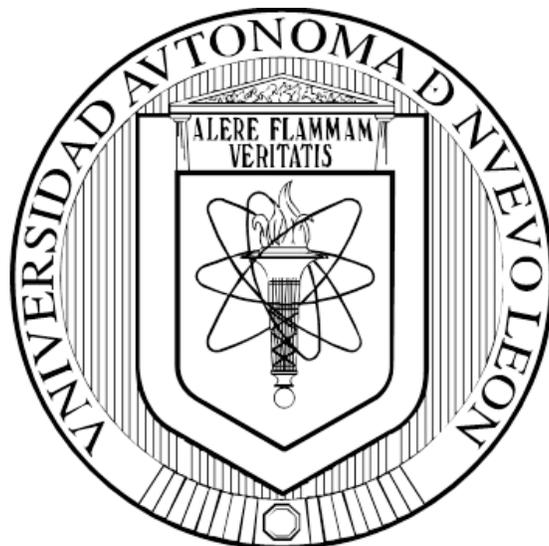


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**MONITOREO CLÍNICO DE AMIODARONA EN PACIENTES CON OBESIDAD,
RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS, PARÁMETROS
ANTROPOMÉTRICOS Y EFECTOS ADVERSOS**

POR

Q.F.B. JORGE ARMANDO YAÑEZ GONZÁLEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA**

DICIEMBRE 2016

**MONITOREO CLÍNICO DE AMIODARONA EN PACIENTES CON OBESIDAD,
RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS, PARÁMETROS
ANTROPOMÉTRICOS Y EFECTOS ADVERSOS**

Aprobación de Tesis

Presidente
Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo

Secretario
Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Vocal
Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Subdirectora de Estudios de Posgrado
Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez

**MONITOREO CLÍNICO DE AMIODARONA EN PACIENTES CON OBESIDAD,
RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS, PARÁMETROS
ANTROPOMÉTRICOS Y EFECTOS ADVERSOS**

Comité de Revisión de Tesis

Director de Tesis
Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo

Co-Director de Tesis
Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

Comité Tutorial
Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas

Comité Tutorial
Dr. Jorge Luis Guzmán Mar

Comité Tutorial
Dr. Omar González Santiago

MONITOREO CLÍNICO DE AMIODARONA EN PACIENTES CON OBESIDAD, RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS, PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y EFECTOS ADVERSOS

Presentado por:

Q.F.B. Jorge Armando Yañez González

El presente trabajo se llevó a cabo en la División de Estudios Superiores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo y la co-dirección de la Dra. Elizabeth Orozco Beltrán. En el laboratorio de Biofarmacia del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) y en La Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Cardiología No. 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) bajo la supervisión del Director de Educación e Investigación en Salud Dr. Arturo Muñiz García.

RESUMEN

Q.F.B. Jorge Armando Yañez González

Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de Graduación: Diciembre 2016

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: MONITOREO CLÍNICO DE AMIODARONA EN PACIENTES CON OBESIDAD, RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS, PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y EFECTOS ADVERSOS

Número de páginas: 100

**Candidato para el grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia**

Propósito y Método del Estudio: La cuantificación de las concentraciones séricas de los medicamentos es una actividad que pretende establecer correlaciones de efectividad/toxicidad de los medicamentos para garantizar una terapia segura y efectiva. Amiodarona es el antiarrítmico más utilizado debido a su alta efectividad, además de poseer un mecanismo de acción único. Su farmacocinética compleja y variable, y la incidencia de sus efectos adversos puede limitar su uso. Diversos factores modifican la farmacocinética de los fármacos, y la incidencia de presentar efectos secundarios a estos, siendo el índice de masa corporal (IMC) uno de los factores emergentes y de gran importancia debido a alta prevalencia de la obesidad en México. La cinética de los medicamentos se ve afectada en individuos con obesidad por diversos mecanismos fisiopatológicos, encontrándose en ocasiones concentraciones séricas mayores de los fármacos en este grupo comparado con sujetos con un IMC normal. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar un método de Cromatografía de Líquidos de alta resolución para la cuantificación de amiodarona en plasma humano, el cual se utilizó para determinar la influencia del índice de masa corporal sobre los niveles plasmáticos de amiodarona, así como la incidencia de los efectos adversos del mismo en pacientes bajo tratamiento crónico.

Contribuciones y conclusiones: Se desarrolló y validó un método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para medir los niveles de amiodarona de muestras de plasma humano en individuos con y sin obesidad. Se utilizó como fase estacionarias una columna Phenomenex Hyperclone ODS C18 y una fase móvil compuesta de acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5) /metanol (60:10:30 (v/v)), bajo un caudal isocrático de 2 mL/min, la detección se hizo a 240 nm. El tiempo de retención para amiodarona fue de 5.6 ± 0.5 min. No se encontró una correlación entre los niveles séricos de amiodarona y el IMC de los sujetos, ninguno presentó concentraciones por encima del rango terapéutico (0.5–2.5 $\mu\text{g/mL}$), lo cual puede ser debido a la acumulación del fármaco en tejido adiposo, provocando así que solo una fracción de éste se encuentre en circulación sistémica. El tiempo bajo tratamiento con amiodarona, así como la dosis acumulada fueron los únicos factores que se vieron relacionados directamente con la concentración plasmática. Se encontró que los efectos adversos causados por amiodarona se pueden presentar independientemente de la concentración elevada del medicamento, siendo la hepatotoxicidad el más frecuente encontrado en este estudio. Se sugiere realizar más estudios en poblaciones mayores para recomendar el monitoreo de las concentraciones plasmáticas de amiodarona como herramienta de monitoreo clínico.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por los recursos económicos otorgados al programa de Maestría en Ciencias con Especialidad en Farmacia través de la beca 632443 durante el período Agosto 2014- Julio 2016.

A la Facultad de Ciencias Químicas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y la investigación presente.

A la Dra. Elida Marcela Aguilar Bravo y a la Dra. Elizabeth Orozco Beltrán, quienes me asesoraron y guiaron durante la realización de este proyecto, brindándome sus conocimientos y las herramientas necesarias para llevarlo a cabo.

Al Dr. Arturo Muñiz García y a la Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado, Director y Coordinadora del Departamento de Educación e Investigación en Salud de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) Hospital de Cardiología No.34 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su disposición al apoyar el presente proyecto y su colaboración al permitirnos interactuar con los pacientes.

Al Comité Tutorial, Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas, Dr. Jorge Guzmán Mar y Dr. Omar González Santiago por sus y sugerencias y aportaciones que enriquecieron el contenido del presente documento.

Al Dr. Christian Tadeo Badillo Castañeda Jefe del Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su amable colaboración y consejos sobre la validación del método analítico.

A mis compañeros de generación, amigos y a todas las personas que me ayudaron y me brindaron su apoyo durante el transcurso del presente trabajo.

DEDICATORIA

A Dios

A mis Padres, Jesús Yañez y Elisa González

A mis Hermanos

A Melissa Domínguez

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN	iv
TABLA DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Fisiopatología de las arritmias.....	1
1.2. Tratamiento farmacológico de las taquiarritmias.....	7
1.3. Fisiología de la Obesidad.....	9
1.4. Monitoreo Terapéutico de Medicamentos.....	11
1.5. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	12
1.6. Farmacocinética de Amiodarona.....	17
2. ANTECEDENTES	24
2.1. Desarrollo y validación del método bioanalítico.....	24
2.2. Manejo Clínico de Amiodarona.....	32
2.3. Relación de amiodarona y obesidad.....	34
2.4. Análisis crítico de los antecedentes.....	35
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
4.1. Hipótesis.....	39
4.2. Objetivo General.....	39
4.3. Objetivos específicos.....	40
5. METODOLOGÍA	41
5.1. Equipo de laboratorio y reactivos.....	41

5.2. Desarrollo del método analítico	42
5.3. Validación del método bioanalítico	44
5.4. Selección de los pacientes del estudio.....	47
5.5. Formación de grupos de estudio	47
5.6. Análisis de Muestras	48
5.7. Obtención de Información Clínica de los Pacientes.....	50
5.8. Análisis estadístico de los datos	53
5.9. Manejo de Residuos.....	53
6. RESULTADOS	55
6.1. Desarrollo del método analítico	55
6.2. Validación del método bioanalítico	58
6.3. Procesamiento de muestras.....	62
6.4. Análisis de muestras de pacientes.....	65
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
8. CONCLUSIONES	79
9. BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXOS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación del potencial de acción cardiaco de las fibras de Purkinje.	Pág. 2
Figura 2.	Estructura química de Amiodarona.	Pág. 18
Figura 3.	Comparación de estructuras de amiodarona con hormonas tiroideas (T3 y T4).	Pág. 21
Figura 4.	Esquema de los procedimientos de extracción de Amiodarona de plasma humano	Pág. 49
Figura 5.	Espectro de absorbancia de una solución de amiodarona 10 µg/mL, con una longitud de onda máxima de 240 nm.	Pág. 54
Figura 6.	Cromatograma de Amiodarona 10 µg/mL, fase móvil ACN/Búfer de fosfatos (pH 4.5) (60:40(v/v)).	Pág. 55
Figura 7.	Detección de Amiodarona; A) fase móvil acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (50:20:30 (v/v)), t_R 11.9 min; B) fase móvil acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (60:10:30 (v/v)), t_R 5.4 min.	Pág. 56
Figura 8.	Selectividad del método en muestra de plasma sin adición de analito (A= plasma procesado sin adición de analito; B= plasma humano procesado con adición de analito AMD 2.5 µg/mL)	Pág. 59
Figura 9.	Curva calibración de AMD concentraciones de 0.5 a 25 µg/mL.	Pág. 61
Figura 10.	Cromatogramas de AMD extracción por precipitación de proteínas; A) 1:2 plasma-acetonitrilo, B) 1:3 plasma-acetonitrilo, C) 1:4 plasma-acetonitrilo.	Pág. 63
Figura 11.	Cromatogramas de AMD extracción líquido-líquido con n-hexano.	Pág. 65
Figura 12.	Distribución de los niveles plasmáticos de amiodarona en la población de estudio.	Pág. 67
Figura 13.	Gráfica de Regresión lineal entre las variables Concentración AMD vs. IMC.	Pág. 69
Figura 14.	Frecuencia de los Efectos Adversos probables por el uso de Amiodarona en la población de estudio.	Pág. 70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los antiarritmicos.	Pág. 8
Tabla 2.	Equipos de laboratorio.	Pág. 41
Tabla 3.	Reactivos de laboratorio	Pág. 42
Tabla 4.	Categorías de peso de acuerdo al índice de masa corporal.	Pág. 52
Tabla 5.	Condiciones cromatográficas finales.	Pág. 57
Tabla 6.	Parámetros analíticos de la curva de calibración.	Pág. 60
Tabla 7.	Resumen de parámetros de precisión y exactitud para los puntos control MCA, MCM, MCB y LIC.	Pág. 62
Tabla 8.	Variables de la población de estudio en los grupos de IMC < 25 kg/m ² e IMC ≥ 25 kg/m ² .	Pág. 66
Tabla 9.	Variables medidas en los sujetos de estudio con concentraciones subterapéuticas y terapéuticas de Amiodarona.	Pág. 68
Tabla 10.	Guía para el monitoreo clínico de Amiodarona.	Pág. 78

NOMENCLATURAS Y ABREVIATURAS

ALT	Alanina transaminasa
AMD	Amiodarona
AST	Aspartato aminotransferasa
AV	Auriculoventricular
CrCl	Aclaramiento de creatinina
C.V.	Coefficiente de variación
DEA	Desetilamiodarona
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FA	Fibrilación auricular
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IMC	Índice de masa corporal
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	Kilogramos
LIC	Límite inferior de cuantificación
lpm	Latidos por minuto
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control baja
MCM	Muestra control media
µg	Microgramos
mL	Mililitro
ng	Nanogramos
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Sinoauricular
t_R	Tiempo de retención
TSV	Taquicardia supraventricular
UMAE	Unidad de Medicina de Alta Especialidad
Vd	Volumen de distribución

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiopatología de las arritmias

1.1.1. Ritmo cardíaco y conducción del impulso eléctrico

En condiciones normales el ritmo cardíaco, también conocido como ritmo sinusal, es generado a partir de un impulso eléctrico por el nódulo sinoauricular (SA), el cual actúa como el marcapasos natural del corazón, el impulso viaja desde el músculo auricular a través del nódulo auriculoventricular (AV) hacia el sistema ramificado de conducción His-Purkinje para finalmente llegar al músculo ventricular.

La contracción y relajación del músculo cardíaco es el resultado de dichos cambios eléctricos en las células del miocardio, cuando se genera la contracción en las aurículas y ventrículos se conoce como despolarización y repolarización cuando existe una relajación de los ventrículos. (*Trevor et al. 2012; Josephson y Zimetbaun 2001*)

1.1.2. Potencial cardíaco de acción

La conducción del impulso eléctrico es dependiente de potenciales de acción, los cuales son el resultado de la actividad de canales iónicos de sodio,

calcio y potasio. El potencial de acción puede definirse como la activación de las células miocárdicas como consecuencia del movimiento de iones a través de la membrana celular. Además existe un potencial de reposo de la célula el cual está determinado por el gradiente de concentración de potasio en la célula cardiaca. De acuerdo al tipo de tejido cardíaco, el potencial de acción varía en el número de fases que lo conforman, generalmente cinco fases. Durante la fase 0 ocurre una rápida despolarización, la cual es consecuencia de la entrada de sodio hacia el interior de la célula miocárdica, posteriormente ocurre una entrada lenta de calcio. Las fases 1 a 3 abarcan el proceso de repolarización de la célula en donde existe una salida de potasio a través de la membrana de la misma. Finalmente el potencial de reposo corresponde a la fase 4. (Josephson y Zimetbaun 2001, Gaztañaga et al. 2011; Trevor et al. 2012)

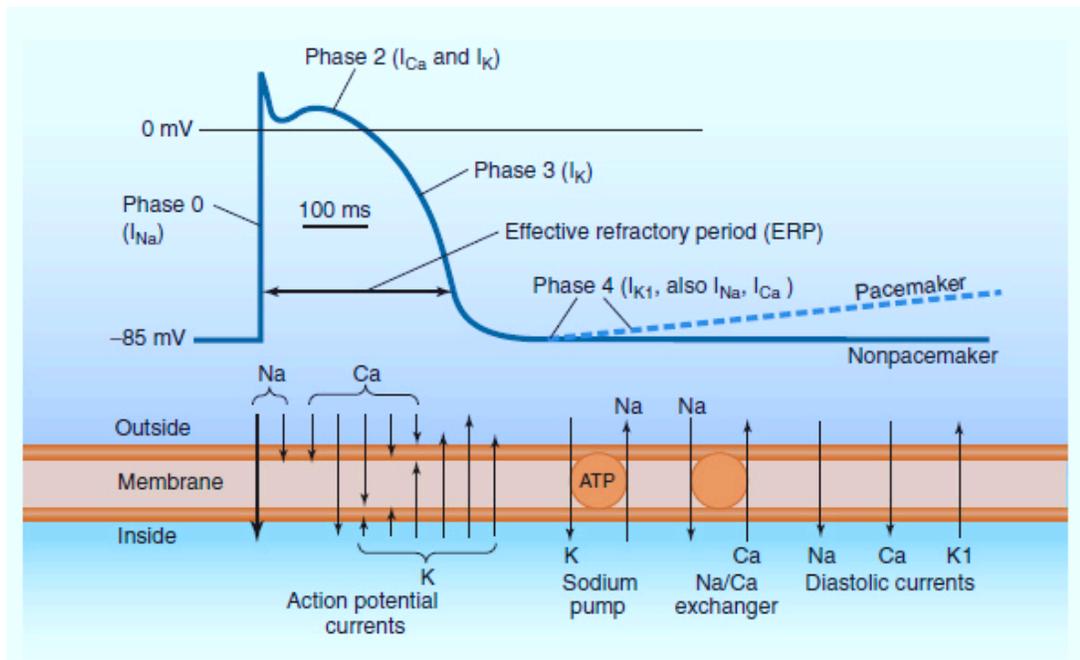


Figura.1 Representación del potencial de acción cardiaco de las fibras de Purkinje. (Trevor et al. 2012)

Cuando ocurren alteraciones en la propagación o conducción del impulso cardíaco se presenta una arritmia. Las arritmias se definen como todo ritmo cardíaco distinto al ritmo normal. Con respecto a su ubicación las arritmias se pueden dividir en ventriculares, en la zona inferior del corazón y supraventriculares cuando se ubican en la parte superior a los ventrículos. A su vez los latidos irregulares pueden presentarse de dos maneras, cuando se presentan de manera lenta se conoce como bradiarritmia y taquiarritmias en el caso de los latidos muy rápidos. (*TexasHeart.org 2015; Trevor et al. 2012*)

1.1.3. Clasificación de las Taquiarritmias Ventriculares

1.1.3.1. Taquicardia ventricular

Es debida a una alteración en la formación del impulso y se caracteriza por un descontrol de los latidos en los ventrículos debido a que éstos ya no se generan en su totalidad en el nódulo SA, como consecuencia se producen focos ectópicos y la función de marcapasos pasa a ser dependiente de diversas regiones localizadas en el sistema de conducción. De acuerdo a la duración de la arritmia se clasifica como no sostenida o sostenida, cuando se mantiene por más de 30 s, generalmente se presenta en conjunto con alguna cardiopatía y otras alteraciones. (*Josephson y Zimetbaun, 2001; TexasHeart.org, 2015*)

1.1.3.2. Fibrilación ventricular

Se define como una despolarización caótica, rápida e irregular en diferentes zonas del miocardio ventricular. Debido a la gran cantidad de impulsos cardíacos generados se puede llegar hasta los 300 latidos por minuto (lpm). Es el tipo de arritmia más peligrosa, ya que la actividad ventricular y la contracción muscular cesa, por lo que el corazón deja de bombear sangre suficiente convirtiéndose así en una de las principales causas de muerte súbita en ataques cardíacos. (*Gaztañaga et al. 2011; TexasHeart.org, 2015*)

