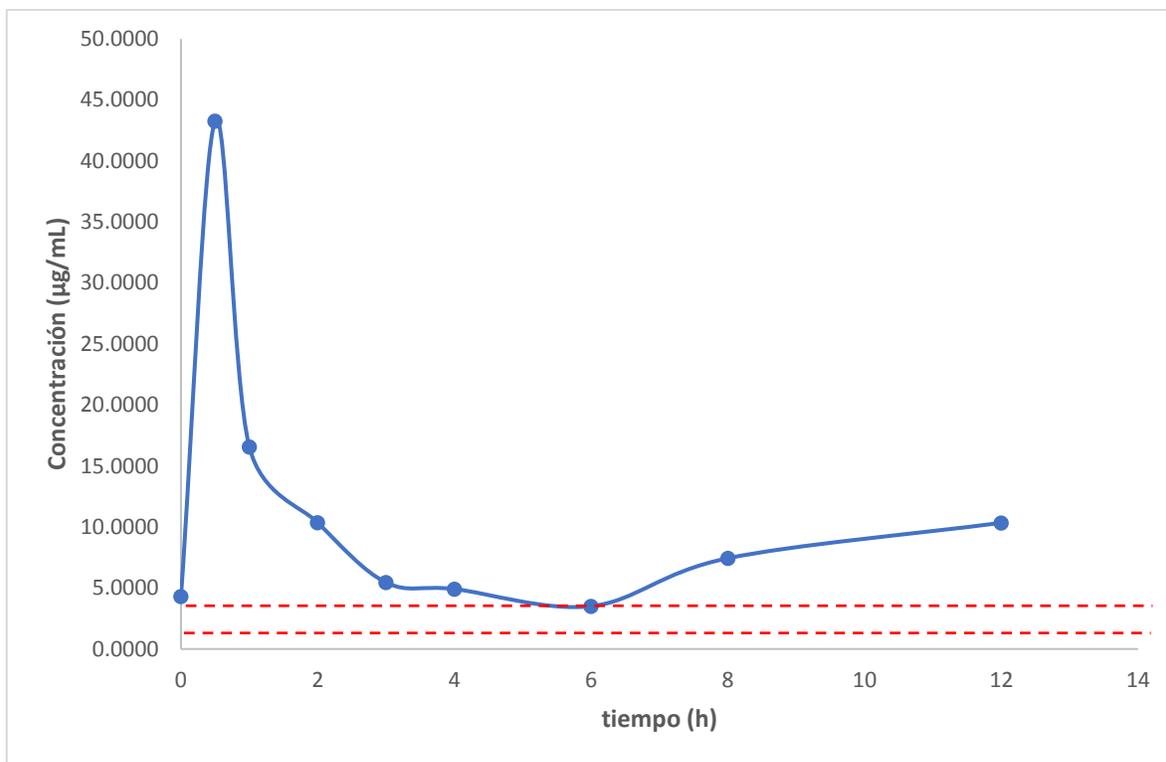


Figura 26. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave RC807966 a diferentes tiempos.

PARÁMETROS		
ABC 0-12	109.9	h·µg/mL
C _{max}	43.2	µg/mL
t _{max}	0.4	h
C ₀	4.3	µg/mL
C ₁₂	10.3	µg/mL

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave RC807966.