1.1.4. Clasificación de las Taquiarritmias Supraventriculares

1.1.4.1. Taquicardia supraventricular

En la taquicardia supraventricular (TSV) los impulsos eléctricos son generados en puntos ectópicos en el miocardio auricular en lugar del nódulo SA. Por su parte el nódulo AV es incapaz de conducir los impulsos generados dando lugar a un bloqueo del mismo. La frecuencia cardíaca se presenta de manera regular pero elevada, de al menos 100 latidos por minuto (*Fox et al. 2008; TexasHeart.org, 2015*). Al igual que otros tipos de arritmias suele generarse de manera espontánea o paroxística, tanto en los pacientes sanos como en individuos con afecciones cardiacas. (*Josephson y Zimetbaun, 2001*)

1.1.4.2. Fibrilación auricular

Se presenta de manera aislada o paroxística en el caso de personas con alguna enfermedad cardíaca y/o pulmonar, y se caracteriza por una despolarización irregular en las aurículas y con una frecuencia cardíaca de 350 a 600 lpm. La conducción de los impulsos eléctricos de las aurículas hacia los ventrículos se da de manera desordenada ya que solo algunos de estos son transmitidos de manera normal hacia el nódulo AV. Debido a esta irregularidad la función de las aurículas es deficiente, teniendo como consecuencia una contracción deficiente, aumentado así el riesgo de formación de coágulos en las aurículas. Los coágulos formados pueden desprenderse formando émbolos que pueden viajar a través de la circulación comprometiendo la función de órganos importantes, por esta razón la fibrilación auricular se encuentra entre las causas más comunes de accidentes cerebrovasculares. (*Josephson y Zimetbaun, 2001; Gaztañaga et al. 2011*)

1.1.4.3. Aleteo auricular

Este tipo de arritmia de alta frecuencia es similar a la fibrilación auricular (FA) pero a diferencia de ésta, la despolarización de las aurículas ocurre de manera regular. Su duración es menor, pudiéndose transformar en ésta cuando persiste por más de siete días. Se caracteriza por presentar una frecuencia auricular de entre 250 y 350 lpm y al igual que en la FA, se pueden presentar

embolias sistémicas pero con menor frecuencia. (*Josephson y Zimetbaun, 2001; Gaztañaga et al. 2011*)

1.1.4.4. Bloqueo Auriculoventricular (AV)

Se presenta cuando existe una alteración o falla en la conducción de los impulsos eléctricos del nódulo SA hacia el nódulo AV. (*TexasHeart.org, 2015; Yeo et al. 2011*) De acuerdo a su severidad puede ser clasificado en tres grados.

- Bloqueo AV grado I: se define como una conducción lenta, no existe bloqueo como tal en el nódulo AV.
- Bloqueo AV grado II: es conocido como bloqueo intermitente, se produce cuando algunos impulsos auriculares no son conducidos al ventrículo de manera regular.
- Bloqueo AV grado III: se produce cuando el impulso auricular no se propaga a los ventrículos, es el más grave ya que al no existir conducción hacia los ventrículos, la contracción se afecta de manera importante. (*Josephson y Zimetbaun, 2001*).

1.2. Tratamiento farmacológico de las taquiarritmias

Los medicamentos antiarrítmicos pueden ser agrupados en cuatro clases según la clasificación Vaughan Williams. En esta clasificación los fármacos se separan de acuerdo al receptor donde actúan, ya sea alterando el flujo de iones de Na^+ , K^+ o Ca^{2+} modificando así, la duración del potencial de acción.

(Razavi, 2005; Trevor et al. 2012)

- Clase I: su mecanismo de acción es el bloqueo de canales de Na^+ dependientes de voltaje. Inhiben la entrada rápida de sodio que inicia con el potencial de acción, por lo tanto disminuyen la velocidad de conducción y la excitabilidad de la célula cardíaca.
- Clase II: fármacos que actúan bloqueando receptores beta-adrenérgicos en el miocardio. Este bloqueo trae como resultado una disminución en las corrientes de sodio y calcio, que son los iones encargados de iniciar el potencial de acción.
- Clase III: fármacos bloqueadores de canales de potasio, cuyo mecanismo de acción es el retraso en la repolarización de la célula cardíaca y por tanto una prolongación del potencial de acción cardíaco.
- Clase IV: bloqueadores de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, disminuyendo la velocidad de conducción de las células cardíacas.

Tabla.1 Clasificación de antiarritmicos

Clase I	Ia	Ib	Ic
	Quinidina	Lidocaína	Flecainida
	Procainamida	Aprindina	Encainida
	Disopiramida	Mexiletina	Lorcaidina
		Tocainida	Profafenona
Clase II	Beta-bloqueadores Bretilio		
Clase III	Amiodarona Sotalol		
Clase IV	Verapamilo		

Existen algunos antiarrítmicos que pueden ser considerados en más de una clase, tal es el caso de la quinidina, el cual se considera como de clase I y III, ya que bloquea tanto canales de sodio como de potasio. Otro caso único es el de amiodarona debido a que, además de poseer actividad antiarrítmica, por el bloqueo de canales potasio, produce un bloqueo de canales de sodio y de calcio, de la misma manera actúa como un beta-bloqueador en el corazón. *(Roden, 2000, Campbell et al. 2001, Vasallo et al.2007)*

Amiodarona es un antiarrítmico clase III ampliamente utilizado en clínica para diferentes tipos de arritmias, que a pesar de su amplio patrón de efectos adversos, bajo un estricto protocolo de manejo ha resultado efectivo en el tratamiento de arritmias auriculares y ventriculares. *(Salem et al. 2016)*

1.3. Fisiología de la Obesidad

1.3.1. Sobrepeso y obesidad

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza ampliamente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos entre el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2), un IMC menor a 25 indica un peso normal, mientras que un valor de 30 o superior indica obesidad. (*WHO.Int, 2015; Flegal et al. 2009; Rosales 2011*)

La obesidad es una condición que aumenta la morbilidad y mortalidad en quien la padece comparados con individuos sin obesidad, ya que los sujetos con un excesivo peso son más propensos a desarrollar otras enfermedades como diabetes, hipertensión, alteraciones respiratorias y enfermedades cardíacas. (*Casati y Putzu 2003*)

1.3.2. Prevalencia del sobrepeso y la obesidad en México

El sobrepeso y la obesidad son uno de los principales problemas de Salud Pública en México. El país está inmerso en un proceso de transición donde la población experimenta un aumento inusitado de IMC que afecta a las zonas

urbanas y rurales, a todas las edades y a las diferentes regiones del país. (ENSANUT, 2012)

De acuerdo con lo reportado en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en 2012, las enfermedades clasificadas en el grupo de diabetes, enfermedad cardiovascular y obesidad, concentran el 11.5% de las causas de consulta ambulatoria en México. Según esta encuesta, entre los hombres mayores de 20 años de edad, 42.6% presentan sobrepeso y 26.8%, obesidad; mientras que en las mujeres estas cifras corresponden a 35.5 y 37.5%, respectivamente. La prevalencia de la obesidad, se presenta mayormente en el grupo de edad de 40 a 49 años en hombres y de 50 a 59 años en las mujeres (ENSANUT, 2012)

1.3.3. Obesidad y cambios fisiopatológicos

La obesidad está asociada a diferentes cambios fisiopatológicos, el aumento del gasto cardíaco, un aumento en el volumen sanguíneo y del flujo sanguíneo hepático, disminución en la función pulmonar y disminución en la función renal. (Casati y Putzu, 2003; Brill et al. 2012)

Como resultado de estos cambios, los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los medicamentos se ven modificados, lo cual es un importante tema de estudio debido a la alta incidencia y prevalencia de la obesidad en las poblaciones y a la poca información del cambio de los medicamentos en esta condición. (Brill et al. 2012)

1.3.4. Farmacocinética en la obesidad

En el sobrepeso y obesidad los principales parámetros farmacocinéticos que se afectan son la depuración o aclaramiento renal (Cl) y el volumen de distribución (Vd), éste último se utiliza para calcular dosis de mantenimiento y de carga de los fármacos. En el caso de la depuración los cambios dependen de la ruta de eliminación, para los fármacos que se metabolizan por la isoenzima hepática CYP3A4 se ha encontrado una menor depuración en pacientes obesos comparados con no obesos. (*Brill et al. 2012*)

El aumento de triglicéridos, colesterol, lipoproteínas y ácidos grasos en el paciente obeso, disminuye la cantidad de proteínas de unión a fármacos como es el caso de la albúmina. Al disminuir los complejos proteína-fármaco, existe una mayor cantidad de fracción libre de los medicamentos, lo cual se traduce en una mayor concentración sanguínea y por consiguiente en un aumento en la probabilidad de que se presenten los efectos adversos de los mismos. (*Casati y Putzu, 2003*)

1.4. Monitoreo Terapéutico de Medicamentos

Los medicamentos son el principal insumo utilizado en el tratamiento de las diferentes enfermedades. Estos se someten a rigurosas pruebas que garantizan su seguridad y eficacia cuando son utilizados por los pacientes para diferentes patologías. A pesar de ello, existen muchos factores que afectan su efectividad como son la variabilidad individual en edad, peso, género, constitución genética, embarazo, obesidad, estado de la enfermedad, daño renal y/o hepático entre

otros. Además, los medicamentos experimentan cambios particulares acordes a estas diferencias. Por esta razón es necesario individualizar la terapia según estas características para optimizar el resultado terapéutico. Esta no es una tarea fácil para el clínico, que requiere de diferentes estrategias para lograrlo. Una de ellas es utilizar la medición de las concentraciones plasmáticas del medicamento, que es el reflejo de los cambios cinéticos que experimenta el fármaco en cada paciente y muestra la concentración terapéutica efectiva identificada como una variable cinética propia representada como concentración en el estado estable.

La mayoría se cuantifican por Cromatografía de Líquidos de alta resolución (HPLC) con diferentes detectores dependiendo de la complejidad de su estructura química. Esto la hace inaccesible y complicada para poder ser utilizada en el medio hospitalario donde se manejan medicamentos que son idóneos para ser analizados y así asegurar su seguridad por monitoreo terapéutico. *(Calvo, 2002)*

1.5. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

1.5.1. Características

Dentro de todas las técnicas cromatográficas, la cromatografía de líquidos de alta resolución es la más conocida, su campo de aplicación es por mucho, más extenso que la cromatografía de gases. Posee como principal ventaja una

gran selectividad, dicha propiedad depende principalmente de la apropiada elección de la fase estacionaria y de la composición del eluente o fase móvil. En la cromatografía HPLC la separación dependerá del coeficiente de distribución del analito que interacciona con ambas fases, al ser acarreado por una fase móvil (líquida) a través de la fase estacionaria bajo altas presiones. Pueden analizarse una gran cantidad de compuestos de características muy variadas, por lo que se ha convertido en la técnica de elección para cuantificación de compuestos en industrias alimenticias, farmacéuticas, petroquímicas, etc. (*Gumustas et al. 2013, Rouessac y Rouessac, 2007*)

De manera general, el sistema cromatográfico consta de diversos instrumentos especializados que se pueden encontrar en unidades separadas o como conjunto. Internamente, cuenta con tuberías metálicas o poliméricas de diámetros de 0.1 mm que se encargan de la circulación de la fase móvil entre los diferentes componentes. (*Kupiec 2004, Gumustas et al. 2013*)

1.5.2. Bomba del cromatógrafo

La función de la bomba es impulsar la fase móvil a través de la columna bajo un caudal constante, la presión generada por la bomba, generalmente cuaternaria, es un factor determinante para lograr una mejor resolución, entre mayor sea la presión generada mejor será la separación de los compuestos. La presión generada debe ser elevada, ya que es necesario lograr que la fase móvil pase a través de la columna, las cuales se encuentran altamente

compactadas. El incremento de la presión dependerá de diversos factores, como el flujo con el que se bombea la fase móvil, la viscosidad de la misma y el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Las bombas se componen de dos pistones que permiten generar un flujo estable, ya que mientras un pistón empuja la fase móvil el otro se llena con la disolución. (*Kupiec, 2004; Gumustas et al. 2013, Rouessac y Rouessac, 2007*)

En ocasiones se encuentran presentes gases atmosféricos como N₂ y O₂ disueltos en los solventes utilizados, los cuales pueden interferir con la separación al modificar la compresión en la fase móvil y generando burbujas. Es por eso que se recomienda desgasificar los solventes mediante diferentes técnicas, siendo el ultrasonido la más utilizada. (*Rouessac y Rouessac, 2007*)

1.5.3. Inyector

En la mayoría de los instrumentos se cuenta con un inyector de muestra automatizado, el cual permite realizar inyecciones precisas en la columna. (*Gumustas et al. 2013*)

La inyección de la muestra en el sistema cromatográfico debe ser de manera rápida, esto con el fin de evitar la mayor cantidad de perturbación en el flujo de la fase móvil, el cual se debe mantener estable en todo el sistema. El proceso se da en dos fases, en la primera la muestra es introducida por la jeringa en un *loop* o porción tubular, el cual posee un volumen definido. Una vez en esta posición, la muestra es insertada rápidamente en la circulación de la fase móvil,

la cual contendrá al analito durante todo el análisis. (Rouessac y Rouessac, 2007)

1.5.4. Fase estacionaria

Las columnas utilizadas en la cromatografía HPLC son tubos hechos de acero inoxidable que poseen longitudes de 3 a 15 cm. La fase estacionaria se encuentra empacada dentro de la columna y los diámetros internos son usualmente de 4.6 mm, sin embargo existen columnas con diámetros menores a 1 mm, las cuales generan una mayor resolución, así como menores tiempos de análisis. Una gran variedad de materiales se han utilizado para empacar columnas, siendo el gel de sílice el más común. Es un material rígido, se encuentra en forma de partículas esféricas con un diámetro de 2 a 5 μm . (Gumustas et al. 2013, Rouessac y Rouessac, 2007)

De acuerdo con la polaridad de la fase estacionaria podemos obtener dos modalidades de la misma técnica. Si la fase estacionaria es polar, el análisis será en *fase normal*, por el contrario, en la *fase reversa* la columna posee un carácter no polar. Cuando se trabaja en fase reversa, se debe elegir una fase móvil polar, los cambios en su composición y por ende en su polaridad, afectarán los coeficientes de distribución de los analitos, lo que causará un cambio en la retención de los mismos sobre la fase estacionaria. (Gumustas et al. 2013, Rouessac y Rouessac, 2007)

1.5.5. Fase móvil

La fase móvil que se utiliza en HPLC es un líquido el cual debe ser de alta pureza y libre de interferencias. La naturaleza del solvente dependerá del analito, ya que éstos deberán ser miscibles. Las condiciones de elución están en función de la composición de la fase móvil, de los analitos y de la fase estacionaria. La elución de moléculas puede ser de dos tipos: isocrática o en gradiente. En el tipo de elución isocrática, se genera usando una fase móvil de composición constante durante todo el análisis, mientras que en elución por gradiente la composición de la fase móvil se varía en el sistema cromatográfico dependiendo de las necesidades de la separación. (*Gumustas et al. 2013*)

1.5.6. Detector

Los detectores pueden ser de distintos tipos, dependiendo las características fisicoquímicas del compuesto de interés. Uno de los principales objetivos de la cromatografía es la cuantificación de los compuestos, por lo que es importante la elección del detector adecuado. (*Gumustas et al. 2013*)

Para el análisis de fármacos, los métodos de detección más utilizados son aquellos que se basan en las propiedades ópticas de los analitos, como lo son los de absorción, fluorescencia e índice de refracción. Los detectores espectrofotométricos basan su detección en la ley de Lambert-Beer, donde la

absorbancia del analito disuelto en la fase móvil es medida a su salida de la columna a una longitud de onda en el rango del ultravioleta-visible. La intensidad de la absorción dependerá del coeficiente de absorción molar de la especie detectada. Con el fin de evitar interferencias en el análisis, la fase móvil deberá ser transparente en la longitud de onda medida. Una vez que la señal es generada, el área del pico es el parámetro utilizado en el cromatograma para hacer el cálculo de la concentración del compuesto. (Kupiec 2004)

1.6. Farmacocinética de Amiodarona

1.6.1. Características

Amiodarona, un derivado del benzofurano, es un potente fármaco antiarrítmico indicado para el manejo de arritmias ventriculares, como fibrilación ventricular y taquicardia ventricular, de igual manera es ampliamente utilizado para el tratamiento de fibrilación auricular. (Goldschlager et al. 2007)

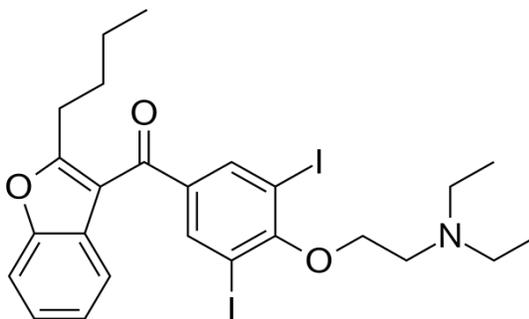


Figura 2. Estructura química de Amiodarona.

Su farmacocinética es compleja, con una biodisponibilidad que varía del 20 al 80%, tiene un volumen de distribución grande (66 L/kg), que da como resultado un retraso en el inicio de acción del fármaco de 2 días a 3 semanas. Posee una vida media de eliminación larga con un promedio de 58 días, que se cree que es resultado de la liberación lenta del fármaco acumulado en los tejidos ricos en lípidos, ya que al ser una molécula altamente liposoluble se almacena en grandes concentraciones en tejido adiposo, muscular esquelético, hígado, pulmones y piel. (*Bickford y Spencer, 2006*)

Su excreción ocurre casi totalmente por vía biliar y fecal, solo existe una mínima depuración renal (<1%) así como una eliminación por vía lagrimal. Su metabolismo es principalmente a nivel hepático por el sistema enzimático del citocromo P-450 3A4 (CYP3A4), siendo su principal metabolito la desetilamiodarona, la cual posee propiedades electrofisiológicas similares a las del fármaco original. El rango establecido de concentraciones plasmáticas terapéuticas para amiodarona varía entre 1.0 a 2.5 µg/mL, concentraciones por arriba de éstas son consideradas como tóxicas. (*Goldschlager et al. 2007; Siddoway et al 2003*)

1.6.3. Efectos adversos

A pesar de ser uno de los antiarrítmicos más utilizados y efectivos, el uso de amiodarona conlleva ciertos riesgos debido a la alta probabilidad de que se

presenten efectos adversos en los pacientes bajo tratamiento. (*Campbell et al. 2001; Lafuente-Lafuente et al. 2009*)

La introducción al mercado de antiarrítmicos análogos menos tóxicos, como la dronedarona, ha sido un intento por disminuir la presencia de dichos efectos. La dronedarona es también un derivado de benzofurano, que a diferencia de amiodarona, no contiene moléculas de yodo en su estructura, además no se le han asociado efectos adversos graves y ha sido aprobada para el manejo de fibrilación auricular. Sin embargo su efectividad comparada con amiodarona no ha sido bien estudiada. (*Piccini et al. 2009*). Solo algunos estudios retrospectivos han propuesto a dronedarona como una alternativa para tratamiento de FA en pacientes que no han respondido a otros antiarrítmicos (*Guerra et al. 2014*)

La mayoría de los efectos adversos causados por amiodarona pueden ser reversibles con la disminución de la dosis y/o suspensión del medicamento (*Siddoway et al. 2003*). La toxicidad del fármaco afecta diferentes órganos, principalmente glándula tiroides, pulmones, hígado, ojos, piel, corazón así como al sistema nervioso (*Lafuente-Lafuente et al. 2009*)

1.6.3.1. Toxicidad Pulmonar

Los efectos adversos a nivel pulmonar son considerados como uno de los más peligrosos causados por amiodarona. Suele presentarse con una

incidencia del 2 – 17%, y los síntomas clínicos más característicos son aparición o empeoramiento de tos seca, disnea progresiva, y el principal daño se presenta por alveolitis y neumonía intersticial, así como también fibrosis pulmonar. (*Siddoway et al. 2003; Vasallo et al. 2007*).

Los principales mecanismos propuestos por el que se presenta dicho efecto son por inducción de fosfolipidosis y por reacción de hipersensibilidad al fármaco. Algunos de los productos del metabolismo de amiodarona que se generan son especies reactivas de oxígeno, las cuales se cree son las encargadas de dañar el epitelio pulmonar. (*Wolkove y Baltzan, 2009; Al-Shammari et al. 2015*)

1.6.3.2. Disfunción tiroidea

En tratamientos crónicos con amiodarona se puede presentar tanto hipotiroidismo como hipertiroidismo, con una frecuencia del 6 y 2% respectivamente. (*Vasallo et al. 2007*). Las células de la glándula tiroidea, bajo el efecto de la hormona estimuladora de tiroides (TSH), sintetizan tiroglobulina, la cual al incorporar en su estructura moléculas de yodo da lugar a las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4).

El hipotiroidismo es debido al alto contenido de yodo que posee el fármaco, y a la disminución de la síntesis de hormonas tiroideas por autorregulación. Además, amiodarona compite por los receptores de hormonas tiroideas debido

a la similitud estructural con éstas (Figura 3). Es posible revertir este efecto adverso sin necesidad de suspender el fármaco antiarrítmico y esto se logra con una terapia farmacológica de reemplazo con levotiroxina, un análogo de la T4. (Cohen-Lehman et al. 2010; Rizzo y Bruno, 2011)

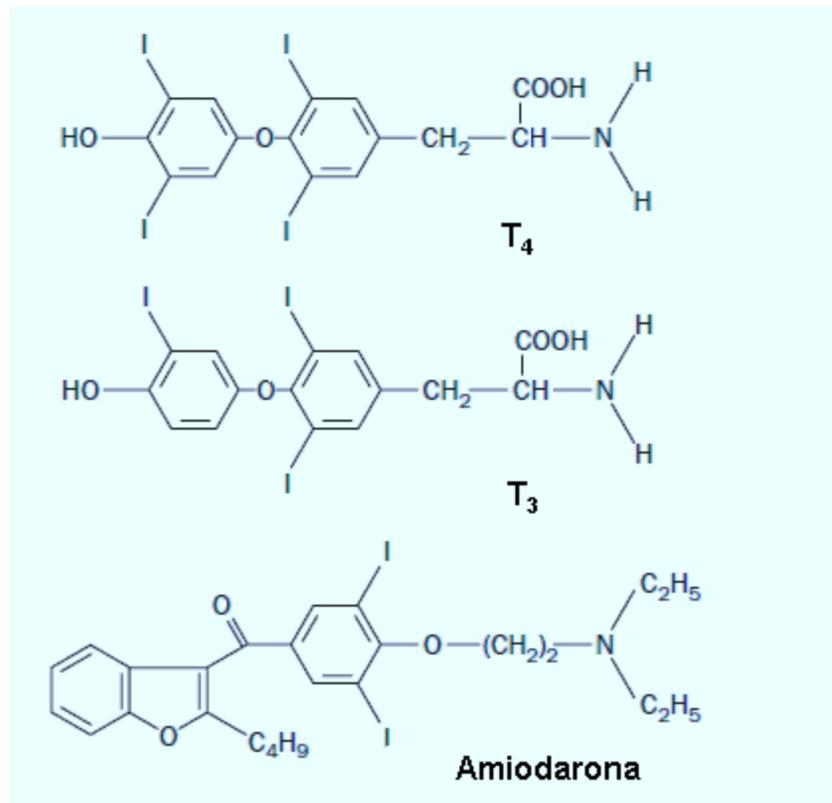


Figura.3 Comparación de estructuras de amiodarona con hormonas tiroideas (T3 y T4).

Otro de los mecanismos por los que se puede presentar hipertiroidismo incluye la sobreproducción de hormonas tiroideas por el exceso de yodo o también por daño citotóxico sobre la glándula tiroidea por amiodarona y/o su

metabolito. Aunque es menos probable se puede revertir dicho efecto mediante tiroidectomía. (*Brogioni et al. 2006, Rizzo y Bruno, 2011*)

1.6.3.3. Toxicidad hepática

La toxicidad en el hígado se presenta clínicamente como una elevación en las enzimas hepáticas (transaminasas; ALT y AST) en un 30% de los pacientes con tratamientos crónicos, en algunos casos se puede desarrollar padecimientos como hepatitis y cirrosis. (*Vasallo et al. 2007*)

La causa por la que se produce es desconocida, se cree que es por daño directo a las bicapas de lípidos y a los lisosomas y/o la función mitocondrial debido a la lipofiliencia del fármaco (*Aronson 2009*). Se recomienda suspender amiodarona cuando los niveles de transaminasas se encuentran elevados el triple de su nivel basal. (*Siddoway et al. 2003, Kneeman et al. 2012*)

1.6.3.4. Micro depósitos corneales

Los microdepósitos corneales son reportados como uno de los efectos adversos más frecuentes en pacientes bajo tratamiento con amiodarona, con una frecuencia mayor al 80%. Los depósitos corneales son el resultado de la acumulación de amiodarona en el epitelio corneal, debido a que existe eliminación del fármaco por la vía lagrimal. (*Vidal et al. 2009; Aronson 2009*).

En ocasiones esta alteración puede ocasionar problemas visuales, como visión borrosa y fotofobia, sin embargo suele ser reversible y desaparece una vez que el tratamiento es suspendido. Las concentraciones lacrimales del fármaco se relacionan de manera proporcional a la concentración sanguínea, siendo un reflejo de la misma. (*Vidal et al. 2009; Aronson 2009*)

2. ANTECEDENTES

2.1. Desarrollo y validación del método bioanalítico

El monitoreo terapéutico de fármacos es una práctica clínica que se define como la medición de concentraciones de los medicamentos en algún fluido biológico (sangre, plasma, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc.) con el fin de mejorar la eficacia y seguridad de los tratamientos farmacológicos, el primero asegurando una concentración terapéutica requerida para el tipo de padecimiento y el segundo evitando que el medicamento alcance niveles tóxicos en el cuerpo, disminuyendo así la probabilidad de que se presenten efectos adversos y/o mortales. (*Kang y Lee, 2009*)

Además de las características propias de los medicamentos, hay diversos factores que pueden influenciar las concentraciones plasmáticas de los mismos y en consecuencia la presencia de sus efectos adversos, dentro de los cuales se encuentran dosis diaria o de mantenimiento, duración del tratamiento, dosis acumulada, así como también otros factores como la edad, el sexo y el IMC. Este último es un factor poco estudiado y de importancia debido al aumento de la prevalencia de la obesidad en las poblaciones. (*Ernawati et al. 2008, Fukuchi et al. 2009, Cohen et al. 2010*)

Los métodos para monitoreo deben de ser sensibles y específicos para los fármacos de estudio, deben de establecer relaciones entre las concentraciones plasmáticas y la toxicidad y/o efectividad de los mismos. Existen diversas

técnicas analíticas, como lo son los métodos espectrofotométricos y fluorométricos, los cuales poseen una sensibilidad limitada con respecto a los inmuno ensayos, debido a que estos incorporan un anticuerpo específico para el fármaco de estudio, pero que poseen desventajas de ser más costosos y en ocasiones no diferenciar entre el fármaco y sus metabolitos. (*Campbell et. al. 2001*)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ha sido descrita como la técnica de elección para la cuantificación de medicamentos en matrices biológicas, que en combinación con detectores espectrométrico de masas o espectrofotométrico ha permitido mediciones confiables para el monitoreo de fármacos. (*Karvaly et al. 2013*)

Los métodos bioanalíticos pueden definirse como aquellos donde el analito a medir se encuentra dentro de una matriz biológica, como puede ser sangre, plasma, saliva, orina, etc. Al igual que los métodos analíticos convencionales deben ser desarrollados y validados con el fin de asegurar su confiabilidad y reproducibilidad, utilizando estándares de referencias. (*Wal et al. 2010*). Para ello existen diversas guías nacionales e internacionales que contienen los requisitos necesarios que conforman los lineamientos para el desarrollo del método, la validación del mismo y el análisis de las muestras reales. (*NOM-177-SSA1-2013, EMA 2013*)

Existen dos tipos de validación de métodos bioanalíticos, completa o parcial, en la primera deben analizarse todos los parámetros necesarios para una validación basada en las recomendaciones de la literatura. Una validación parcial debe realizarse a partir de un método previamente validado, al cual se le ha modificado algún punto en su metodología analítica, como puede ser la extracción del analito de la matriz, o cuando se utiliza un equipo y/o software diferente. (Wal et al. 2010, NOM-177-SSA1-2013)

2.1.1. Parámetros de la validación completa

2.1.1.1. Selectividad

La selectividad es la capacidad del método de poder cuantificar y diferenciar el analito de los demás componentes endógenos de la matriz biológica. Deben de analizarse individualmente al menos seis matrices diferentes y la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención del analito debe ser menor al 20% del límite inferior de cuantificación del mismo. (Wal et al. 2010, EMA 2013, NOM-177-SSA1-2013)

2.1.1.2. Límite inferior de cuantificación (LIC)

El límite inferior de cuantificación se considera como el punto más bajo de la curva de calibración que puede ser medido con precisión y exactitud. Su

respuesta debe ser al menos cinco veces mayor que la señal de blanco al tiempo de retención del analito. (EMA 2013, NOM-177-SSA1-2013)

2.1.1.3. Curva de calibración

La curva de calibración permitirá conocer la concentración del analito con respecto a la respuesta del equipo, debe constar de al menos seis niveles de concentración y un blanco (muestra biológica sin analito), debe ser construida en un rango considerando las concentraciones en que se encontrará el analito durante el análisis de las muestras. (EMA 2013, NOM-177 SSA1-2013)

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el LIC, ya que este puede ser menor o igual que el 20%, y al menos el 75% de los puntos en la curva de calibración deben cumplir con este criterio para ser aceptada. (NOM-177-SSA1-2013)

2.1.1.4. Precisión y Exactitud

La precisión se define como la cercanía de mediciones individuales y repetitivas para un analito, se divide en la repetibilidad y reproducibilidad del método. Mientras que la exactitud describe la cercanía del valor de concentración obtenido con respecto al valor nominal o adicionado de la concentración del analito. (EMA 2013; IUPAC Goldbook 2014)

Para evaluar la precisión y exactitud del método deben realizarse un mínimo de 5 determinaciones por nivel de concentración para las muestras control alta

(MCA), muestras control medias (MCM), muestras control baja (MCB) y para el LIC. Éstos puntos control se preparan a partir de la misma matriz biológica adicionada con el analito de interés, a niveles de concentración alto, medio y bajo. Las concentraciones se calculan a partir de la curva de calibración. (*EMA 2013, NOM-177-SSA1-2013*) En cuanto a precisión el %CV del valor promedio de cada concentración calculada no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%. (*NOM-177-SSA1-2013*) El parámetro de exactitud expresado como el porcentaje de desviación, es calculado a partir de la concentración obtenida respecto a la concentración añadida. (*NOM-177-SSA1-2013*)

2.1.1.5. Estabilidad de la muestra

Debe ser evaluada la estabilidad del analito contenido en la matriz biológica con el fin de asegurar que no haya cambios en la concentración del analito durante los procesos de procesamiento de muestras y de análisis de éstas. Para ello se deben hacer las determinaciones de las MCA y MCB por triplicado, las cuales son analizadas antes y después de ser sometidas a las condiciones a evaluar. La concentración obtenida de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal. (*EMA 2013, NOM-177-SSA1-2013*)

2.1.2. Procesamiento de muestras biológicas

Las matrices biológicas suelen ser complejas, ya que además de contener al analito poseen una gran cantidad de compuestos endógenos, tal es el caso del plasma sanguíneo donde es posible encontrar una gran variedad de componentes desde proteínas de unión a fármacos, fosfolípidos, sales y diversos desechos del metabolismo. Es necesario realizar una buena extracción del analito de interés y eliminar la mayor parte de estos compuestos, ya que pueden dar lugar a interferencias durante el análisis de las muestras o afectar el funcionamiento de los equipos de medición. Para ello se pueden realizar diferentes técnicas de extracción, las más comunes son la extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y la extracción por precipitación de proteínas. *(Wal et al. 2010)*

2.1.2.1. Extracción líquido- líquido

Es uno de los métodos mas utilizados, consiste en realizar una mezcla de dos disoluciones inmiscibles, una fase acuosa y una fase orgánica, la cual consiste en un solvente. La extracción del analito dependerá de su coeficiente de partición entre las fases, los analitos que sean de naturaleza hidrofílica se desplazarán hacia la fase acuosa, la cual puede ser inyectada directamente al cromatógrafo. En el caso de analitos que sean de carácter hidrofóbico se encontrarán en la fase orgánica, la cual debe ser evaporada y posteriormente reconstituida para su inyección en el equipo. Es una técnica rápida y

relativamente barata, con la ventaja de tener una preconcentración del analito cuando existe una evaporación del solvente. (*Wal et al. 2010; Prabu et al. 2012*)

2.1.2.2. Extracción en fase sólida

La extracción se realiza sobre una fase sólida la cual retiene al analito que posteriormente se eluye en el disolvente adecuado. Para la fase sólida se emplean cartuchos o discos en jeringas cargados con el material adsorbente, el octadecilsilano (C18) suele ser el material más utilizado. (*Wal et al. 2010*)

La extracción en fase sólida se puede dar de dos maneras, se puede retener el analito fuertemente a la fase y eluir con el solvente la mayoría de las interferencias para posteriormente recuperar el analito en otro disolvente adecuado. Por el contrario, es posible retener las interferencias permitiendo que el analito eluya y se recupere. En ambos casos es posible inyectar directamente al equipo o realizar evaporación del solvente y reconstitución de la muestra. Presenta una separación más eficiente y con menor número de interferencias con respecto a la separación líquido-líquido. (*Prabu et al. 2012*)

2.1.2.3. Precipitación de proteínas

La precipitación de proteínas es la técnica más sencilla y rápida comparada con las anteriores, además de eliminar los componentes indeseados, rompe

con la interacción fármaco-proteína. Para lograr precipitar las proteínas es necesario modificar las interacciones que permiten que éstas se encuentren solubles en medio acuoso, como lo son las interacciones polares entre los aminoácidos que conforman a la proteína y el agua del medio, las interacciones iónicas que se dan entre las proteínas cargadas y las sales contenidas en la matriz, así como las fuerzas de repulsión electrostáticas que se generan entre proteínas cargadas y que evitan que se de lugar a la agregación. La solubilidad de una proteína también es dependiente de su punto isoeléctrico, el cual se define como el pH en donde una proteína se encuentra con una carga neutra, a pH debajo de este punto la proteína se encontrará con carga positiva y tendrá una carga negativa cuando el pH sea mayor. El rango de pH en donde la mayoría de las proteínas se encuentran sin carga es entre 4 y 6. (*Shafaati y Clark, 2002; Polson et al. 2003*)