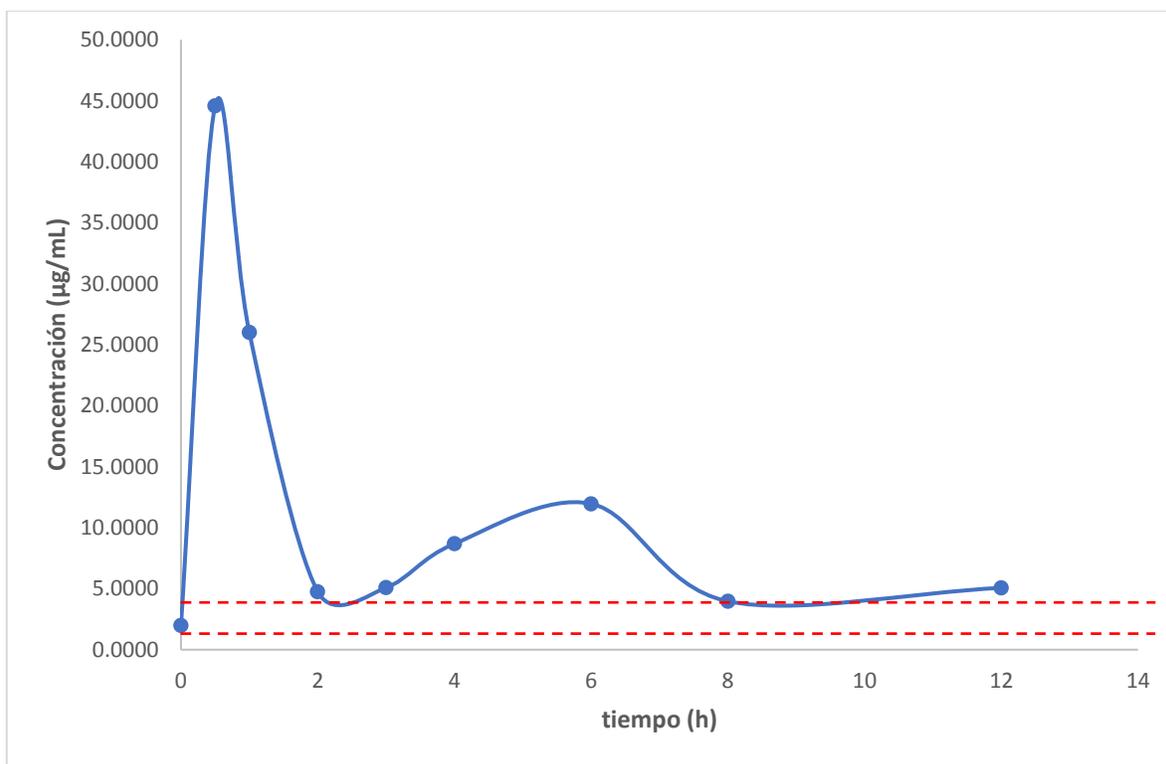


Figura 27. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave AR798458 a diferentes tiempos.

PARÁMETROS		
ABC ₀₋₁₂	111.3	h·µg/mL
C _{max}	44.5	µg/mL
t _{max}	0.5	h
C ₀	1.9	µg/mL
C ₁₂	5.0	µg/mL

Tabla 8. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave AR798458.