Los agentes utilizados para la precipitación pueden ser de naturaleza diversa, desde solventes orgánicos, ácidos y sales. La precipitación por solventes orgánicos como acetonitrilo, metanol y etanol, desplaza las moléculas de agua hacia el solvente orgánico, lo que genera que las proteínas se agreguen y precipiten posteriormente. Al mismo tiempo al existir aminoácidos hidrofóbicos en la proteína, éstos tienen una mayor afinidad con el solvente, produciéndose así desnaturalización de las proteínas. El uso de precipitantes ácidos, como el ácido perclórico y ácido tricloroacético, genera sales insolubles con los aminoácidos con carga positiva. Por su parte, las sales en altas concentraciones ocasionan precipitación de proteínas al hidratarse y disminuir

la cantidad de moléculas de agua disponibles en el medio. (*Shafaati y Clark, 2002; Prabu et al. 2012*)

2.2. Manejo Clínico de Amiodarona

Amiodarona es un medicamento usado preferente por médicos especialistas del área de cardiología. Por sus particularidades cinéticas, su mecanismo de acción y por su indicación clínica, la experiencia en su uso en diferentes grupos de pacientes a nivel internacional ha orientado a seguir recomendaciones estrictas sobre su manejo que garanticen reducir su potencial de toxicidad, asegurando mayor efectividad. Existen diversas guías clínicas de manejo del medicamento en diferentes indicaciones y en distintos grupos de pacientes que pueden ser utilizadas por los profesionales de la salud y que son sometidas a revisiones constantes. Estas recomendaciones señalan las indicaciones de dosis, duración del tratamiento, criterios de uso y contraindicaciones, interacciones con otros medicamentos, efectos adversos, parámetros clínicos que deben monitorearse durante la terapia y los cuidados posteriores para el cumplimiento del paciente, entre otros. Estas guías, forman parte de la experiencia que orienta la utilización de medicamentos y fomenta su uso racional, además de estar certificadas por las comunidades científicas están disponibles para su consulta e implementación. A pesar de poder consultar fácilmente estos documentos, hasta ahora, en ninguno se ha utilizado la

detección plasmática de amiodarona para relacionarla con su efectividad terapéutica o tóxica. (*Siddoway, 2003; Spence et al. 2011*)

Se ha recomendado medir niveles plasmáticos de amiodarona y desetilamiodarona (DEA) como estrategia para evitar el cambio temprano en la terapia en aquellos pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento. (*Karvaly et al. 2013*)

Ambos, medicamento y metabolito, pueden ser medidos por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa, obteniéndose mediciones con bajos límites de cuantificación y en un tiempo de análisis corto. Por otra parte, existen autores que han logrado validar métodos por cromatografía de líquidos para la determinación de amiodarona bajo diversas condiciones. (*Juenke et al. 2004*)

Haffajee *et al.* en 1983 mediante cromatografía de líquidos logró cuantificar niveles séricos de amiodarona en 122 pacientes en tratamiento crónico oral para el control de taquiarritmias auriculares y ventriculares, controlando en un 83% las primeras y en un 76% las segundas. También reportaron que pacientes con concentraciones séricas de amiodarona mayores a 2.5 mg/L presentaron efectos adversos del sistema nervioso central. Sin embargo el método no fue suficiente sensible para separar el metabolito activo de la muestra.

2.3. Relación de amiodarona y obesidad

El Vd de los fármacos altamente lipofílicos se ve significativamente aumentado en la obesidad, por lo que algunos anestésicos como propofol y las benzodiazepinas se han recomendado dosificar en base al peso ideal y no al peso total, ésto con el propósito de evitar una sobre dosificación que puede dar lugar a una sedación excesiva. (De Baerdemaeker et al. 2004, Casati y Putzu 2005). Sin embargo, existen excepciones como es el caso de remifentanil cuyas características farmacocinéticas no se modifican, a pesar de ser un opioide altamente lipofílico. (De Baerdemaeker et al. 2004) Dentro de los fármacos antiarrítmicos de clase II, se ha justificado el monitoreo de niveles séricos de propanolol ya que existe un aumento proporcional entre las concentraciones plasmáticas y el grado de obesidad (Pereira et al. 2003)

En el caso de amiodarona existen pocos estudios farmacocinéticos con pacientes con obesidad, por sus características lipofílicas y su elevado Vd, es probable que las dosis requeridas para alcanzar un efecto terapéutico deben ser mayores debido al tiempo que tardan en distribuirse por los tejidos, sin embargo, recordando que existe una importante acumulación en tejido adiposo que puede ocasionar una mayor incidencia de efectos adversos, no es posible recomendar un ajuste de la dosis basado en el peso. (Erstad et al. 2004)

Se ha descrito el comportamiento farmacocinético de amiodarona cuando se administra por vía oral en pacientes con obesidad en poblaciones japonesas, encontrándose que el IMC así como la edad, son los principales factores que

afectan de manera directa la depuración de los fármacos, y por consiguiente sus concentraciones séricas. (*Fukuchi et al. 2009, Araki et al. 2011*)

De igual manera, se han correlacionado las concentraciones de amiodarona en plasma con respecto a las concentraciones en tejido adiposo mediante una biopsia del mismo. Al comparar ambos niveles se demostró que existe una relación directa, siendo las concentraciones en tejido adiposo mucho mayores que en sangre, esto debido a la tendencia del fármaco a acumularse. No es común monitorizar los niveles de amiodarona en tejido graso, debido a que es necesario un proceso invasivo. (*Lafuente-Lafuente et al. 2009*)

2.4. Análisis crítico de los antecedentes

Las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas del fármaco de interés, aunada a la evidencia clínica de su uso en terapia crónica para una cardiopatía tan prevalente como las arritmias, lo hacen el mejor recurso clínico utilizado en la práctica habitual. El comportamiento de los medicamentos dentro de un organismo humano es difícil de predecir debido a la influencia de múltiples factores interindividuales y de diversas índoles. El comportamiento cinético de cualquier medicamento que determina las características de absorción y disposición en el organismo de prueba y de los cuales se obtienen sus parámetros farmacocinéticos como vida media biológica ($t_{1/2}$), volumen de distribución (Vd), aclaramiento, etc. generalmente se obtiene de poblaciones sanas controladas en donde el medicamento es administrado en una sola dosis

generalmente intravenosa y estas condiciones difieren mucho de la práctica habitual de uso de los diferentes fármacos en donde las características de los pacientes son muy diferentes en edad, peso, condición social, patologías etc. El cuantificar las concentraciones en sangre de un medicamento no es una práctica de rutina hospitalaria en nuestro medio por la falta de pruebas analíticas sensibles que permitan entender la variabilidad en las diferentes poblaciones de estudio. Existen pocos estudios en los que amiodarona se cuantifique en un fluido biológico en pacientes en terapia crónica oral, y que fundamenten su eficacia en la práctica clínica diaria. Por otro lado, el fármaco de estudio cumple los criterios que justifican ser medido en sangre como son su índice terapéutico estrecho y su cinética compleja y poco estudiada, además; otra particularidad de este fármaco como es su lipofilicidad favorece que en los sujetos seleccionados para el estudio se pueda ver alterada su distribución afectando su V_d , su aclaramiento y su cinética en general.

Los métodos cromatográficos son los más utilizados para la cuantificación de fármacos, en el caso de amiodarona se han desarrollado y validado métodos de HPLC para medir su concentración a partir de matrices biológicas empleando una fase estacionaria no polar y una fase móvil compuesta de un solvente orgánico y agua. *Valencia et al en el 2000*, midieron amiodarona en suero mediante HPLC con detección de ultravioleta, la preparación de la muestra consistió en la adición de 2 partes de acetonitrilo y 1 parte de suero, agitación por 45 s, incubación a 24°C por 5 min y posterior centrifugación a 6000 rpm durante 2 min e inyección de 20 μL del sobrenadante al cromatógrafo.

Utilizando una columna Bondapak CN RP (3.9 x 150mm) a 45°C con una fase móvil compuesta por KH_2PO_4 /metanol/acetonitrilo (40:37:23 v/v) a pH 3.5 con un flujo de 0.6 mL/min, obtuvieron un tiempo de retención de 4.9 min. La detección se llevó a cabo a 242 nm, se obtuvo un límite de detección de 0.11 $\mu\text{g/mL}$. De igual manera, en el 2006 *Rajendran et al* describieron un método de HPLC para la medición simultánea de amiodarona y su metabolito desetilamiodarona, la fase móvil consistió en una mezcla de acetato de amonio (pH 3.5) y acetonitrilo 40:60 (v/v), bajo un flujo isocrático de 1 mL/min a través de una columna C18, la detección se realizó a 242 nm y 247 nm respectivamente. El tiempo de análisis fue de 10 min y se obtuvo un límite de cuantificación de 0.01 $\mu\text{g/mL}$, el método de extracción del fármaco y su metabolito a partir de plasma humano fue por precipitación de proteínas con acetonitrilo.

De acuerdo a las características fisicoquímicas de amiodarona y a los cambios fisiopatológicos que se presentan en los sujetos con un exceso de grasa, los niveles del fármaco deberán ser distintos comparados con aquellos que tengan un IMC menor. El único precedente existente fue el descrito por *Fukuchi et al.* en el 2009, donde se comprobó mediante modelo farmacocinético computacional que el IMC es un factor que se correlaciona con las concentraciones plasmáticas de amiodarona, sin embargo refieren que es necesario realizar más estudios en poblaciones reales con uso de amiodarona y de diferentes etnias.

3. JUSTIFICACIÓN

Es necesario poder predecir el comportamiento farmacocinético de amiodarona, un medicamento ampliamente utilizado en un problema prioritario de salud y que posee una farmacocinética compleja en pacientes con obesidad, así como establecer relaciones entre las concentraciones plasmáticas del fármaco con los datos antropométricos de los pacientes, y concentraciones plasmáticas contra efectos adversos. De igual manera es importante la creación de protocolos de monitoreo clínico de amiodarona con el fin de optimizar la terapia antiarrítmica, y así, evitar la aparición de sus efectos adversos y/o la modificación temprana o innecesaria del régimen de dosificación.

En nuestro medio, solo algunos hospitales cuentan con un servicio de monitoreo de niveles plasmáticos de algunos medicamentos. En muchos casos la determinación se ve referida a laboratorios extranjeros donde en ocasiones el retraso de los resultados ya no refleja ninguna utilidad clínica. El presente trabajo de tesis pretende desarrollar y validar un método para la monitorización plasmática de amiodarona, con el fin de que pueda ofrecerse la determinación a otros centros hospitalarios y contribuir con el correcto uso del medicamento. Además, los resultados del estudio sentarán las bases para desarrollar protocolos de seguimiento de pacientes que utilicen el medicamento.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Las concentraciones plasmáticas de Amiodarona serán mayores en el grupo de estudio con un IMC ≥ 25 kg/m² y permitirán establecer relaciones con las variables clínicas estudiadas.

4.2. Objetivo General

Medir las concentraciones plasmáticas de amiodarona y relacionarla con parámetros clínicos de obesidad y toxicidad en la población estudiada.

4.3. Objetivos específicos

- Desarrollar, validar e implementar un método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la determinación de concentraciones de amiodarona a partir de muestras de plasma humano.
- Cuantificar las concentraciones plasmáticas del fármaco en grupos de pacientes con un IMC < 25 kg/m² y con IMC ≥ 25 kg/m².
- Establecer la relación de la concentración del fármaco en estos grupos con indicadores de obesidad y efectos adversos.
- Contribuir con el uso racional de amiodarona en el grupo poblacional estudiado estableciendo lineamientos para su mejor uso clínico.

5. METODOLOGÍA

5.1. Equipo de laboratorio y reactivos

Los equipos y reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis se encuentran localizados en los laboratorios de Biofarmacia y de Biotecnología ubicados en el Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Tabla.2 Equipos de laboratorio

Nombre	Marca	No. de serie
Potenciómetro	Corning 430	No. 12 799
Balanza analítica	AND HR-200	No. 1230 942
Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	Varian, Inc. Cary 50	No. V1012M051
Baño de ultrasonido	Branson 2510R-MTH	No. RLB10015604D
Agitador de tubos	Barnstead/Thermolyne	No.63200 1077391
Módulo de separación cromatográfica	Waters 2695	No. F035M4151M
Detector de arreglo de diodos	Waters 2696	No. A04296585

Tabla 3. Reactivos de laboratorio

Nombre	Marca	No. CAS
Acetonitrilo grado HPLC	Tedia	75-05-8
Metanol grado HPLC	Tedia	67-56-1
Agua grado HPLC	Tedia	7732-18-5
Hexano grado HPLC	J.T. Baker	110-54-3
Acetato de Amonio 99%	Especialidades Químicas	631-61-8
Amiodarona HCl 1mg ≥98%	Sigma- Aldrich	19774-82-5

5.2. Desarrollo del método analítico

5.2.1. Condiciones cromatográficas

Se utilizó un equipo de Cromatografía de líquidos de Alta Resolución Waters 2695 acoplado a un detector de arreglo de diodos 2699, como fase estacionaria una columna Phenomenex Hyperclone ODS C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).

Se utilizaron dos fases móviles con el fin de evaluar la que ofreciera mejor separación del analito, la primera consistió en una disolución de acetonitrilo/buffer de fosfatos (pH 4.5) (60:40 (v/v)), mientras que la segunda fase móvil estaba constituida por acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (50:20:30 (v/v)), utilizando un sistema isocrático con un caudal de 1.0 y 2.0 mL/min respectivamente. Posteriormente se modificó la segunda fase móvil a volúmenes de acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (60:10:30

(v/v)), siendo esta composición la que se utilizó durante todo el proyecto. La cuantificación del fármaco se realizó a una longitud de onda de 240 nm la cual fue determinada previamente mediante un barrido espectral en el rango ultravioleta-visible (UV-Vis).

5.2.2. Preparación de disolución stock de amiodarona

Se preparó una disolución stock de clorhidrato de amiodarona en una disolución acetonitrilo:agua (1:1) grado HPLC en una concentración de 1 mg/mL. A partir 50 mg de clorhidrato de amiodarona, se transfirieron a un matraz de aforación de 50 mL y se añadió el volumen de solvente correspondiente.

5.2.3. Preparación de disoluciones de trabajo

A partir de la concentración de la disolución stock de amiodarona se realizaron los cálculos correspondientes para preparar seis disoluciones de trabajo en concentraciones de 500, 200, 100, 40, 20 y 10 µg/mL. Dichas disoluciones fueron preparadas tomando alícuotas de la disolución stock y aforando al volumen correspondiente en matraces volumétricos de 10 mL.

5.3. Validación del método bioanalítico

5.3.1. Selectividad

Se analizaron de manera individual seis diferentes matrices plasmáticas, además de una matriz hemolizada y una lipémica para demostrar la ausencia de interferencia de los componentes endógenos de la misma.

5.3.2. Límite inferior de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LIC) correspondió al punto menor en la curva de calibración, para este estudio se consideró un LIC de 0.5 µg/mL.

5.3.3. Curva de calibración

La curva de calibración se realizó en plasma añadiendo el volumen correspondiente de una disolución de trabajo para obtener concentraciones en un rango de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 25.0 µg/mL. Se prepararon y midieron tres curvas de calibración en diferentes días.

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser

menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

El límite de detección (LOD) de la curva de calibración se calculó en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración, utilizando la fórmula $LOD = 3.3 \cdot \sigma / S$, donde S corresponde a la pendiente de la curva y σ a la desviación estándar de la señal de muestras blanco con concentración conocida. Para el límite de cuantificación (LOQ) se utilizó la fórmula $LOQ = 10 \cdot \sigma / S$ (ICH Harmonized Tripartite Guideline, 1996).

5.3.4. Precisión

5.3.4.1. Repetibilidad

Se prepararon y analizaron en un mismo día y por quintuplicado los controles MCA, MCM, MCB y LIC, a concentraciones de 18, 2.0, 0.8 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. La concentración se calculó con respecto a la curva de calibración.

5.3.4.2. Reproducibilidad

Al igual que en el punto anterior se preparó y analizó por quintuplicado las muestras control MCA, MCM, MCB y LIC. El análisis se realizó por duplicado en dos días distintos.

5.3.5. Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desviación} = (\text{Concentración obtenida} / \text{Concentración añadida}) \times 100$$

5.3.6. Estabilidad

5.3.6.1. Estabilidad a corto plazo

Se prepararon por triplicado los controles MCA y MCB, posteriormente se realizó la determinación inmediatamente, se dejó reposar las muestras a temperatura ambiente, la medición siguiente se llevó al cabo de transcurridos 30 min. La concentración se calculó a partir de una curva de calibración recién preparada.

5.4. Selección de los pacientes del estudio

5.4.1. Población de estudio

Los sujetos de estudio fueron derechohabientes del IMSS que acudieron a la consulta de Arritmias en el departamento de Cardiología de la UMAE, Hospital de Cardiología No. 34, durante el periodo de Febrero de Mayo 2016.

5.4.2. Criterios de inclusión

- Pacientes adultos (>18 años), género indistinto.
- Pacientes que estén bajo tratamiento farmacológico con amiodarona por vía oral por más de 3 meses.

5.5. Formación de grupos de estudio

La población de estudio fue dividida en dos grupos de acuerdo al IMC que presentaron, un grupo control cuyos individuos tenían un IMC < 25 kg/m² y el grupo de estudio donde se encontraban los pacientes de IMC ≥ 25 kg/m².

5.6. Análisis de Muestras

5.6.1. Obtención de muestras sanguíneas

La recolección de la muestra sanguínea se realizó mediante punción venosa utilizando un sistema Vacutainer[®], la recolección se hizo en tubos con EDTA. Se separó el plasma de los demás componentes sanguíneos por centrifugación para su posterior análisis.

5.6.2. Extracción de amiodarona de plasma sanguíneo

Se probaron dos metodologías para la extracción de amiodarona, la primera fue mediante precipitación de proteínas y la segunda por extracción líquido-líquido.