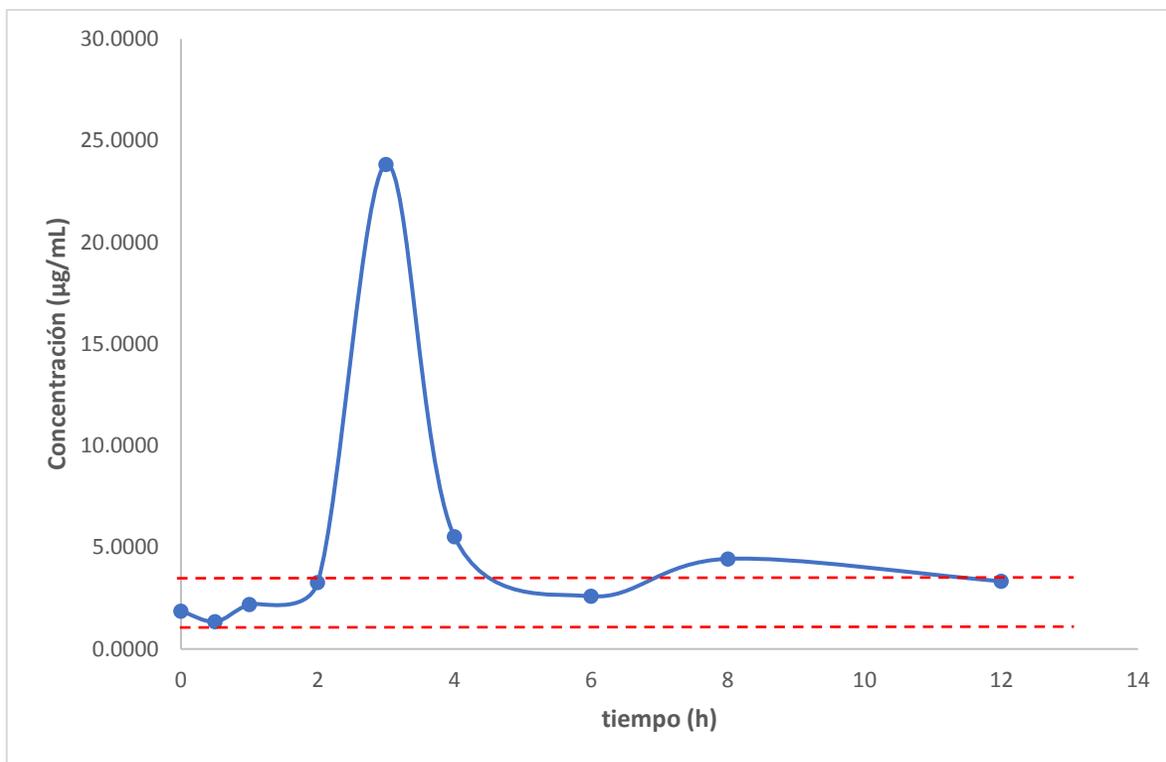


Figura 28. Gráfico del perfil farmacocinético obtenido de la evaluación de AMF en muestras del paciente con clave JC832091 a diferentes tiempos.

PARÁMETROS		
ABC ₀₋₁₂	63.5	h·µg/mL
C _{max}	23.8	µg/mL
t _{max}	3.1	h
C ₀	1.8	µg/mL
C ₁₂	3.3	µg/mL

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del perfil farmacocinético del paciente con clave JC832091.

X. Conclusiones

- Se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación cuantitativa de ácido micofenólico en plasma humano usando CLAR con detección ultravioleta.
- La metodología analítica propuesta para la determinación cuantitativa de ácido micofenólico en plasma humano usando CLAR con detección ultravioleta es válida conforme a la normatividad nacional (NOM-177-SSA1-2013).
- Se evidenció la aplicabilidad del método en muestras plasmáticas de pacientes pediátricos con trasplante renal, para la determinación de ácido micofenólico.

XI. Perspectivas

- Establecer una metodología analítica que pueda cuantificar el AMF y sus metabolitos producidos ya que son de características muy similares y uno de ellos resulta tener actividad farmacológica similar al AMF.
- Establecer un límite de cuantificación menor al propuesto en este trabajo para obtener resultados más precisos y exactos
- Establecer un estándar interno que presente una resolución mejor con base a las características del AMF.

XII. Referencias

1. Taylor A. L, Watson C. J, Bradley J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanism of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005; 56 (1): 23-46.
2. Sánchez-Sánchez M, Carvajal-Ramos M, García-Ceballos V, Panadero Carlavilla F. J. Trasplante. Rechazo. Inmunosupresión. *Panorama Actual del Medicamento*. 2009; 33 (320): 24-30.
3. Centro Nacional de Trasplantes [internet]. México: CENATRA. 2015 (actualizada Marzo 2017; citado Abril 2017). Disponible en: http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html
4. CENATRA: Reporte anual 2016 de donación y trasplantes en México (2016)
5. CENATRA: Boletín estadístico-informativo. Centro Nacional de Trasplantes. N° 1, Vol. I. Periodo: Enero-Junio 2016.
6. Kalble T, Alcaraz A, Budde K, Humke U, Karam G, Lucan M, et al. Guía clínica sobre el trasplante renal. *European Association of Urology*: 2010.
7. Hernández-Fuentes M. P, Garín-Ferreira M. I, Sánchez-Fueyo A. Sistema inmune y trasplante de órganos. Mecanismos de rechazo. Implicaciones clínicas. *Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 2005; 9 (34): 2249-2259.
8. Wiesel M, Carl S. A placebo controlled study of mycophenolate mofetil used in combination with cyclosporine and corticosteroids for the prevention of acute rejection in renal allograft recipients: 1-year results. *J Urol*. 1998; 159 (1): 28-33.
9. Flores J. *Farmacología humana*, 5ta ed. España: Masson Elsevier; 2008.
10. International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology: Fostering education, research and practice in TDM. [internet]. USA: IATDMCT. 2015. [actualizado Febrero 2017; citado Marzo 2017]. Disponible en: <https://www.iatdmct.org/about-us/about-association/about-definitions-tdmct.html>