Se llevó a cabo la precipitación de proteínas con acetonitrilo como agente precipitante, los volúmenes utilizados fueron de 2:1, 3:1 y 4:1 con respecto al volumen de la muestra el cual se mantuvo fijo y fue de 400 μ L. Se añadió el plasma a un tubo Eppendorf[®] limpio de 1.5 mL, seguido del volumen correspondiente de solvente orgánico, la agitación se llevó a cabo de manera mecánica durante 5 min. Una vez agitada la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min, después de transcurrido el tiempo se llevó a centrifugación a 13,200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min, el sobrenadante se inyectó directamente en el equipo.

La extracción líquido-líquido se llevó a cabo a partir del plasma obtenido, se transfirieron 400 μL a un tubo Eppendorf® limpio de 1.5 mL, se añadieron 300 μL de buffer de acetato de amonio pH 4.5 y la disolución se agitó mecánicamente, posteriormente se añadió 1 mL de n-hexano agitándose nuevamente durante 2 min. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a una velocidad de 13,200 rpm durante 3 min, la fase orgánica fue transferida a un tubo limpio para la evaporación del solvente con flujo de nitrógeno. El residuo fue reconstituido con 800 μL de metanol y para su posterior inyección en el cromatógrafo. (Figura 4)



Figura 4. Esquema de los procedimientos de extracción de Amiodarona de plasma humano.

5.6.3. Cuantificación de Amiodarona

Una vez obtenida la señal de amiodarona, se calculó la concentración sérica mediante regresión lineal, primero se integró el pico del analito en el cromatograma para obtener el área del mismo, después se interpoló la respuesta en la ecuación de la recta calculada a partir de la curva de calibración.

5.7. Obtención de Información Clínica de los Pacientes

Se realizó una entrevista personal con los participantes del estudio posterior a la firma del consentimiento informado, la información recabada fue recopilada en la hoja de recolección de datos (ANEXO A). También se revisó el expediente clínico de cada uno de los sujetos de estudio, para identificar la presencia de los efectos adversos secundarios al uso amiodarona. Se solicitaron pruebas de función hepática, hormonas tiroideas así como un perfil bioquímico de cada sujeto.

5.7.1. Definición de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Fuente
Género	Variable biológica y genética que divide a los seres humanos.	Masculino y Femenino	Nominal	Expediente clínico
Edad	Período de tiempo transcurrido desde el nacimiento de un individuo hasta la actualidad.	Años	Cuantitativa	Expediente clínico
Hipertensión arterial sistémica	Síndrome caracterizado por la elevación persistente de las cifras de presión arterial a cifras \geq 140/90 mm/Hg	Presencia/ausencia	Nominal	Expediente clínico
Diabetes Mellitus	Conjunto de trastornos metabólicos caracterizados por la elevación de niveles plasmáticos de glucosa.	Presencia/ausencia	Nominal	Expediente clínico
Insuficiencia Renal	Disminución de la función renal expresada por una tasa de filtración glomerular <60 mL/min/1.73 m ²	Presencia/ausencia	Nominal	Expediente clínico
Tiempo de tratamiento con amiodarona	Lapso de tiempo que transcurrió desde el inicio del tratamiento	Meses y años	Cuantitativa	Expediente clínico
Posología	Determinación de las dosis en que deben administrarse los medicamentos.	mg de amiodarona/ día	Cuantitativa	Expediente clínico
Diagnóstico	Identificación de la enfermedad en base a signos y/o pruebas.	Tipo de diagnóstico médico	Nominal	Expediente clínico
Indicación médica	Término que justifica el uso de un medicamento para algún padecimiento.	Tipo de indicación médica	Nominal	Expediente clínico
Efectos adversos	Efecto no intencionado de un producto farmacéutico que se produce cuando éste se administra en dosis utilizadas normalmente y que esta relacionado con las propiedades farmacológicas del producto.	Presencia/ausencia	Nominal	Expediente clínico

Tipo de efecto secundario	Efecto benéfico o perjudicial producido por amiodarona.	Presencia/ausencia	Nominal	Expediente clínico
Índice de masa corporal	Indicador de la relación entre el peso y la talla que se usa para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos.	<ul style="list-style-type: none"> • <18.5 Peso bajo • 18.5- 24.9 Normal • 25.0-29.9 Sobrepeso • ≥30.0 Obesidad. 	Cuantitativa	Expediente clínico

5.7.2. Medición de datos antropométricos

Se realizó la medición de estatura y peso de los sujetos de estudio empleando una báscula mecánica con estadímetro. Para el cálculo del IMC de los pacientes se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de masa corporal (IMC)} = \frac{\text{kilogramos de peso}}{(\text{talla en metros})^2}$$

La clasificación de los individuos se realizó de acuerdo a los parámetros de la Tabla 4.

Tabla 4. Categorías de peso de acuerdo al índice de masa corporal

IMC (kg/m ²)	Categoría
<18.50	Bajo peso
18.50 – 24.99	Normal
≥25.00	Sobrepeso
≥30.00	Obesidad

(Flegal et al. 2009, Rosales, 2011)

5.8. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central, así como la prueba t de Student para la comparación de la población de estudio. Se consideró significativo con una $p < 0.05$ e intervalo de confianza del 95% mediante el paquete estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS) 10 Data análisis.

5.9. Manejo de Residuos

Se utilizaron los siguientes solventes para la extracción y cuantificación de amiodarona: metanol, acetonitrilo y hexano, estos fueron dispuestos en el Colector C: Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenados. El búfer de acetato de amonio y búfer de fosfatos contenidos en

la fase móvil fueron desechados en el Colector A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas.

Los tubos de muestras de sangre, micro tubos y micro puntillas fueron dispuestos en el contenedor bolsa roja para residuos biológico-infecciosos no anatómicos, mientras que la sangre y suero sobrantes en el contenedor hermético rojo para líquidos.

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo del método analítico

Se realizó un barrido de longitudes de onda en un rango de 200 a 800 nm, con el fin de obtener la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de amiodarona. La medición se llevó a cabo en una disolución stock de amiodarona de 10 $\mu\text{g/mL}$, mediante el uso de un espectrofotómetro UV-Vis y obteniendo una $\lambda_{\text{máx}}$ de 240 nm (Figura 5).

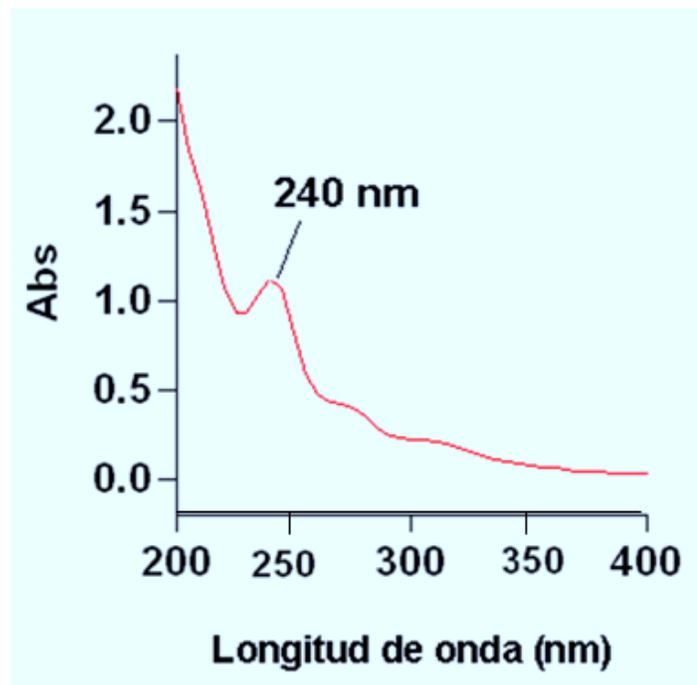


Figura 5. Espectro de absorción de una disolución de amiodarona 10 $\mu\text{g/mL}$, con una longitud de onda de máxima absorción de 240 nm.

Para la estandarización de las condiciones cromatográficas se evaluaron dos fases móviles. La primera fue la compuesta por acetonitrilo/búfer de fosfatos (pH 4.5) (60:40 (v/v)). Sin embargo al utilizar estas condiciones no fue posible la detección del analito en ningún nivel de concentración en un tiempo de análisis de 30 min. Como se puede apreciar en la Figura 6, solo es posible detectar una señal a un tiempo de retención de 2 a 3 min que pertenece al diluyente donde se encuentra disuelto el fármaco.

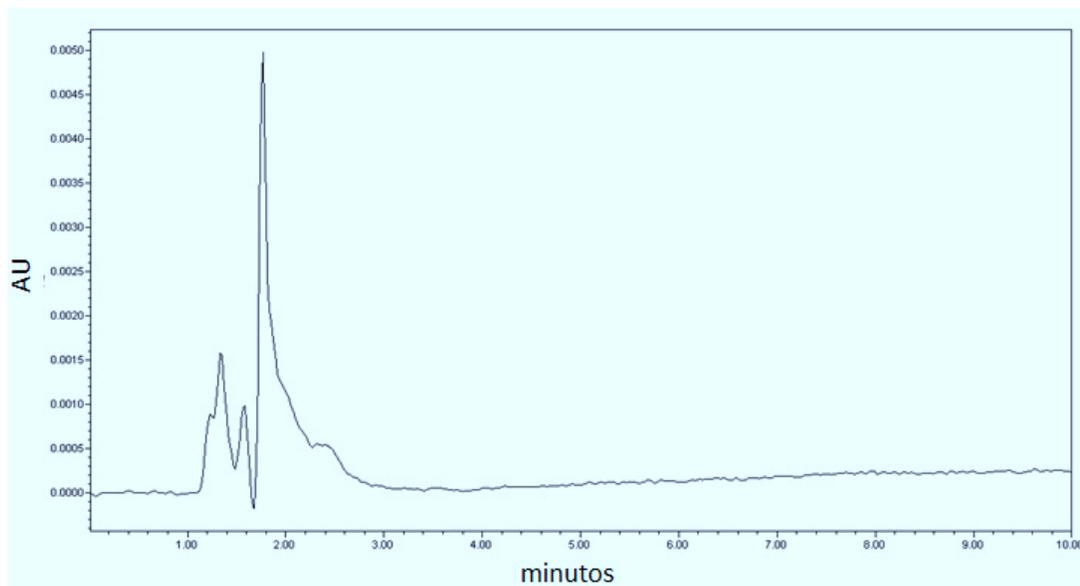
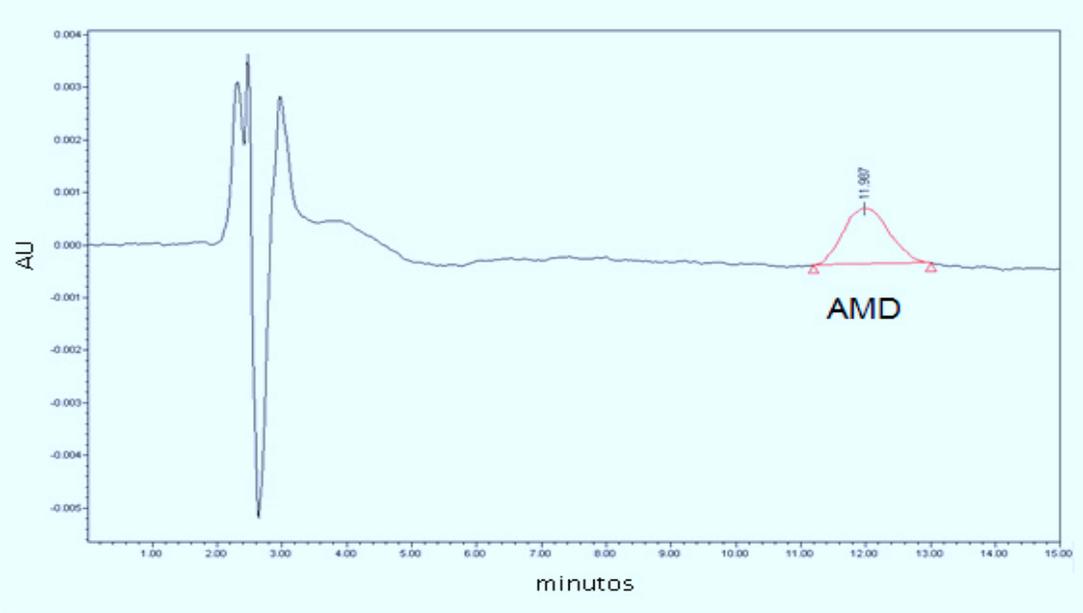


Figura 6. Cromatograma de Amiodarona 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fase móvil ACN/Buffer de fosfatos (pH 4.5) (60:40(v/v)).

Al evaluar la segunda fase móvil constituida por acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (50:20:30 (v/v)), se aumentó el caudal a 2 mL/min. Bajo estas condiciones fue posible detectar amiodarona a un tiempo de retención de aproximadamente 11.5 ± 0.4 min. Al ser un tiempo de análisis

largo, se modificaron las condiciones de la fase móvil inicial a una composición de acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5) /metanol (60:10:30 (v/v)), logrando reducir el tiempo de retención de amiodarona a 5.6 ± 0.5 min.

A)



B)

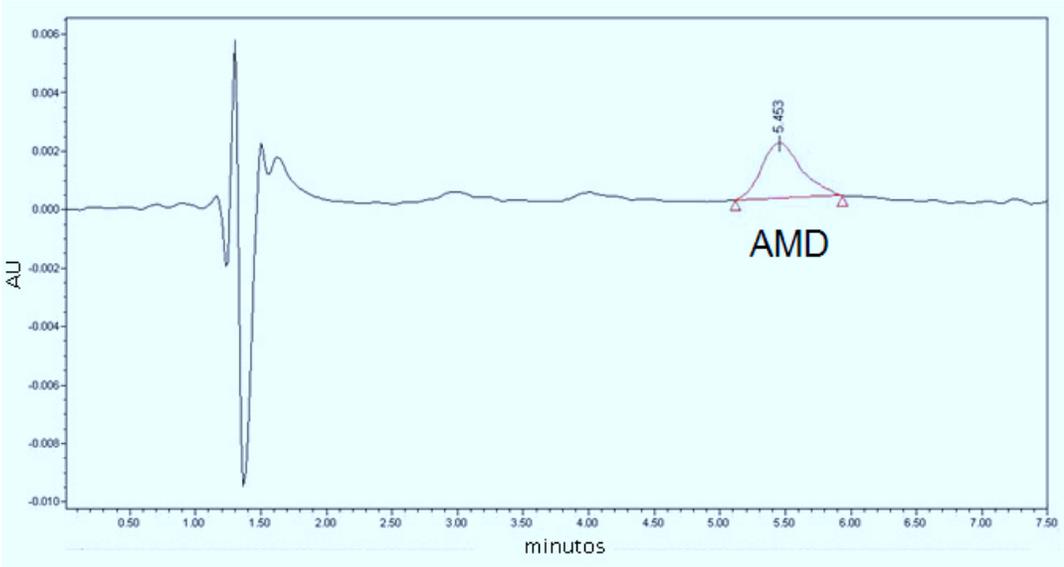


Figura 7. Detección de Amiodarona; A) fase móvil acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (50:20:30 (v/v)), t_R 11.9 min; B) fase móvil acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (60:10:30 (v/v)), t_R 5.4 min.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas finales

Fase Estacionaria	Columna Phenomenex Hyperclone ODS C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m).
Fase Móvil	Acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5) /metanol (60:10:30 (v/v)).
Caudal	2.0 mL/min
Longitud de onda	240 nm
Volumen de inyección	45 μ L

6.2. Validación del método bioanalítico

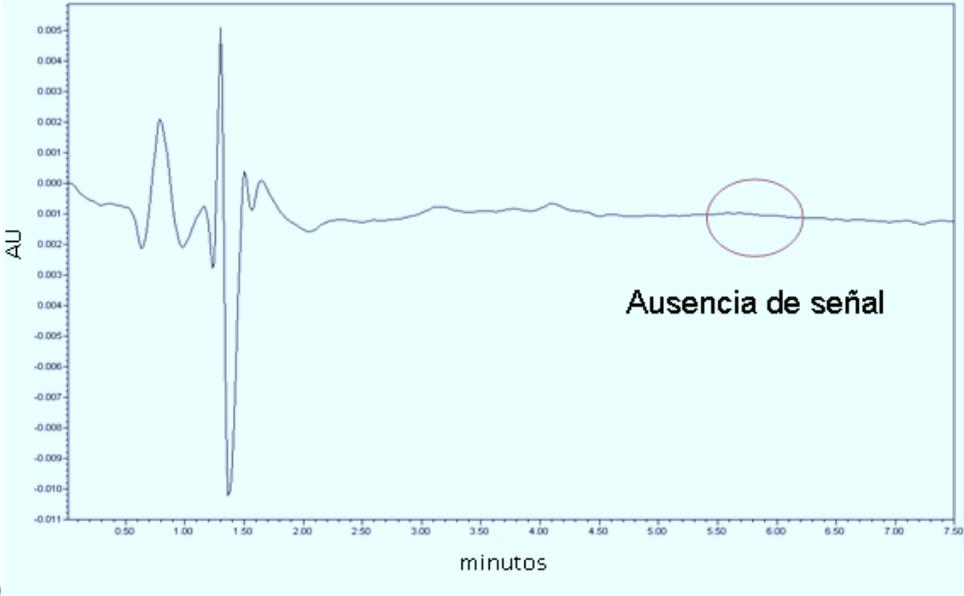
Una vez que se encontraron las condiciones necesarias para la detección de amiodarona, se llevaron a cabo los parámetros de validación.

6.2.1. Selectividad

Se demostró la ausencia de interferencia de las sustancias endógenas del plasma en el tiempo de retención correspondiente a amiodarona, que pudiera afectar la señal del analito. La selectividad se llevó a cabo mediante el análisis

de 6 muestras de plasma de diferentes sujetos analizadas individualmente, la extracción del fármaco se realizó mediante la técnica de extracción líquido-líquido.