11. Escobar L. Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética. *Rev Clin Condes*. 2016; 27 (5): 605-614.
12. Todorova E. K, Huang S. S, Kobrzynski, Filler G. What is the inpatient variability of mycophenolic acid trough levels?. *Pediatr Transplantation*. 2015; 19 (7): 669-674.
13. Elbarbry F. A, Shoker A. Simple high performance liquid chromatographic assay for mycophenolic acid in renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2007; 43 (2): 788-792.
14. Dasgupta A. *Therapeutic Drug Monitoring Newer Drugs and Biomarkers*. USA: Academic Press & Elsevier; 2012.
15. Dasgupta A, Datta P. *Handbook of Drug Monitoring Methods: Therapeutics and Drugs of Abuse*. USA: Human Press Inc.; 2008 (analytical techniques for measuring concentrations of therapeutic drugs in biological fluids)
16. Suthakaran C, Adithan C. Chapter-7. Therapeutic drug monitoring-concepts, methodology, clinical applications and limitations. *Health Administrator*. 2006; 19 (1): 22-26.
17. Brayfield A. *Martindale: The complete drug reference*, 38va ed. Italia: Pharmaceutical Press; 2014.
18. Hilal H. R, Brunton L. L. *Goodman y Gilman: Manual de farmacología y terapéutica*. 2da ed. China: Mc Graw Hill Education; 2015.
19. Liberman A. C, Druker J, Refojo D, Arzt E. Mecanismos moleculares de acción de algunas drogas inmunosupresoras. *Medicina (Buenos Aires)*. 2008; 68 (6): 2008.
20. Maryadele J O. *The Merck Index an encyclopedia of chemical, drugs, and biologicals*. 14va ed. USA: Merck Research Laboratories; 2006
21. Xu Q. A, Trissel L. A. *Stability-indicating, HPLC methods for drug analysis*. 3ra ed. USA: Pharmaceutical Press; 2008

22. Ferraris J. R, Tambutti M. L, Progoshin N, Grosman M, Carnoni R. L. Conversion from mycophenolate mofetil to delayed formulation in pediatric renal transplantation: higher mycophenolic acid predose level but no changes in the immune biomarkers. *Pediatr Transplant.* 2009; 13 (6): 731-736
23. Neu A. M, Benfield. What is the role for mycophenolate mofetil in pediatric renal transplantation? *Pediatr Trasplant.* 1999; 3 (1): 83-87.
24. Ohsugi Y, Suzuki S, Takagaki Y. Antitumor and immunosuppressive effects of mycophenolic acid derivates. *Cancer Research.* 1976; 36 (8): 2923-2927
25. Kuypers D. R. J, Le Meur Y, Cantarovich M, Tredger M. J, Tett S. E, Cattaneo D, et al. Consensus Report on Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid in Solid Organ Transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5 (2): 341-358.
26. Tonshoff B, David-Neto E, Ettenger R, Filler G, van Gelder T, Goebel J, et al. Pediatric aspects of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in renal transplantation. *Transplant Rev.* 2011; 25 (2): 78-89.
27. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.* 11 va ed. Vol. I. México: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; 2014.
28. Gonzales R. R, Gonzales B. de la Salud V. M, García R. P, Cruz A. L, Castañeda H. G, et. al. Bioavailability of generic of the immunosuppressive agent mycophenolate mofetil in pediatric patients. *PediatrTransplant.* 2014; 18 (6): 568-574
29. Sánchez-Fructuoso A, Calvo N, Moreno M. A, Giorgi M, Conesa J, Barrientos A. Better Mycophenolic Acid 12-Hour Trough Level After Enteric-Coated Mycophenolate Sodium in Patients With Gastrointestinal Intolerance to Mycophenolate Mofetil.