A)



B)

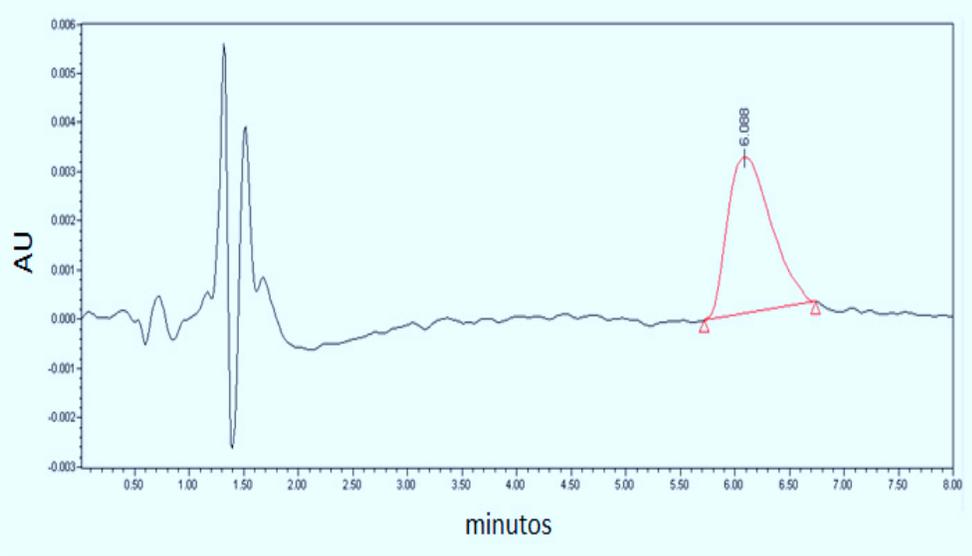


Figura 8. Selectividad del método en muestra de plasma sin adición de analito (A= plasma procesado sin adición de analito; B= plasma humano procesado con adición de analito AMD 2.5 µg/mL)

6.2.2. Curva de calibración

Se prepararon y analizaron por triplicado 6 estándares, en un rango de concentraciones de 0.5 a 25 µg/mL. En promedio las concentraciones obtenidas para cada punto de la gráfica se encontraron dentro del ±15% de las concentraciones añadidas (Figura 9). En la Tabla 6 se muestra el resumen de los parámetros analíticos para la curva de calibración.

Tabla 6. Parámetros analíticos curva de calibración

Curva de Calibración		1400.7 ± 700 [x] ± 5138.9 ±257
R²		0.998
Límite de detección (LOD)	0.5 µg/mL	0.26
Límite de cuantificación (LOQ)	0.5 µg/mL	0.43

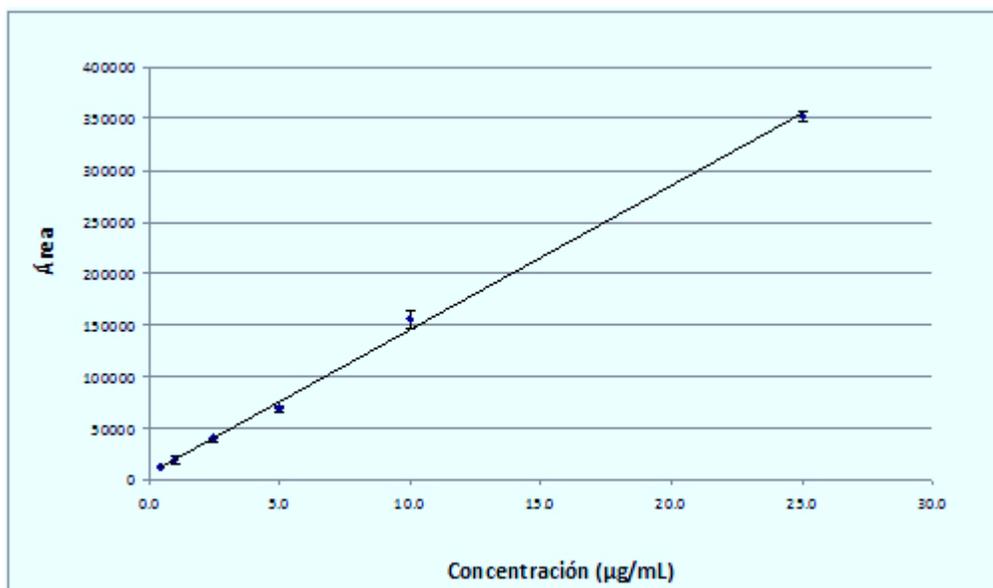


Figura 9. Curva de calibración AMD, concentraciones de 0.5 a 25 µg/mL.

6.2.3. Límite inferior de cuantificación

Para el método desarrollado el LIC fue de 0.5 µg/mL, el cual corresponde al punto mas bajo de la curva de calibración.

6.2.4. Precisión y exactitud

En la Tabla 7, se muestran los resultados para los parámetros de precisión, tanto repetibilidad como reproducibilidad, así como el parámetro de exactitud calculado a partir de éstos. Los coeficientes de variación para todos los puntos de precisión fueron menores al 15%, cumpliendo así con lo establecido por la NOM-177-SSA1-2013.

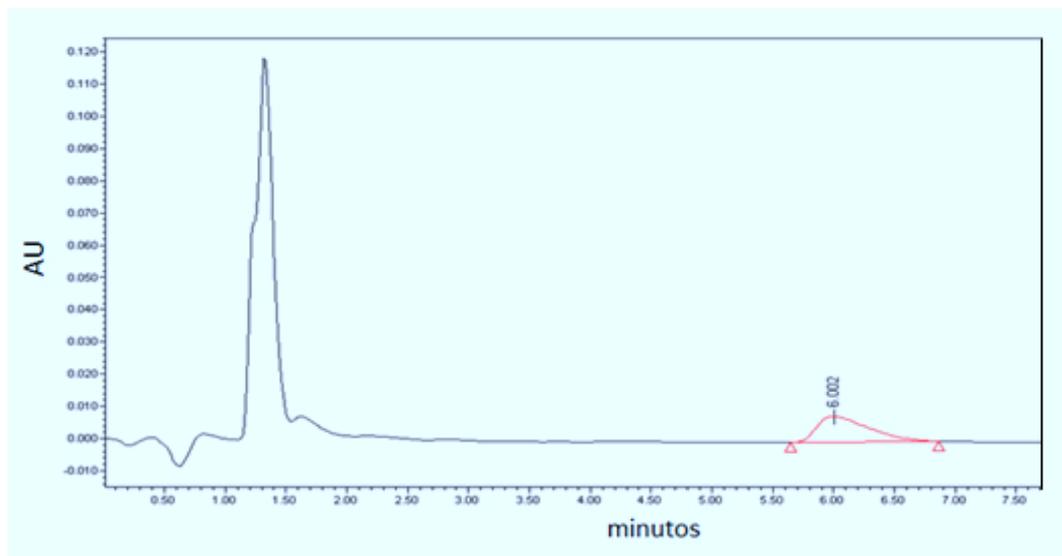
Tabla 7. Resumen de los parámetros de precisión y exactitud para los puntos control MCA, MCM, MCB y LIC.

Concentración añadida (µg/mL)	Repetibilidad (n=5)			Reproducibilidad (n=5)		
	Concentración observada (µg/mL) ± DS	C.V. %	Exactitud %	Concentración observada (µg/mL) ± DS	C.V. %	Exactitud %
0.5	0.50 ± 0.05	9.8	99.50	0.49 ± 0.05	10.2	98.05
0.8	0.78 ± 0.04	5.6	97.32	0.78 ± 0.05	6.4	97.44
2.0	1.94 ± 0.16	8.1	97.07	1.92 ± 0.20	10.4	96.01
18.0	16.97 ± 0.75	4.4	94.29	17.91 ± 0.77	4.3	99.51

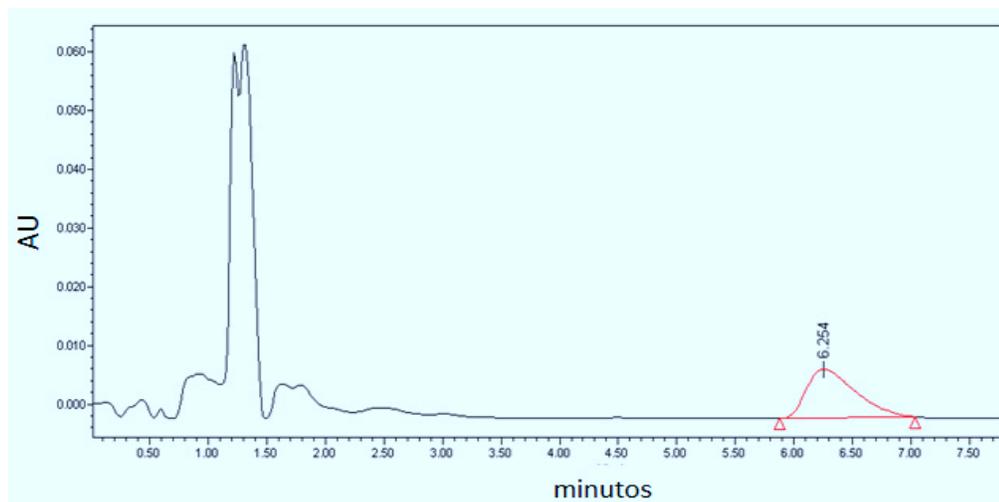
6.3. Procesamiento de muestras

Se logró recuperar el fármaco utilizando ambos métodos de extracción, precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido, a partir de plasma sanguíneo. Sin embargo, en el caso del uso de acetonitrilo como agente precipitante, además del pico correspondiente a amiodarona, se puede observar una señal ruido de gran intensidad. El área correspondiente al analito no se modificó significativamente al variar las relaciones del agente precipitante en el volumen de plasma.

A)



B)



C)

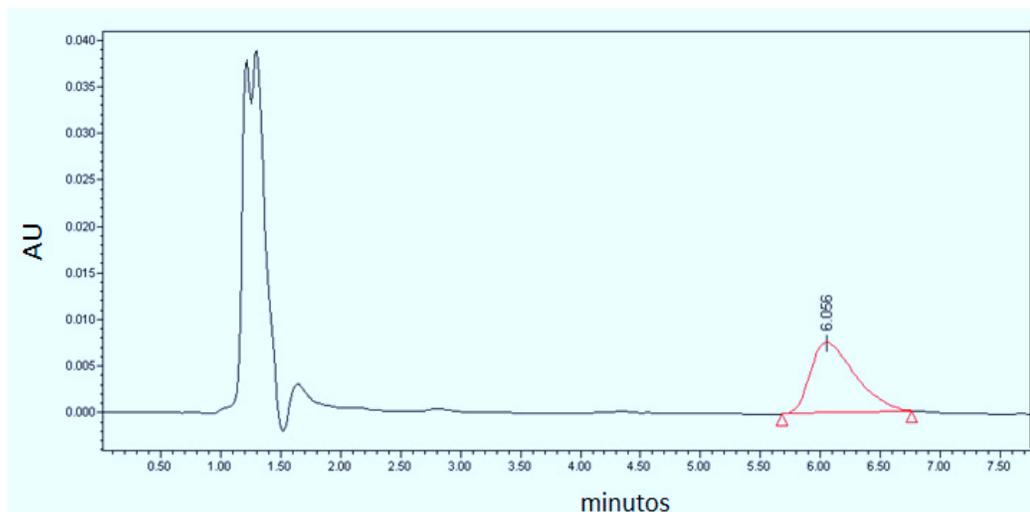


Figura 10. Cromatogramas de AMD 5 µg/mL extracción por precipitación de proteínas; A) 1:2 plasma-acetonitrilo, B) 1:3 plasma-acetonitrilo, C) 1:4 plasma-acetonitrilo.

La extracción líquido-líquido mostró una eficiente extracción del fármaco, en un tiempo corto de procesamiento. Al igual que en precipitación de proteínas se puede observar una señal distinta a la del analito dentro de los primeros minutos del análisis, sin embargo fue de menor intensidad comparada con dicha técnica. Debido a la rapidez de la técnica comparada con la precipitación de proteínas, así como una menor generación de ruido, se decidió utilizar la extracción líquido-líquido con hexano como el método para procesar las muestras de plasma humano en este estudio.

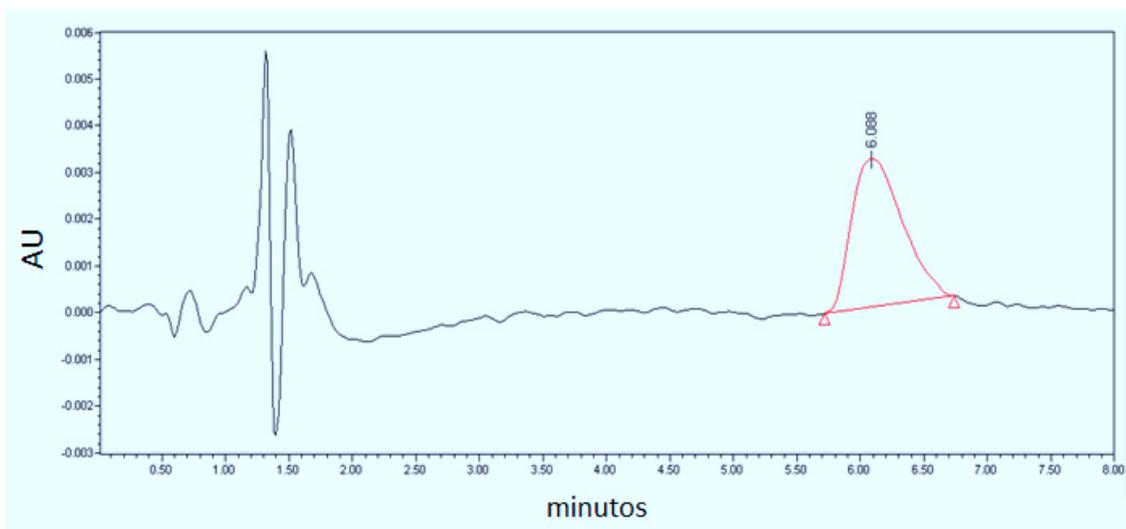


Figura 11. Cromatogramas de AMD 5 $\mu\text{g/mL}$ extracción líquido-líquido con n-hexano.

6.4. Análisis de muestras de pacientes

Los sujetos de estudio fueron elegidos de acuerdo a los criterios de inclusión mencionados cuando acudían a la consulta del Departamento de Arritmias de la UMAE Hospital No. 34 IMSS. En la Tabla 8 se muestran las variables recolectadas de la población de estudio para ambos grupos de individuos, aquellos con un IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$ y los que presentaban un IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$.

Tabla 8. Variables de la población de estudio en los grupos de IMC < 25 kg/m² e IMC ≥ 25 kg/m².

Variable	IMC < 25 (n=8)	IMC ≥ 25 (n=9)
<i>Edad (años)</i>	65.4 ± 20.7	51 ± 14.8
<i>Género</i>	F= 2/ M= 6	F= 4/ M= 5
<i>Nivel AMD (µg/mL)</i>	0.50 ± 0.52	0.35 ± 0.46
<i>Dosis de mantenimiento (mg)</i>	175 ± 46.3	166.7 ± 50
<i>Tiempo de tratamiento (años)</i>	8.4 ± 5.7	3 ± 2.2
<i>Dosis acumulada (g)</i>	538.38 ± 97	182.5 ± 40.22

Se cuantificó el fármaco a partir de las muestras plasmáticas de 17 pacientes bajo tratamiento con amiodarona que acudieron a la consulta, se encontraron en 41% concentraciones de amiodarona en rangos subterapéuticos (0.23 - 0.95 µg/mL), sólo el 18% de los sujetos analizados se encontraron dentro de los niveles terapéuticos de amiodarona (1.15- 1.32 µg/mL). El 41% restante, obtuvo un nivel de amiodarona en trazas o no detectable. En la Figura 12 se muestra la distribución de las concentraciones de amiodarona en la población de estudio.

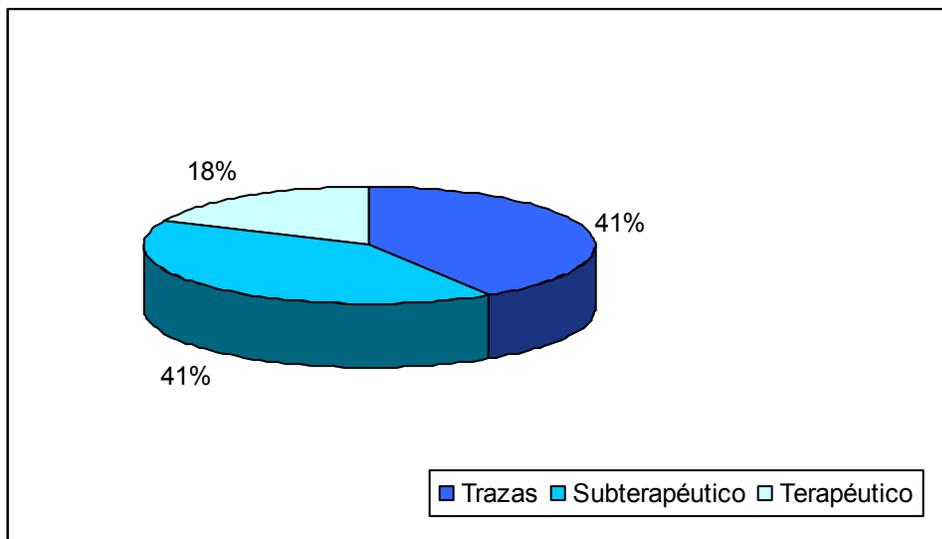


Figura 12. Distribución de los niveles plasmáticos de amiodarona en la población de estudio.