30. Staatz C, Tett S. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2007; 46 (1): 13-58
31. Neerman M. F, Boothe D. M. A possible mechanism of gastrointestinal toxicity posed by mycophenolic acid. *Pharmacol Res.* 2003; 47 (6): 523-526.
32. VHA Pharmacy Benefits Management Strategic Healthcare Group and the Medical Advisory Panel. Mycophenolate sodium (Myfortic). The United States: National PBM Drug Monograph; 2007
33. Sánchez-Fructuoso A. Revisión de un nuevo inmunosupresor: micofenolato sódico con cubierta entérica (Myfortic). *Nefrología.* 2005; 25 (3): 234- 244
34. Jeong H, Kaplan B. Therapeutic monitoring of mycophenolate mofetil. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007; 2 (1): 184-191
35. The current status of mycophenolate mofetil in pediatric renal transplantation. *Pediatr transplant.* 1999; 3 (1): 5-9
36. Andreu P. L, Force S. E. La enfermería y el trasplante de órganos. España: Medica Panamericana; 2004
37. Jonsson C. A, Carlsten H. Mycophenolic acid inhibits inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and suppresses production of pro-inflammatory cytokines, nitric oxide, and LDH in macrophages. *Cell Immunol.* 2002; 216 (1-2): 93-101.
38. Dubsky P. C, Friedl J, Stift A, Bachleitner-Hofmann T, Jakesz R, Gnant M. F. X, et al. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibition by mycophenolic acid impairs maturation and function of dendritic cell. *Clin Chim Acta.* 2006; 364 (1-2): 139-147.
39. Bahrami G, Mohammadi B. An isocratic high performance liquid chromatographic method for quantification of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in human serum using liquid-liquid extraction: Application to human pharmacokinetic studies. *Clin Chim Acta.* 2006; 370 (1-2): 185-190.

40. Elbarbry F. A, Shoker A. S. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem.* 2007; 40 (11): 752-764.
41. Delavenne X, Juthier L, Pons B, Mariat C, Basset T. UPLC MS/MS method for quantification of mycophenolic acid and metabolites in human plasma: Application to pharmacokinetic study. *Clin Chim Acta.* 2011; 412 (1-2): 59-65.
42. Reyes H, Hernández A. M, Valverde S, Cataneo A, Mendoza A, Barrera I, et al. Efficacy and safety of conversion of mycophenolate mofetil to enteric coated mycophenolate sodium in Mexican renal transplant children. *Pediatr Transplant.* 2010; 14 (6): 746-752
43. Saavedra S. I, Sasso A. J, Quiñones S. L, Saavedra B. M, Gaete G. L, Boza T. I, et al. Estudio de biodisponibilidad relativa entre dos formulaciones orales de micofenolato de mofetilo en voluntarios sanos. *Rev Méd Chile.* 2011; 139 (7): 902-908.
44. Watson D. G, Araya F. G, Galloway P. J, Beattle T. J. Development of a high pressure liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its glucuronide metabolite in small volumes of plasma from pediatric patients. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35 (1): 87-92.
45. Westley I. S, Sallustio B. C, Morris R. G. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the measurement of mycophenolic acid and its glucuronide metabolites in plasma. *Clin Biochem.* 2005; 38 (9): 824-829.
46. Elbarbry F. A, Shoker A. S. Liquid chromatographic determination of mycophenolic acid and its metabolites in human kidney transplant plasma: Pharmacokinetic application. *J Chromatogr B.* 2007; 859 (2): 276-281.
47. San Cristóbal M. S, Diaz Peña E. M, Alarcón Aguarales B, Vicente Cordoba C, Legaz González M. E. Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Practicas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte Introducción y practica de laboratorio: cálculo de la eficiencia y representación gráfica de la ecuación de van Deemter. *REDUCA (Biología). Serie Técnicas y Métodos.* 2011; 4 (3): 1-32.

48. Allwood J. W, Goodacre R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem Anal.* 2010; 21 (1): 33-47.
49. Bhardwaj S. K, Dwivedi K, Agarwal D. D. A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2015; 5 (4): 76-81.
50. Tiwari G, Tiwari R. Bioanalytical method validation: An updated review. *Pharmaceutical methods*, 2010; 1 (1): 25-38
51. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad
52. ICH Q2(R1): Validation of analytical procedures: text and methodology (Nov. 1996).
53. Benfield M. R, Symons J. M, Bynon S, Eckhoff D, Herrin J, Harmon W, et al. Mycophenolate mofetil in pediatric renal transplantation. *Pediatr Transplant.* 1999; 3(1): 33-37.
54. Shaw M. L, Pawinski T, Korecka M, Nawrocki A. Monitoring of Mycophenolic Acid in Clinical Transplantation. *Ther Drug Monit.* 2002; 24 (1): 68-73.
55. Shaw M. L, Korecka M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman K, L. Mycophenolic Acid Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Provide a Basis for Rational Monitoring Strategies. *Am J Transplant.* 2003; 3 (5):534-542.
56. Shaw L. M, Korecka M, DeNofrio D, Brayman K. L. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and outcome investigations as the basis for mycophenolic

- acid therapeutic drug monitoring in renal and heart transplant patients. *Clin Biochem.* 2001; 34 (1): 17-22.
57. González R. R. Montaje y validación de un método por HPLC para monitoreo de ácido micofenólico en pacientes con trasplante renal y la posibilidad de variaciones en la determinación tras medicación concomitante [tesis]. México: Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco. Departamento Farmacología; 2009.
58. Indjova D, Kassabova L, Svinarov D. Simultaneous determination of mycophenolic acid and its phenolic glucuronide in human plasma using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure. *J Chromatogr B.* 2005; 817 (2): 327-330
59. Wai-Ping Y, Vathsala A, Huei-Xin L, Shu-Feng Z, Eli C. Simple reversed-phase liquid chromatographic assay for simultaneous quantification of free mycophenolic acid in its glucuronide metabolite in human plasma. *J Chromatogr B.* 2007; 846 (1-2): 313-318.
60. Jie S, Zheng J, Yun Qiu Y, Ming Z, Ming-Kang Z. Quantification of total and free mycophenolic acid in human plasma by liquid chromatographic with fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 2005; 817 (2): 207-213.
61. Rivera-Velez S. M, Morassi A, Court M. H, Slovak J. E, Villarino N. F. Development and validation of an ultrafast chromatographic method for quantification of the immunosuppressant mycophenolic acid in canine, feline and human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 131: 94-102
62. Van de Merbel N, Savoie N, Yadav M, Ohtsu Y, White J, Riccio M. F, et al. Stability: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team. *The AAPS Journal.* 2014; 16 (3): 392-399.
63. Parra-Robert M, Rico-Santana N, Alcaraz-Quiles J, Sandalinas S, Fernández E, Falcon I, et al. Improvement in the stability of serum samples stored in an automated refrigerated module. *Clin Biochem.* 2016; 49 (18): 1369-1398.

64. De Loor H, Naesens M, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers D. R. Stability of mycophenolic acid and glucuronide metabolites in human plasma and the impact of deproteinization methodology. *Clin Chim Acta*. 2008; 389 (1-2): 87-92.
65. Oddeze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem*. 2012; 45 (6): 464-469.
66. Hoffman D, Kringle R, Singer J, Mc Dougall S. Statistical methods for assessing long-term analyte stability in biological matrices. *J. Chromatography B*. 2008; 877 (23): 2262-2269.
67. EMA: Guideline on bioanalytical method validation (July 2011)

XIII. Anexos

Anexo A. Resultados de validación del método

Concentración nominal (µg/mL)	0.5	0.8	7.5	30.0	7.5
	Concentración recuperada (µg/mL)				
Réplica	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.4025	0.7415	7.2923	29.5517	7.9993
2	0.4278	0.7666	7.2710	29.2973	7.9020
3	0.4159	0.7426	7.2669	29.6862	8.1934
4	0.4183	0.7259	7.2586	29.4365	7.7891
5	0.4076	0.7532	7.3585	29.7506	8.3993
Promedio	0.4145	0.7460	7.2895	29.5445	8.0566
D.E	0.0098	0.0151	0.0406	0.1839	0.2423
% C.V.	2.3614	2.0290	0.5565	0.6226	3.0078

Tabla 10. Repetibilidad del método. Datos y valores de %C.V. de las cantidades recuperadas en las muestras MCB, MCM, MCA, MCD, y LIC, obtenidos en la evaluación del parámetro repetibilidad.

Concentración nominal (µg/mL)	0.5	0.8	7.5	30.0	7.5
	Concentración recuperada (µg/mL)				
Réplica	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
C.A. 1					
1	0.4025	0.7415	7.2923	29.5517	7.9993
2	0.4278	0.7666	7.2710	29.2973	7.9020
3	0.4159	0.7426	7.2669	29.6862	8.1934
4	0.4183	0.7259	7.2586	29.4365	7.7891
5	0.4076	0.7532	7.3585	29.7506	8.3993
Promedio	0.4145	0.7460	7.2895	29.5445	8.0566
D.E	0.0098	0.0151	0.0406	0.1839	0.2423
% C.V.	2.3614	2.0290	0.5565	0.6226	3.0078

Tabla 11. Resultados obtenidos en la evaluación de reproducibilidad de 3 corridas analíticas en 2 días (precisión inter día).

Concentración nominal (µg/mL)	0.5	0.8	7.5	30.0	7.5
Réplica	Concentración recuperada (µg/mL)				
C.A. 2	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.4798	0.8032	7.3811	29.8561	9.4975
2	0.4564	0.8109	7.5722	29.6013	8.5599
3	0.4636	0.7930	7.3770	29.9985	8.7822
4	0.4639	0.7948	7.4137	30.0237	8.4847
5	0.4596	0.7823	7.3435	29.5582	8.8883
Promedio	0.4647	0.7968	7.4175	29.8075	8.8425
D.E	0.0090	0.0108	0.0900	0.2181	0.4008
% C.V.	1.9333	1.3601	1.2127	0.7316	5.5327
C.A. 3	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.5511	0.9297	7.3762	29.4476	9.1084
2	0.5041	0.8733	7.3660	29.6201	8.7739
3	0.5215	0.8520	7.3688	29.3020	8.4583
4	0.5356	0.8198	7.3375	29.3219	8.6373
5	0.4772	0.8245	7.1560	29.0840	8.2784
Promedio	0.5179	0.8598	7.3209	29.3551	8.6513
D.E	0.0286	0.0447	0.0933	0.1976	0.3164
% C.V.	5.5236	5.1931	1.2748	0.6731	3.6577
C.A. 123	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
Promedio	0.4657	0.8009	7.3426	29.5690	8.5168
D.E	0.0469	0.0417	0.0450	0.0458	0.0362
% C.V.	10.0640	5.2106	0.6126	0.1550	0.4249

Tabla 11 (continuación). Resultados obtenidos en la evaluación de reproducibilidad de 3 corridas analíticas en 2 días (precisión inter día)

Concentración nominal (µg/mL)	0.5	0.8	7.5	30.0	7.5
Réplica	Concentración recuperada (µg/mL)				
C.A. 1	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.4025	0.7415	7.2923	29.5517	7.9993
2	0.4278	0.7666	7.2710	29.2973	7.9020
3	0.4159	0.7426	7.2669	29.6862	8.1934
4	0.4183	0.7259	7.2586	29.4365	7.7891
5	0.4076	0.7532	7.3585	29.7506	8.3993
% Desviación	-17.1099	6.7549	2.8070	1.5185	7.4215
C.A. 2	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.4798	0.8032	7.3811	29.8561	9.4975
2	0.4564	0.8109	7.5722	29.6013	8.5599
3	0.4636	0.7930	7.3770	29.9985	8.7822
4	0.4639	0.7948	7.4137	30.0237	8.4847
5	0.4596	0.7823	7.3435	29.5582	8.8883
% Desviación	-7.0662	0.3944	1.0998	0.6415	17.9001

Tabla 12. Resultados de % desviación calculados para el parámetro de exactitud.

Concentración nominal (µg/mL)	0.5	0.8	7.5	30.0	7.5
Réplica	Concentración recuperada (µg/mL)				
C.A. 3	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
1	0.5511	0.9297	7.3762	29.4476	9.1084
2	0.5041	0.8733	7.3660	29.6201	8.7739
3	0.5215	0.8520	7.3688	29.3020	8.4583
4	0.5356	0.8198	7.3375	29.3219	8.6373
5	0.4772	0.8245	7.1560	29.0840	8.2784
% Desviación	3.5832	7.4791	2.3880	2.1497	15.3502
C.A. 123	LIC	MCB	MCM	MCA	MCD
% Desviación	6.8643	0.1100	2.0983	1.4366	13.5573

Tabla 12 (continuación). Resultados de % desviación calculados para el parámetro de exactitud.

MC	Tiempo (h)	Concentración obtenida (µg/mL)	% de desviación
MCB (0.8 µg/mL)	0	0.7647	-4.4160
	24	0.7859	-1.7653
	48	0.8786	9.8302
	72	0.8436	5.4499
MCA (30.0 µg/mL)	0	30.0931	0.3103
	24	29.8917	-0.3610
	48	29.7301	-0.8996
	72	29.9642	-0.1193

Tabla 13. Estabilidad a corto plazo de muestra procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas.

MC	Número de ciclo	Concentración obtenida (µg/mL)	% de desviación
MCB (0.8 µg/mL)	0	0.7921	-0.9855
	1	0.8057	0.7184
	2	0.8686	8.5798
	3	0.8769	9.6152
MCA (30.0 µg/mL)	0	29.2146	-2.6180
	1	30.0712	0.2373
	2	29.5714	-1.4286
	3	29.8866	-0.3781

Tabla 14. Estabilidad, ciclos de congelamiento-descongelamiento, para muestra procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

MC	Número de ciclo	Concentración obtenida (µg/mL)	% de desviación
MCB (0.8 µg/mL)	0	0.7261	-9.2313
	1	0.7445	-6.9409
	2	0.7478	-6.5307
	3	0.7144	-10.6949
MCA (30.0 µg/mL)	0	28.4529	-5.1570
	1	28.7106	-4.2980
	2	28.2561	-5.8131
	3	27.5722	-8.0926

Tabla 15. Estabilidad, ciclos de congelamiento-descongelamiento, para muestra no procesada. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Día	MCB	% de desviación	MCA	% de desviación
0	0.7511	-6.1124	29.9138	-0.2874
1	0.7531	-5.8678	28.8389	-3.8705
2	0.7452	-6.8496	27.7932	-7.3560
8	0.7179	-10.2565	27.8576	-7.1414
15	0.7144	-10.7008	26.7719	-10.7603
30	0.7100	-11.2521	26.8764	-10.4120
44	0.7096	-11.2996	26.6777	-11.0742
61	0.7881	-1.4817	28.0362	-6.5459

Tabla 16. Estabilidad a largo plazo. Concentración recuperada y por ciento de desviación obtenidos para la MCB y MCA después de ser almacenados 0, 1, 2, 8, 15, 30, 44 y 61 días.

Anexo B. Resultados del análisis de las muestras de pacientes

tiempo (h)	Clave de paciente	Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)
0	RC807966	4,3120
0,5	RC807966	43,2725
1	RC807966	16,5597
2	RC807966	10,3660
3	RC807966	5,4480
4	RC807966	4,9171
6	RC807966	3,5069
8	RC807966	7,4397
12	RC807966	10,3420

Tabla 17. Resultados de la concentración a AMF en muestras del paciente con clave RC807966 a diferentes tiempos.

tiempo (h)	Clave de paciente	Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)
0	AR798466	1,9970
0,5	AR798466	44,5907
1	AR798466	26,0087
2	AR798466	4,7586
3	AR798466	5,0867
4	AR798466	8,6840
6	AR798466	11,9624
8	AR798466	3,9681
12	AR798466	5,0666

Tabla 18. Resultados de la concentración de AMF en muestras del paciente con clave AR798458 a diferentes tiempos.

tiempo (h)	Clave de paciente	Concentración ($\mu\text{g/ mL}$)
0	JC832091	1,8697
0,5	JC832091	1,3493
1	JC832091	2,1996
2	JC832091	3,2764
3	JC832091	23,8371
4	JC832091	5,5241
6	JC832091	2,5977
8	JC832091	4,4353
12	JC832091	3,3324

Tabla 19. Resultados de la concentración de AMF en muestras del paciente con clave JC832091 a diferentes tiempos.