Se realizó el análisis estadístico mediante la prueba t de student con un intervalo de confianza del 95% para encontrar diferencias significativas entre las variables de los grupos de pacientes con niveles subterapéuticos de amiodarona ($< 1.0 \mu\text{g/mL}$) y aquellos que presentaron concentraciones terapéuticas del mismo (1.0 a $2.5 \mu\text{g/mL}$). Encontrándose que el tiempo de tratamiento medido en años, es un factor determinante en la concentración plasmática del fármaco ($P= 0.0043$), así como también lo fue la dosis acumulada ($P= 0.0003$) la cual es calculada directamente usando la dosis de mantenimiento por los años bajo tratamiento con amiodarona.

Tabla 9. Variables medidas en los sujetos de estudio con concentraciones subterapéuticas y terapéuticas de Amiodarona.

Variable	AMD niveles subterapéuticos (n=8)	AMD niveles terapéuticos (n=3)	P
<i>Edad (años)</i>	59 ± 18.7	49.95 ± 18.91	0.9786
<i>IMC (kg/m²)</i>	26.97 ± 5.3	22.92 ± 10.2	0.3467
<i>Dosis de mantenimiento(mg)</i>	185.71 ± 37.8	170.6 ± 65.3	0.5447
<i>Tiempo de tratamiento(años)</i>	2.83 ± 2.9	6.57 ± 5.9	0.0043
<i>Dosis acumulada(g)</i>	192.06 ± 41.3	408.8 ± 142.2	0.0003

No se demostró la influencia del índice de masa corporal como un factor determinante en la concentración plasmática de amiodarona ($P= 0.3467$), dos de los sujetos con un mayor IMC presentaron niveles de amiodarona en el rango de trazas o no detectables. Mediante un análisis de correlación lineal entre las variables de concentración plasmática e IMC de los pacientes, se confirmó que no existe una relación entre ambas variables.

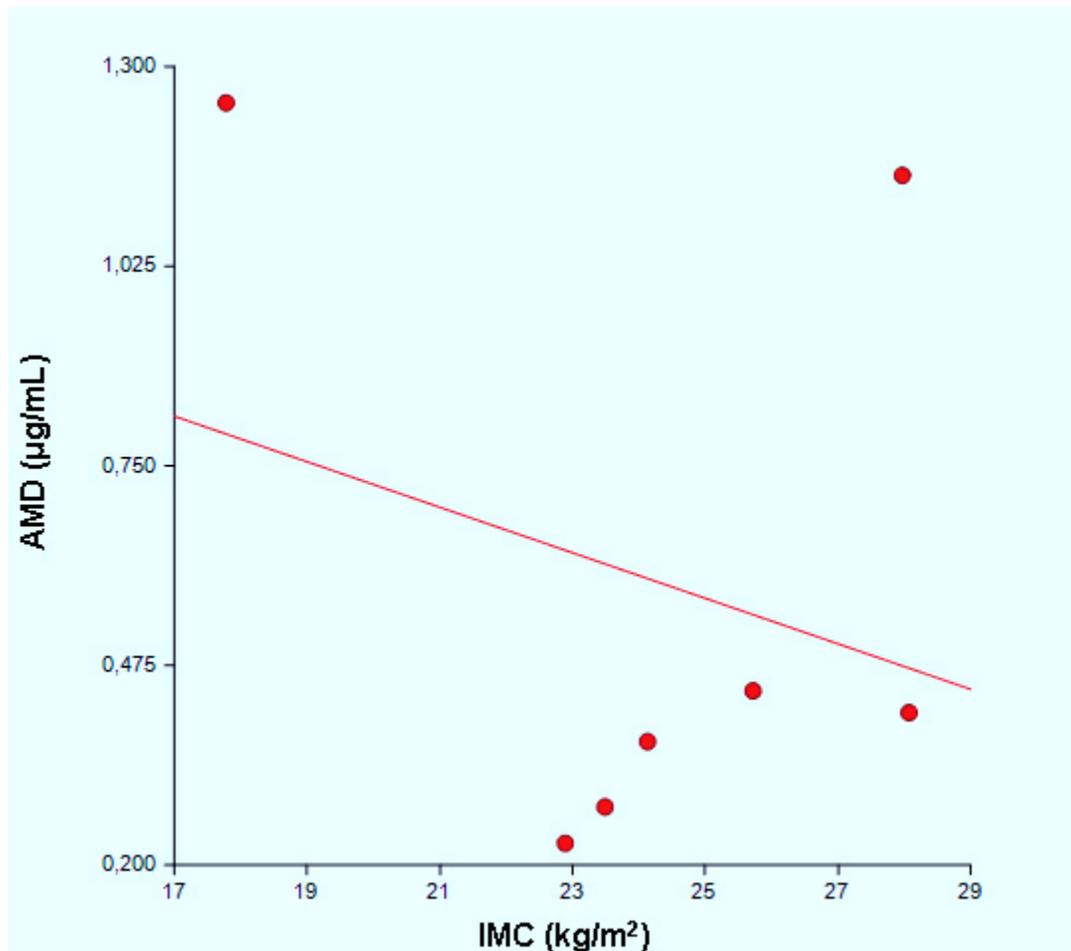


Figura 13. Gráfica de Regresión lineal Concentración de Amiodarona vs. IMC.

Los efectos adversos causados por amiodarona se detectaron mediante el empleo de pruebas de función tiroidea, enzimas hepáticas, así como con la revisión del historial clínico y entrevista con cada uno de los pacientes. En la Figura 14 se muestra la incidencia de los efectos adversos encontrados atribuidos a amiodarona. Algunos pacientes presentaron más de un efecto adverso característico del fármaco.

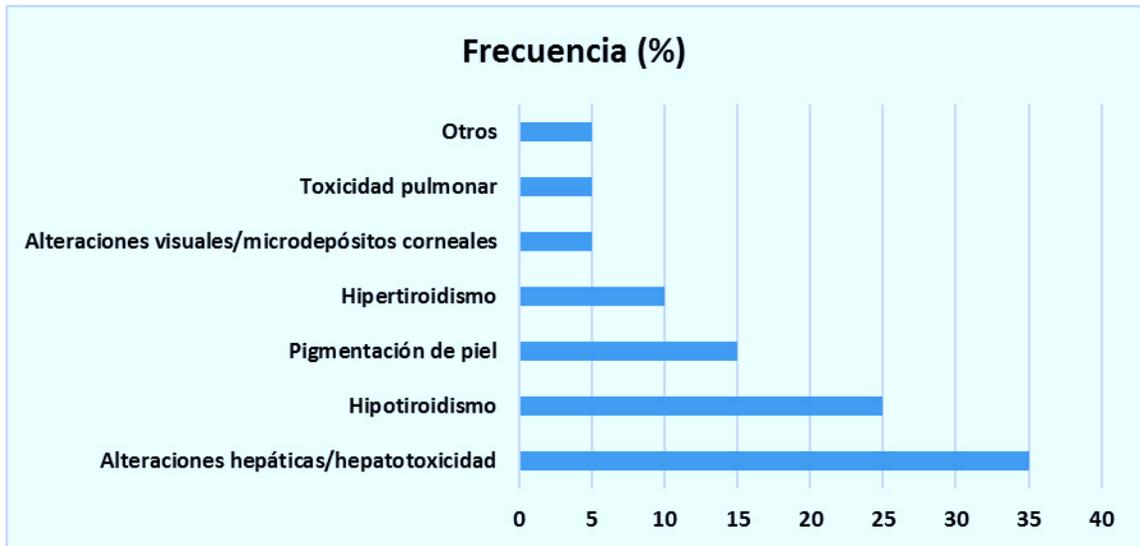


Figura 14. Frecuencia de los Efectos Adversos probables por el uso de Amiodarona en la población de estudio.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Este estudio permitió desarrollar un método de cuantificación de amiodarona en plasma de pacientes, cumpliendo con los requisitos establecidos en las normas y guías internacionales para la validación de este tipo de métodos. Se trabajó en un rango de 0.5 a 25 $\mu\text{g/mL}$ con el propósito de medir los niveles terapéuticos de amiodarona cuyas concentraciones recomendadas son de 1.0 a 2.5 $\mu\text{g/mL}$.

Las primeras condiciones cromatográficas propuestas incluyeron el uso de una fase móvil compuesta por acetonitrilo/buffer de fosfatos (pH 4.5) (60:40 (v/v)), sin embargo, no fue posible la detección de amiodarona debido a que ésta se encontraba fuertemente retenido en la columna. Por lo que se decidió aumentar la concentración de acetonitrilo en la fase móvil con el fin de disminuir su polaridad y hacer que el fármaco tuviera una interacción menor en la fase estacionaria, pero encontramos que en relaciones mayores a 60:40 del solvente orgánico y la fase acuosa, existía precipitación de las sales de fosfatos y por consiguiente un aumento en la presión en el sistema cromatográfico. Se optó por modificar la fase móvil, añadiendo metanol a la fase orgánica y cambiando el buffer de fosfatos por uno de acetato de amonio (pH 4.5) 100mM, ya que los cationes de NH_4^+ presentan una mayor solubilidad en solventes orgánicos como acetonitrilo y metanol (*Shellinger y Carr 2004*). La nueva fase móvil constituida por acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (50:20:30 (v/v)) permitió la detección de amiodarona a un tiempo de retención de 11.5 ± 0.4 minutos. Con

el fin de obtener menores tiempos de retención y así un tiempo de análisis más corto, se varió la composición de la fase móvil, hasta encontrar una relación de acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (60:10:30 (v/v)), que redujo el tiempo de retención para amiodarona a 5.6 ± 0.5 min.

El tiempo de retención en el que se encontró la señal de amiodarona es comparable con el reportado por *Valencia et al. 2000*, quienes obtuvieron un tiempo de retención alrededor de los 5 min. El método de extracción que llevaron a cabo fue por precipitación de proteínas con acetonitrilo, obteniendo los mismos picos de ruido por el solvente que en el presente trabajo, los cuales pueden dificultar la integración del pico de amiodarona en caso de solaparse. Comparado con lo propuesto por *Rodrigues et al. 2013*, quienes utilizaron sistemas de microextracción en fase sólida, el costo del método es relativamente bajo, ya que para la extracción se emplean solventes económicos como es el caso del n-hexano.

De los 17 pacientes que participaron en el estudio, los niveles de amiodarona en un 41% de la población se encontraron en un rango subterapéutico, así mismo se detectaron niveles trazas o no detectables en un 41% y finalmente sólo el 18% de las muestras analizadas presentaban concentraciones terapéuticas. Estos porcentajes concuerdan a los reportados por *Wang et al.* en 2011, en cuyo estudio se analizó una población de 825 pacientes que utilizaron amiodarona por un período de 2 años, donde sólo el 9% de los individuos se encontraban en rangos terapéuticos. Estos autores justifican estos hallazgos al no cumplimiento o mal apego de la terapia

antiarrítmica, o a la mala absorción del fármaco; así como a la variable biodisponibilidad del mismo. En nuestro estudio, no se considera que exista un mal cumplimiento de la terapia farmacológica, debido a que los pacientes se encuentran en seguimiento continuo por medio de la programación de consultas.

De los dos grupos de estudio, no encontramos correlación significativa entre las concentraciones plasmáticas de amiodarona con el IMC. Los sujetos con un IMC $<25 \text{ kg/m}^2$ mostraron concentraciones ligeramente superiores comparados con aquellos con un IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$, sin embargo se necesitan realizar más estudios en poblaciones mayores para asegurar que esta tendencia se comporta de la misma manera. En ninguna de las muestras analizadas se encontraron niveles superiores al rango terapéutico de amiodarona, los sujetos que presentaron un IMC $>30 \text{ kg/m}^2$ no presentaron concentraciones mayores de amiodarona, sino que en dos de ellos los niveles se encontraban en trazas o no detectables. De acuerdo en lo descrito por *Cheyamol 2000*, en el caso de las moléculas altamente lipofílicas como es el caso de amiodarona, es difícil predecir su comportamiento cinético en pacientes con obesidad, por que no existe una relación entre el grado de lipofilicidad de los medicamentos y su distribución en estos pacientes los cuales a pesar de que puedan presentar un IMC igual entre ellos, su distribución corporal y su porcentaje de grasas será diferente en cada uno de los sujetos.

La cuantificación de amiodarona a partir de tejido adiposo ha demostrado que éste actúa como un reservorio donde el fármaco se encuentra ampliamente distribuido y es liberado paulatinamente, se han encontrado concentraciones de amiodarona hasta 200 veces más grandes en dicho tejido comparadas con sus concentraciones plasmáticas (*Lafuente-Lafuente 2009*). Suponemos que la concentración plasmática refleja sólo una fracción de la dosis del medicamento y que la mayoría se encuentra almacenada en tejido adiposo, esto explicaría por que en este estudio se encontraron concentraciones ligeramente superiores en el grupo de individuos con menor IMC, así como la ausencia de un nivel plasmático en dos de los pacientes con IMC mayor a 30 kg/m².

Se encontró una correlación entre los niveles plasmáticos de amiodarona y el tiempo de tratamiento de los sujetos de estudio, esto es comparable con lo reportado por *Barbieri et al. 1986*, en donde se investigó la influencia de la duración de la terapia con amiodarona en humanos, dos grupos fueron estudiados uno con uso del antiarrítmico por menos de 28 días y el otro con un tiempo superior a éste, en ambos se cuantificó el fármaco por HPLC en muestras de plasma, tejido del atrio y en grasa de pericardio, los resultados demostraron que los pacientes que presentaron mayores niveles de amiodarona fueron aquellos que tenían un manejo de más de 28 días, así mismo, se encontró que las concentraciones fueron mayores en tejido adiposo comparadas con las biopsias de atrio y el plasma sanguíneo.

Aunque no es posible medir niveles de amiodarona en grasa con un método no invasivo, esta práctica puede justificarse debido a que las concentraciones

del fármaco se espera que se encuentren mayormente distribuidas en este compartimiento y que además no se ha estudiado a fondo la relación entre las concentraciones en grasa y los efectos adversos de amiodarona, los cuales pueden llegar a ser mortales como lo es la toxicidad pulmonar, es importante realizar un monitoreo clínico de los niveles de amiodarona en tejido adiposo con especial énfasis en los tratamientos crónicos con el fin de contribuir a la caracterización de su perfil de eficacia/toxicidad.

Los efectos adversos identificados pueden estar presentes independientemente de la concentración plasmática del fármaco, así mismo se encontró que no todos los sujetos en este estudio presentaron efectos adversos relacionados al uso de amiodarona. La hepatotoxicidad fue el efecto adverso más frecuente en la población de estudio, se presentó en un 35% de los pacientes, sin embargo, ninguno de los sujetos presentó alteraciones en las transaminasas ALT y AST, las cuales se han observado como los marcadores de hepatotoxicidad inducida por amiodarona (*Vasallo, 2007*), a su vez, se encontraron niveles elevados de deshidrogenasa láctica (LDH) y Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) dentro de los grupos de estudio, estas enzimas también son utilizadas como indicadores de daño hepático. En el caso de los pacientes con elevación en los niveles de LDH, es necesario analizar la isoenzima de este conjunto enzimático que se encuentra elevada, esto con el fin de corroborar que el daño tisular se encuentra en el hígado y no en algún otro órgano.

Con respecto a los casos de toxicidad pulmonar, es difícil atribuir solamente a amiodarona como el agente causante, ya que sólo se identificaron cuadros de tos seca, así como disnea que se presentaban de manera intermitente, sólo fue posible identificar a un paciente con diagnóstico de toxicidad pulmonar secundaria a amiodarona. En los estudios realizados por *Koike et al. 2015* y *Okayasu et al. 2006*, se encontró que un IMC >27 kg/m² es un factor de riesgo para desarrollar neumonía intersticial en terapias crónica con amiodarona, el sujeto con toxicidad pulmonar identificado en este estudio presentó un IMC de 28 kg/m² y se encontraba bajo tratamiento con el antiarrítmico por más de un año. A pesar de obtener resultados similares a los ya antes mencionados, la limitante de todos los estudios ha sido el bajo número de pacientes estudiados, por lo que se recomienda realizar más investigación sobre este efecto adverso en poblaciones con obesidad, debido a que es una de las complicaciones más peligrosas que se pueden presentar por el uso de amiodarona.

Dentro de las alteraciones de la función tiroidea, el hipotiroidismo se presenta como el segundo efecto adverso más común, con una frecuencia de alrededor de un 25% de los sujetos de estudio. Los porcentajes encontrados en este estudio difieren de los reportados por *Siddoway 2013*, *Vasallo 2007* y *Bickford y Spencer 2006*, ya que se ha encontrado este efecto adverso con una frecuencia del 2 - 17%. Es importante mencionar que algunos de los pacientes se encontraban bajo tratamiento con levotiroxina, la cual es utilizada para compensar las deficiencias de hormonas tiroideas en el tratamiento de hipotiroidismo. A su vez, al revisar los expedientes de los pacientes,

encontramos que la disfunción tiroidea es una de las principales causas de modificación de la terapia antiarrítmica suspendiendo amiodarona. El hipertiroidismo tuvo una frecuencia del 10%, esto es comparable con lo reportado por *Siddoway 2013, Vasallo 2007 y Bickford y Spencer 2006*.

El monitoreo de amiodarona basado en sus concentraciones plasmáticas ha sido recomendada por diferentes autores como *Karvaly en 2013* aunque su interpretación no ha sido del todo elucidada; sin embargo en el presente trabajo, se demostró que los niveles de amiodarona en sangre no reflejan la eficacia terapéutico así como tampoco su toxicidad. Se ha recomendado un monitoreo basado en la clínica de los pacientes (*Brickford y Spencer 2006*), mediante pruebas de función de los diferentes órganos en donde se presentan los efectos adversos del fármaco. Una de las propuestas del grupo de trabajo es realizar la cuantificación de amiodarona en el tejido adiposo utilizando una biopsia de aguja para extraer una muestra de grasa, en donde se encuentra contenida aparentemente la mayor parte del fármaco, y relacionar este nivel con la presencia de sus efectos adversos. Es importante la implementación del monitoreo rutinario para los pacientes bajo tratamiento con amiodarona en los institutos de salud, protocolos de seguimiento como los reportados por *Goldshlager et al. en 2000 y Siddoway en 2003* son fáciles de aplicar en la práctica clínica. Dentro de nuestro universo de trabajo fue posible detectar que no existen protocolos de seguimiento de amiodarona, por lo que se recomendó en base a lo descrito por dichos autores utilizar una guía de monitoreo (Tabla

10) con el fin de contribuir al uso racional del medicamento y a la seguridad de las terapias.

Tabla 10. Guía para monitoreo clínico de Amiodarona

Laboratorios de Rutina en pacientes con uso de Amiodarona	
<i>Pruebas de función hepática</i>	<i>Al inicio y cada 6 meses</i>
<i>Pruebas de función tiroidea</i>	<i>Al inicio y cada 6 meses</i>
<i>Electrocardiograma</i>	<i>Al inicio y cada año</i>
<i>Evaluación oftalmológica</i>	<i>En caso de problemas visuales</i>
<i>Pruebas de función pulmonar, incluir examen de difusión pulmonar (DLCO)</i>	<i>Al inicio y en caso de sospecha de toxicidad pulmonar</i>
<i>Radiografía de pecho</i>	<i>Al inicio y en caso de sospecha de toxicidad pulmonar</i>

8. CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló un método para la cuantificación de amiodarona por HPLC en un rango de 0.5 a 25 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como fase estacionaria una columna Phenomenex Hyperclone ODS C18 (250 x 4.6 mm, 5 μm) y una fase móvil compuesta por acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5)/metanol (60:10:30 (v/v)), con un flujo de 2.0 mL/min tipo isocrático, el tiempo de retención de amiodarona fue de 5.6 ± 0.5 min.
- ❖ El método desarrollado fue validado de acuerdo a los criterios establecidos por las guías nacionales e internacionales para la validación de métodos bioanalíticos y su implementación fue posible en pacientes diagnosticados con arritmias cardíacas bajo tratamiento con amiodarona.
- ❖ Se cuantificó amiodarona a partir de las muestras de plasma de 17 pacientes bajo tratamiento crónico con amiodarona, 47% de la población tenía un IMC $< 25 \text{ kg/m}^2$ y 53% de los pacientes se encontraban con un IMC $\geq 25 \text{ kg/m}^2$, correspondiente a sobrepeso y obesidad. Solo el 18 % presentó niveles terapéuticos del fármaco, 41 % se encontraban con concentraciones subterapéuticas, así mismo se detectaron niveles trazas o no detectables en el 41 % de los sujetos de estudio.
- ❖ No se encontró una correlación entre las concentraciones plasmáticas de amiodarona con el IMC de los pacientes que participaron en el estudio.

Debido a las propiedades farmacocinéticas de amiodarona, se cree que el fármaco se puede encontrar ampliamente distribuido en tejido, principalmente tejido adiposo, por lo que la concentración plasmática refleja sólo una fracción de la dosis del medicamento. Solamente se encontró una correlación entre los niveles de amiodarona y el tiempo de tratamiento con dicho fármaco, así como con la dosis acumulada.

- ❖ Debido a la variabilidad farmacocinética que posee amiodarona es necesario realizar más estudios en poblaciones mayores para recomendar el monitoreo de sus concentraciones plasmáticas, siendo el monitoreo clínico basado en la función de los distintos órganos que se afectan por su toxicidad la opción recomendada para darle un seguimiento a su eficacia y seguridad. Así mismo, la cuantificación de concentraciones de amiodarona en tejido adiposo surge como una opción para estudiar el comportamiento cinético del medicamento en el organismo, que a pesar de ser un método invasivo supone un beneficio comparado con los efectos adversos y complicaciones de la terapia con amiodarona.
- ❖ La implementación de protocolos de monitoreo clínicos de amiodarona en los pacientes utilizando pruebas de laboratorio, es una herramienta importante que contribuye al uso racional del medicamento y ayuda a mejorar la seguridad de la terapia farmacológica.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Shammari B, Khalifa M, Bakheet SA, Yasser M; A Mechanistic Study on the Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity: Oxidative Medicine and Cellular Longevity; 2015; 1-10.
2. Alldredge BK; Koda-Kimble and Young's Applied Therapeutics: the clinical use of drugs; 10 ed. Lippincott-Williams &Wilkins; 2013.
3. Araki R, Yukawa E, Nakashima MN, Fukuchi H, Sasaki H, Yano K, Nakashima M; Population Pharmacokinetic Investigation for Optimization of Amiodarone Therapy in Japanese Patients; Therapeutic Drug Monitoring; 2011;33:750-56.
4. Aronson JK; Meyler's Side Effects of Cardiovascular Drugs; 1 ed. Elsevier; 2009:288-313.
5. Barbieri E, Conti F, Zampieri P, Trevi GP, Zaroini P, D'Aranno V, Latini R; Amiodarone and Desethylamiodarone Distribution in the Atrium and Adipose Tissue of Patients Undergoing Short- and Long-Term Treatment With Amiodarone; Journal of the American College of Cardiology;1986; 8(1):210-13.
6. Benedeck IH, Blouin A, McNamara PJ; Serum protein binding and the role of increased alpha 1-acid glycoprotein in moderately obese male subjects; British Journal of Clinical Pharmacology; 1984; 18: 941-6.
7. Bickford CL, Spencer AP; Adherence to the NASPE Guideline for Amiodarone Monitoring at a Medical University; Journal of Managed Care Pharmacy; 2006; 12(3):254-59.
8. Blouin RA, Warren GW; Pharmacokinetic Considerations in Obesity; Journal of Pharmaceutical Sciences; 1999; 1(1):1-7.
9. Brill M, Diepstraten J, van Rongen A, van Kralingen S, van den Anker J, Knibbe C; Impact of Obesity on Drug Metabolism and Elimination in Adults and Children; Clinical Pharmacokinetics; 2012; 51 (5): 277-304.

10. Brogioni S, Dell'Unto E, Cosci C, Tomisti L, Bartalena L, Martino E, Bogazzi F; International Journal of Endocrinology and Metabolism; 2006;4:52-64.
11. Calvo MV, García MJ, Martínez J, Fernández MM; Farmacocinética Clínica. Farmacia Hospitalaria Tomo I. SEFH; 2002.
12. Campbell TJ, Williams KM; Therapeutic drug monitoring: antiarrhythmic drugs; British Journal of Clinical Pharmacology; 1998; 46:307-319.
13. Casati A, Putzu M; Anesthesia in the obese patient: pharmacokinetic considerations; Journal Clinical Anesthesia; 2005; 17(2):134-45.
14. Cheymol G; Effects of Obesity on Pharmacokinetics, Implications for Drug Therapy; Clinical Pharmacokinetics; 2000; 3:215-31.
15. Cohen-Lehman J, Dahl P, Danzi S, Klein I; Effects of amiodarone therapy on thyroid function; Nature Review Endocrinology; 2010;6:34-41.
16. De Baerdemaeker LE, Mortier EP, Struys MM; Pharmacokinetics in obese patients; British Journal of Anesthesia; 2004;4(5):152-55.
17. European Medicines Agency; Guideline on bioanalytical method validation; Jul 2011: 1-23.
18. Ernawati DK, Stafford L, Hughes JD; Amiodarone-induced pulmonary toxicity; British Journal of Clinical Pharmacology; 2008; 66 (1): 82-7.
19. Erstad BL; Dosing of medications in morbidly obese patients in the intensive care unit setting; Intensive Care Medicine; 2004;30:18-32.
20. Flegal KM, Shepherd JA, Looker AC, Graubard BI, Borrund LG, Ogden CL, Harris TB, Evehart JE, Schenker N; Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults; American Journal of Clinical Nutrition; 2009;89:500-8.
21. Fox DJ, Tischenko A, Krahn AD, Skanes AC, Gula LJ, Yee RK, Klein GJ; Supraventricular Tachycardia: Diagnosis and Management; Mayo Clinic Proceedings; 2008; 83(12):1400-11.

22. Fukuchi H, Nakashima M, Araki R, Komiya N, Hayano M, Yano K, Sasak H, Yukawa E; Effect of obesity on serum amiodarone concentration in Japanese patients: population pharmacokinetic investigation by multiple trough screen analysis; *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*; 2009;34: 329–336.
23. Gaztañaga L, Marchlinski FE, Betensky BP; Mechanism of Cardiac Arrhythmias; *Revista Española de Cardiología*; 2012;65(2): 174-185.
24. Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, Olshansky B, Bramah S, Collard HR, Murphy E; A Practical Guide for Clinicians Who Treat Patients with Amiodarone: 2007; *Heart Rhythm* 2007;4:1250–1259.
25. Guerra F, Hohnloser SH, Kowey PR, Crijns HJGM, Aliot EM, Radzik D, Roy D, Connolly S, Capucci A; Efficacy and Safety of Dronedarone in Patients Previously Treated with Other Antiarrhythmic Agents; *Clinical Cardiology*; 2014;37 (12): 717-724.
26. Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, Ozkan SA; UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters; *Chromatographia*; 2013; 76: 1365-1427.
27. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M; Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Resultados Nacionales; Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
28. Haffajee CI, Love JC, Canada AT, Lesko LJ, Asdourian G, Alpert JS; Clinical pharmacokinetics and efficacy of amiodarone for refractory tachyarrhythmia's; *American Heart Association*; 1983;67:1347-1355.
29. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures Methodology, International Conference on Harmonization, 1996; http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf.
30. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Compendium of Chemical Terminology: Goldbook: 2014.

31. Josephson ME, Zimetbaum P; Sección 2: Alteracione del Ritmo Cardíaco; En. Harrison Manual de Medicina Interna Vol. I; 15 ed. McGraw Hill; 2001: 1511-40.
32. Juenke JM, Brown PI, McMillin GA, Urry FM; A Rapid Procedure for the Monitoring of Amiodarone and N-Desethylamiodarone by HPLC-UV Detection; Journal of Analytical Toxicology;2004; 28:63-6.
33. Kang JS, Lee MH; Overview of Therapeutic Drug Monitoring; Korean Journal of Internal Medicine; 2009; 24:1-10.
34. Karvaly G, Szanlszló J, Fűrész J; Chromatographic Methods for the Therapeutic Monitoring of Amiodarone and Its Active Metabolite N-desethylamiodarone; Separation Science;2013 ;5(7): 7-12.
35. Kneeman JM, Misdraji J, Corey KE; Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease; Therapeutic Advances in Gastroenterology; 2012;5(3): 199-207.
36. Koike H, Fujino T, Koike M, Shinohara M, Kitahara K, Kinoshita T, Yuzawa H, Suzuki T, Sato H, Fukunaga S, Kobayashi K, Ikeda T; Obesity Is Associated With the Development of Interstitial Pneumonia Under Long-Term Administration of Amiodarone in Refractory Atrial Fibrillation Patients; International Heart Journal; 2016; 57(1):30-4.
37. Kupiec T; Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography; International Journal of Pharmaceutical Compounding; 2004; 8(3):223-27.
38. Lafuente-Lafuente C, Alvarez JC, Leenhardt A, Mouly S, Extramiana F, Caulin C, Funck-Bretano C, Bergmann JF. Amiodarone concentrations in plasma and fat tissue during chronic treatment and related toxicity. British Journal of Clinical Pharmacology. 2009; 67(5): 511-519.
39. 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.

40. Okayasu K, Takeda Y, Kojima J, Yoshizawa A, Kobayashi N, Sugiyama H, Kudo K; Amiodarone pulmonary toxicity: a patient with three recurrences of pulmonary toxicity and consideration of the probable risk for relapse; *Internal Medicine Journal*; 2006;45(22):1303-7.
41. Pereira VA, Carvalho MJ, Kobayashi CE, Costa JO, Cavani SR; Obesity influences propranolol pharmacokinetics in patients undergoing coronary artery bypass grafting employing cardiopulmonary bypass; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2003;39(4):409-14.
42. Piccini JP, Hasselblad V, Peterson ED, Washam JB, Califf RM, Kong DF; Comparative Efficacy of Dronedarone and Amiodarone for the Maintenance of Sinus Rhythm in Patients With Atrial Fibrillation; *Journal of the American College of Cardiology*; 2009;54(12):1089–95.
43. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R; Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography B.*; 2003;785:263–275.
44. Prabu SL, Suriyaprakash TNK; Chapter 21: Extraction of Drug from the Biological Matrix: A Review, En: *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*; 1 ed. InTech; 2012, p. 479-506.
45. Razavi M; Safe and Effective Pharmacologic Management of Arrhythmias; *Texas Heart Institute Journal*; 2005; 32(2): 209-11.
46. Rizzo LF, Bruno OD; Amiodarona y Disfunción Tiroidea; *Medicina*; 2011; 71(1):64-74.
47. Roden DM; Antiarrhythmic drugs: from mechanism to clinical practice; *Heart*; 200; 84:339-346.
48. Rodrigues M, Alves G, Rocha M, Queiroz J, Falcao A; First liquid chromatographic method for the simultaneous determination of amiodarone and desethylamiodarone in human plasma using microextraction by packed sorbent (MEPS) as sample preparation procedure; *Journal of Chromatography B*; 2013; 913:90-97.

49. Rosales YR; Antropometría en el diagnóstico de pacientes obesos: una revisión; *Nutrición Hospitalaria*; 2012;27(6):1803-09.
50. Salem JE, El-Aissaoui M, Alazard M; Modeling of Amiodarone Effect on Heart Rate Control in Critically Ill Patients with Atrial Tachyarrhythmias. *Clinical Pharmacokinetics*. 2016 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26946135>
51. Shafaati A, Clark BJ; Evaluation of Acetonitrile Deproteinisation of the Serum Samples of the Analysis of Drugs in Serum Using Capillary Zone Electrophoresis; *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*; 2002;1:43-46.
52. Schellinger AP, Carr PW; Solubility of Buffers Aqueous-Organic Eluents for Reversed-Phase Liquid Chromatography; *LCGC North America*; 2004;22(6):545-48.
53. Siddoway LA; Amiodarone: Guidelines for Use and Monitoring; *American Family Physician*; 2003; 68:2189-96.
54. Spence MM, Polzin JK, Weisberger CL, Martin JP, Rho JP, Willick GH; Evaluation of a pharmacist-managed amiodarone monitoring program; *Journal of managed care pharmacy*; 2011;17(7):513–22.
55. Texasheart.org [actualizado Oct 2015; citado 10 Dic 2015]. Disponible en: <http://www.cancerheart.org/>.
56. Trevor AJ, Katzung BG, Hall MK, Masters SB; Chapter 14: Antiarrhythmic Drugs, En: *Katzung and Trevor's Pharmacology Examination and Board Review*, 10 ed, McGraw Hill; 2012, p. 131-142
57. Valencia M, Zapata V, Bider A, Pérez M, Lamanna V; Cuantificación de Amiodarona en Suero Mediante Precipitación de Proteínas Seguida de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Ultravioleta; *Acta Científica Venezolana*; 2000;51:53-60.
58. Vassallo P, Trohman RG; Prescribing amiodarone: an evidence-based review of clinical indications; *Journal of the American Medical Association*. 2007 Sep 19; 298 (11):1312-22.

59. Vidal I, Antes A; Depósitos corneales secundarios al tratamiento crónico con amiodarona: frecuencia, relación con la dosis; los días de suspensión y la duración del tratamiento; Revista Uruguaya de Cardiología; 2009; 24:101-104.
60. Wal P, Krumar B, Bhandari A, Rai AK, Wal A; Bioanalytical Method Development- Determination of Drugs in Biological Fluids; Journal of Pharmaceutical Science and Technology; 2010;2(10): 333-347.
61. Wolkove N, Baltzan M: Amiodarone pulmonary toxicity; Canadian Respiratory Journal; 2009;16(2):43-48.
62. World Health Organization Medicines: safety of medicines – adverse drug reactions. [actualizado 2008, citado el 26 jul 2014] Disponible en http://www.wiredhealthresources.net/resources/NA/WHOFSA_MedicinesSafetyAdverseReactions.pdf.
63. Yeo TJ, Teo SG, Soo WM, Poh KK; Variations of atrioventricular block; Singapore Medical Journal; 2011; 52(5): 330-34.

ANEXOS

ANEXO B. FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN	
Nombre del estudio:	Relación del índice de masa corporal sobre la incidencia de los efectos secundarios en pacientes bajo tratamiento con amiodarona.
Lugar y fecha:	UMAЕ Hospital de Cardiología No. 34, Departamento de Cardiología.
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Estudiar como el índice de masa corporal se relaciona con la presencia de efectos secundarios de amiodarona.
Procedimientos:	Se realizará una entrevista con el participante de aproximadamente 15 minutos y se tomarán medidas de peso y estatura.
Posibles riesgos y molestias:	Ninguno.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Conocer la cantidad de fármaco presente en el cuerpo y se podrá identificar si el participante presenta algún efecto secundario de amiodarona.
Participación o retiro:	Puede retirarse del proyecto en cualquier momento en que lo desee sin ninguna consecuencia. En caso de que las preguntas durante la entrevista le parezcan incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.
Privacidad y confidencialidad:	Toda la información recolectada será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.
Beneficios al término del estudio:	Conocer la cantidad de fármaco presente en el cuerpo, con lo cual se podrá mejor el tratamiento y/o disminuir aparición de efectos secundarios
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	Dr. Arturo Muñiz García
Colaboradores:	Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado, QFB Jorge Armando Yañez González
En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision_etica@imss.gob.mx	
Nombre y firma del sujeto	Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento
Testigo 1	Testigo 2
Nombre, dirección, relación y firma	Nombre, dirección, relación y firma
Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio	