



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS POR HPLC PARA LA  
CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN SANGRE Y PLASMA EN  
PACIENTES PEDIÁTRICOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA EN EL INSTITUTO NACIONAL DE  
PEDIATRIA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

DIEGO BARRERA GUZMÁN



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Helgi Helen Jung Cook. \_\_\_\_\_

**VOCAL:** M en F. Ricardo Rodríguez Sáenz. \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:** Dr. Juan Luis Chávez Pacheco. \_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE:** M. en F. Ernestina Hernández García. \_\_\_\_\_

**2° SUPLENTE:** M.en C. Kenneth Rubio Carrasco. \_\_\_\_\_

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Laboratorio de Farmacología, Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación  
"Joaquín Cravioto".

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Luis Chávez Pacheco

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
Diego Barrera Guzmán.

# Contenido

---

1. Generalidades.....	8
1.1 Epidemiología en México y el mundo.....	10
1.2 Factores de riesgo.....	13
1.3 Manifestaciones Clínicas.....	13
1.4 Diagnóstico.....	14
• 1.4.1 Examen físico y antecedentes:.....	14
• 1.4.2 Recuento sanguíneo completo (RSC):.....	14
• 1.4.3 Química Sanguínea:.....	15
• 1.4.4 Punción lumbar:.....	15
• 1.4.5 Biopsia testicular:.....	16
1.5 Tratamiento de la LLA.....	16
1.5.1 LLA de muy bajo riesgo.....	17
1.5.2 LLA de riesgo habitual.....	17
1.5.3 LLA de alto riesgo.....	17
1.5.4 LLA de muy alto riesgo.....	18
1.6 ÁCIDO FÓLICO.....	19
1.7 METOTREXATO.....	20
1.7.1 Propiedades Físico-químicas del MTX.....	20
1.7.2 Farmacocinética.....	21
1.7.3 Mecanismo de acción.....	22
1.7.4 Efectos adversos.....	23
1.7.5 Importancia del MTX y validación de un método analítico para su cuantificación en sangre y plasma.....	23
1.8 Métodos analíticos para la cuantificación de MTX en sangre y plasma.....	24
1.9 Cromatografía de líquidos (HPLC).....	25
1.9.1 Instrumentación HPLC.....	27
1.10 Validación de métodos analíticos.....	28
1.10.1 Propósitos de la validación de un método analítico.....	28
1.10.2 Tipos de métodos analíticos.....	28

1.10.3 Métodos que deben validarse.....	29
1.10.4 Parámetros de desempeño del método analítico.....	29
1.10.5 Definiciones de los parámetros de desempeño <sup>15</sup> .....	29
1.11 Parámetros para validar un método analítico acorde a la NOM-177-SSA1-2013.....	31
1.12 Objetivos .....	32
1.13 Justificación .....	33
2. parte experimental. ....	34
2.1 Materiales. ....	34
2.2 Equipos e instrumentos.....	35
2.3 Reactivos y sustancias de referencia.....	36
2.3.1 Reactivos. ....	36
2.3.2 Sustancias de Referencia.....	36
2.4 Sustancia de referencia MTX.....	36
2.5 Material Biológico. ....	37
3. Validación del método analítico. ....	37
3.1 Condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificación de MTX en sangre y plasma ..	37
3.2 Cuantificación de metotrexato en sangre y plasma.....	38
3.3 Preparación de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio monohidratado 0.05M pH=4.85.....	38
3.4 Preparación de la solución de SDS (docecil sulfato de sodio) 0.15M para lisar los eritrocitos en muestras de sangre. ....	38
3.5 Preparación de las diluciones de MTX para la curva de calibración y concentraciones de la curva de calibración. ....	39
3.6 Técnica de extracción de MTX en muestras de sangre y plasma.....	40
4. Resultados de la validación.....	42
4.1 Selectividad en sangre y plasma. ....	42
4.2 Linealidad (curva de calibración).....	44
4.2.1 Prueba de linealidad patrón primario de MTX para sangre.....	44
4.2.3 Prueba de linealidad de patrón primario de MTX en plasma. ....	45
4.2.4 Recuperación al aplicar el arreglo lineal en sangre y plasma. ....	46
4.2.5 Prueba significancia estadística linealidad en sangre. ....	47
4.2.6 Prueba significancia estadística linealidad en plasma. ....	48

4.3	Precisión en sangre y plasma (Medida como repetibilidad y reproducibilidad).....	51
4.3.1	Datos Repetibilidad en sangre y plasma. ....	52
4.3.2	Reproducibilidad en sangre y plasma .....	53
4.4	Exactitud en sangre y plasma.....	55
4.4.1	Datos de repetibilidad y % de desviación en sangre.....	56
4.4.2	Datos de repetibilidad y % de desviación en plasma .....	57
4.5	Recobro en sangre y plasma. ....	60
4.5.1	Recobro en sangre y plasma. ....	61
4.6	Estabilidad de las muestras.....	62
4.6.1	Estabilidad de las muestras de sangre. ....	64
4.6.2	Estabilidad de las muestras de plasma, resultados de las muestras de plasma preparadas el día de cada prueba. ....	68
4.7	Límite de cuantificación. ....	72
5.	Análisis de resultados. ....	73
6.	Conclusiones. ....	77
7.	Perspectivas. ....	78
8.	Referencias.....	79
9.	ANEXO I .....	81
10.	ANEXO II .....	82
11.	ANEXO III .....	83

## ABREVIATURAS

Cuando en esta tesis se haga referencia a las siguientes abreviaturas, se entenderá:

±	Más menos.
%	Por ciento.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento.
C <sub>máx</sub>	Concentración plasmática máxima.
C.V.	Coefficiente de variación.
CV%	Por ciento de coeficiente de variación.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
g	Gramos.
h	Horas.
mL	Mililitros.
µg	Microgramos.
mg	Miligramos.
ng	Nano gramos.
nM	Nano molar.
µM	Micro molar.
M	Molar.
R	Coefficiente de regresión.
r	Coefficiente de variación.
s	Segundos.
T 1/2	Vida media de eliminación.
T <sub>max</sub>	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
UV-VIS	Ultravioleta-visible.
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda.
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda.
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica.
LMC	Leucemia Mielocítica Crónica.
LT.	Lote.
SNC	Sistema Nervioso Central.
INP	Instituto Nacional de Pediatría.
NF1	Neurofibromatosis tipo 1.
AAS	Ácido acetil salicílico.
RSC	Recuento Sanguíneo Completo.
FISH	Hibridación fluorescente in situ.
PL	Punción Lumbar.
CENETEC	Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud.
TTI	Terapia intratecal.
MTX	Metotrexato.
6-MP	6-Mercaptopurina.
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado.
IV	Administración Intravenosa.
HC	Hidrocortisona.
UI	Unidades Internacionales.
IM	Administración intramuscular.
FH4	Tetrahydrofolato.
PO	Administración oral.
SC	Administración Subcutánea.
L	Litros.
µL	Micro litros.

Kg	Kilogramos.
FBP	Proteína unidora de folatos asociada a membrana.
DHDR	Enzima dihidrofolato reductasa.
TS	Enzima timidilato sintetasa
AICAR	5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
pH	Potencial de hidrógeno.
D.I.	Diámetro interno.
mm	Milímetros.
cm	Centímetros.
µm	Micrómetros.
nm	Nanómetros.
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido.
°C	Grados Celsius.
USP	Farmacopea de los Estados Unidos.
v/v	Volumen/volumen.
Min.	Minutos.
rpm	Revoluciones por minuto.
SSI	Solución salina isotónica.
SD	Desviación estándar.
H0	Hipótesis nula.
H1	Hipótesis alternativa.
LIC	Límite inferior de cuantificación.
MCB	Muestra control bajo.
MCM	Muestra control medio.
MCA	Muestra control alto.
IC	Intervalo de confianza.
VS	Contra.



## 1. Generalidades.

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético. Son enfermedades neoplásicas que se deben a mutaciones somáticas de la célula progenitora. Según su estirpe celular afectado, ya sea la línea mieloide o la linfoide, su evolución varía desde las que conducen rápidamente a la muerte hasta las que evolucionan con lentitud.<sup>1</sup>

Esta neoplasia lleva a un aumento incontrolable en el número de glóbulos blancos. Las células cancerosas impiden que se produzcan glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos (leucocitos) saludables.

Las leucemias de crecimiento rápido son llamadas leucemias agudas, y las de crecimiento lento son llamadas leucemias crónicas.

La mayoría son tumores de células progenitoras pre-B aunque ocasionalmente se manifiestan Leucemias linfoblásticas agudas (LLA) de células pre-T. La LLA ocurre con gran frecuencia en la primera década de vida.<sup>2</sup>

La LLA es el tipo de cáncer más común en los niños.

En un niño sano, la médula ósea elabora células madre sanguíneas (células inmaduras) que, con el tiempo, se vuelven células sanguíneas maduras. Una célula madre sanguínea se puede volver una célula madre mieloide o una célula madre linfoide.

Una célula madre mieloide se transforma en uno de tres tipos de células sanguíneas maduras:

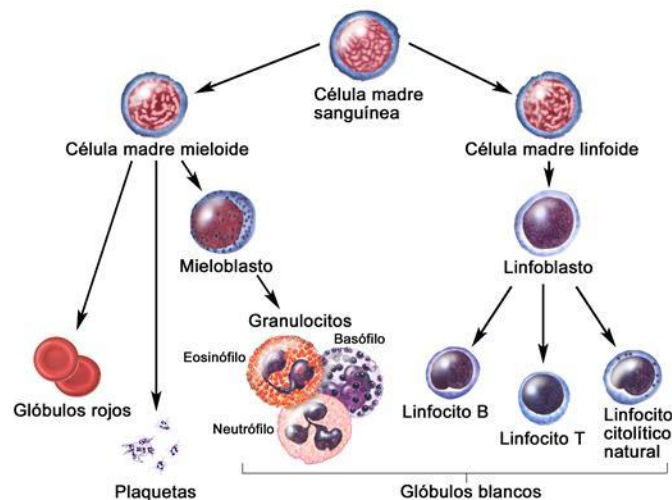
- Glóbulos rojos; que transportan oxígeno y sustancias a todos los tejidos del cuerpo.
- Plaquetas; que forman coágulos de sangre para interrumpir el sangrado.
- Granulocitos; que combaten las infecciones y las enfermedades.

Una célula madre linfoide se transforma en un linfoblasto y luego, en uno de tres tipos de linfocitos (glóbulos blancos):

- Linfocitos B; que producen anticuerpos para ayudar a combatir las infecciones.
- Linfocitos T; que ayudan a los linfocitos B a producir los anticuerpos para combatir las infecciones.
- Linfocitos citolíticos naturales; que atacan las células cancerosas o infectadas por virus.

En un niño con LLA, hay demasiadas células madre que se transforman en linfoblastos, linfocitos B o linfocitos T. Estas células son cancerosas (células de leucemia). Las células leucémicas no funcionan como los linfocitos normales y no pueden combatir adecuadamente las infecciones. Además, en la medida que aumenta la cantidad de células de leucemia en la sangre y la médula ósea, hay menos lugar para los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas sanas. Esto puede producir infecciones, anemia y sangrados fáciles.<sup>1</sup>

**Figura 1.** Evolución de una célula madre sanguínea



Los cuatro tipos principales de leucemia son<sup>3</sup>:

1. Linfocítica aguda (LLA).
2. Mielocítica aguda (LMA).
3. Linfocítica crónica (LLC).
4. Mielocítica crónica (LMC).

La proliferación desordenada de blastos en la médula ósea puede extender la presencia de blastos en la sangre, los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, el SNC, los testículos u otros órganos.

### **1.1 Epidemiología en México y el mundo.**

Cada año aparecen en los países occidentales entre 60 y 100 nuevos casos de leucemia por cada millón de habitantes.

La leucemia linfoblástica aguda es la neoplasia más común en niños, y constituye el 25% de todos los cánceres en la edad pediátrica y aproximadamente el 75% de todos los casos de leucemia en la infancia.

La leucemia linfocítica aguda es más común en la infancia temprana, y alcanza su mayor incidencia entre las edades de 2 a 3 años (> 80 por millón por año), con tasas que disminuyen a 20 por millón entre niños de 8 a 10 años de edad.

La relación de casos de leucemias agudas en nuestro medio, entre linfocíticas y no linfocíticas es de 6:1 en favor de las agudas.

En México el número general de egresos hospitalarios por leucemia para el año 2001 fue de 13.558 personas con una tasa de 13,4 por 100.000 habitantes. Las defunciones registradas en México para el año 2001 en el grupo de edad de 1 a 4 años ocurrieron 232 muertes para una tasa de 2.69 por 100.000 habitantes, para el grupo de 5 a 14 años el número de muertes por leucemias fue de 588 para una tasa de 2.60 por 100.000 habitantes. (SSA, Estados Unidos Mexicanos, Sistema Nacional de Salud. 2001)

**Tabla 1.** Principales causas de egresos hospitalarios, 2001. Estados Unidos Mexicanos, Sistema Nacional de salud.

Núm. de orden	Causas	Criterio de Agrupación	Egresos	Tasa	%
	<b>Total</b>	<b>000</b>	<b>4,127,060</b>	<b>4,086.3</b>	<b>100.0</b>
1	Causas obstétricas directas (excepto aborto)	160	739,297	732.0	17.9
2	Parto único espontáneo	161	514,994	509.9	12.5
3	Traumatismos, envenenamientos y algunas otras consecuencias de causas externas	166	306,703	303.7	7.4
	- Fracturas	166A	138,006	136.6	3.3
4	Ciertas afecciones originadas en el período perinatal	163	183,644	181.8	4.5
	- Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el período perinatal	163I	40,670	40.3	1.0
	- Crecimiento fetal lento, desnutrición fetal y trastornos relacionados con la gestación corta y el bajo peso al nacer	163C	29,512	29.2	0.7
5	Enfermedades del corazón	097	129,326	128.0	3.1
	- Enfermedades isquémicas del corazón	097C	49,381	48.9	1.2
6	Tumores malignos	049	127,687	126.4	3.1
	- Leucemias	0494	13,558	13.4	0.3
	- Tumor maligno de la mama	049M	12,886	12.8	0.3
	- Tumor maligno del cuello del útero	049O	12,367	12.2	0.3

**Tabla 2.** Principales causas de mortalidad en edad preescolar (de 1 a 4 años), 2001. Estados Unidos Mexicanos, Sistema Nacional de Salud.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa 1/	%
	A00-Y98	Total	6,606	76.57	100.0
1	A00-A09	Enfermedades infecciosas intestinales	640	7.42	9.7
2	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	575	6.67	8.7
3	2/	Accidentes de tráfico de vehículo de motor	436	5.05	6.6
4	Q20-Q24	Malformaciones congénitas del corazón	398	4.61	6.0
5	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	372	4.31	5.6
6	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	312	3.62	4.7
7	C91-C95	Leucemia	232	2.69	3.5
8	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	120	1.39	1.8
9	G40-G41	Epilepsia	101	1.17	1.5

En el Instituto Nacional de Pediatría las neoplasias obtuvieron el 1er lugar en egresos hospitalarios con 1,409 y 1,486 eventos en 2008 y 2009, respectivamente; y obtuvo el 2º lugar en mortalidad con 56 y 52 defunciones en los mismos años. Además, el costo económico del tratamiento es elevado, las atenciones en conjunto con las pruebas especiales y la quimioterapia representan el 27% del presupuesto total asignado al área asistencial del INP y el 33% de toda la atención a la salud (costo mensual por paciente aproximado a \$9,000.00).

## **1.2 Factores de riesgo.**

Se desconocen las causas de la leucemia linfoblástica aguda. Sin embargo, existen ciertos factores de riesgo que pueden aumentar las posibilidades de que un niño contraiga esta enfermedad.<sup>3</sup>

Los posibles factores de riesgo de la LLA son los siguientes:

- Exposición a rayos X antes del nacimiento.
- Exposición a radiación.
- Tratamientos previos con quimioterapias.
- Mutaciones.
- Afecciones genéticas como:
  1. Síndrome de Down.
  2. Neurofibromatosis tipo 1 (NF1).

## **1.3 Manifestaciones Clínicas.**

Las manifestaciones clínicas de la leucemia dependen del grado de insuficiencia de la médula ósea debido a la proliferación de blastos, para producir los glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas de manera normal, por otro lado la sintomatología depende también de las repercusiones por la infiltración de éstas a otros órganos.<sup>3</sup>

Las manifestaciones clínicas que generalmente se presentan son:

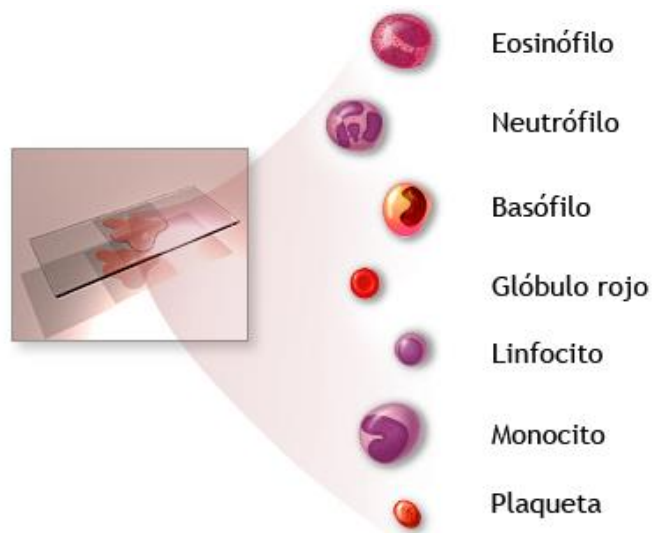
- ✓ Fatiga.
- ✓ Disnea
- ✓ Dolores musculares.
- ✓ Dolor óseo.
- ✓ Anorexia.
- ✓ Fiebre asociada a alguna infección.

## 1.4 Diagnóstico.

Para detectar y diagnosticar la LLA infantil, se utilizan pruebas que examinan la sangre y médula ósea.

Se pueden utilizar las siguientes pruebas y procedimientos para diagnosticar la LLA infantil y determinar si las células leucémicas se diseminaron a otras partes del cuerpo, como el cerebro o los testículos:

- **1.4.1 Examen físico y antecedentes:** examen del cuerpo para verificar los signos generales de salud, como la revisión de signos de enfermedad, masas o cualquier otra cosa que parezca anormal. Se toman también los antecedentes médicos de las enfermedades y los tratamientos previos del paciente.
  
- **1.4.2 Recuento sanguíneo completo (RSC):** procedimiento mediante el cual se toma una muestra de sangre y se analiza lo siguiente:
  - ✓ La cantidad de glóbulos rojos y plaquetas.
  - ✓ La cantidad y el tipo de glóbulos blancos.
  - ✓ La cantidad de hemoglobina en los glóbulos rojos.



**Figura 2.** Recuento sanguíneo completo.

- **1.4.3 Química Sanguínea:** procedimiento en el cual se examina una muestra de sangre para medir las cantidades de ciertas sustancias que los órganos y tejidos del cuerpo liberan en la sangre. Una cantidad anormal (mayor o menor que la normal) de una sustancia puede ser signo de enfermedad en el órgano o el tejido que la elabora.
- **1.4.4 Punción lumbar:** procedimiento que se usa para extraer una muestra de líquido cefalorraquídeo de la médula espinal. Esto se realiza al introducir una aguja en la columna vertebral. La muestra de líquido se examina para identificar células leucémicas. Este procedimiento también se llama punción espinal, Este procedimiento se realiza después del diagnóstico de leucemia a fin de determinar si las células leucémicas se diseminaron al cerebro y la médula espinal.



- **1.4.5 Biopsia testicular:** extracción de células o tejidos de los testículos para que un patólogo los observe al microscopio y verifique si hay signos de cáncer. Este procedimiento se realiza solo si parece haber algo inusual en los testículos durante el examen físico.

## 1.5 Tratamiento de la LLA.

En México el CENETEC emite guías de práctica clínica de diferentes enfermedades que afectan a la población mexicana, entre ellas la LLA, las cuales son empleadas en el sector salud mexicano en el cual se incluye el Instituto Nacional de Pediatría.

De acuerdo a los “Protocolos técnicos cáncer en niños”<sup>10</sup>, la LLA puede tratarse con diferentes esquemas de acuerdo al grado de riesgo (Cuadro 1). Cada esquema de tratamiento comprende al menos cuatro segmentos durante el tratamiento:

- Inducción.
- Consolidación.
- Mantenimiento de la quimioterapia.
- Fase final de cese electivo de la quimioterapia.

Bajo Riesgo	Riesgo habitual	Alto riesgo	Muy alto riesgo
Vincristina	Vincristina	Vincristina	Vincristina
L-asparaginasa	L-asparaginasa	L-asparaginasa	L-asparaginasa
Prednisona	Prednisona	Prednisona	
<b>METOTREXATO</b>	<b>METOTREXATO</b>	<b>METOTREXATO</b>	<b>METOTREXATO</b>
6-Mercaptopurina	6-Mercaptopurina	6-Mercaptopurina	6-Mercaptopurina
Hidrocortisona	Hidrocortisona	Hidrocortisona	Hidrocortisona
Ara-C	Ara-C	Ara-C	Ara-C
Dexametasona	Dexametasona	Dexametasona	Dexametasona
Leucovorin	Leucovorin	Leucovorin	Leucovorin
	Ciclofosfamida	Ciclofosfamida	Ciclofosfamida
	Doxorrubicina	Doxorrubicina	
	Daunorrubicina		Daunorrubicina
		Etopósido	Etopósido
			6-Tioguanina

**Cuadro 1,** Esquema de Tratamiento de la LLA acorde al grado de riesgo.

**Los esquemas de tratamiento de acuerdo al tipo de riesgo se describen a continuación:**

**1.5.1 LLA de muy bajo riesgo.** Fase de inducción. Busca la reducción de 2 a 3 log de la carga leucémica, inicia con ventana de esteroide (prednisona) de 1 semana, seguido de la administración de vincristina y asparaginasa combinada con prednisona. El tratamiento incluye terapia intratecal (TTI) con MTX, hidrocortisona y citarabina a una dosis por semana. En la fase de consolidación se adicionan altas dosis de MTX ( $2\text{g}/\text{m}^2\text{sc}$ ) para atacar sitios santuarios (SNC y testículos) en cuatro administraciones (1 por semana). En la fase de mantenimiento el objetivo es erradicar la enfermedad mínima residual persistente a la inducción y consolidación, se administra 6-mercaptopurina (6-MP) y MTX así como vincristina y dexametasona hasta por 120 semanas. De acuerdo a los parámetros y valores clínicos de biometría hemática, aspirado de médula ósea y punción lumbar se decide el cese electivo.

**1.5.2 LLA de riesgo habitual.** Se aplica ventana de inducción con prednisona ( $60\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ) seguido de vincristina ( $2\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ), asparaginasa ( $10,000\text{UI}/\text{m}^2/\text{día}$ ) y daunorrubicina ( $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ). MTX-hidrocortisona a dosis/edad. La consolidación se inicia con vincristina ( $2\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ), ciclofosfamida ( $1\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ ), asparaginasa ( $80\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ) y 6-MP ( $50\text{mg}/\text{m}^2/\text{día}$ ). El MTX se administra a  $2\text{g}/\text{m}^2/\text{día}$ , 10% en bolo IV y lo restante en infusión continua en 24 h. Una hora después de iniciar la infusión iniciar TTI con MTX-HC-Citarabina (dosis/edad). Doce horas después de haber concluido la infusión iniciar rescate con leucovorin. Para el mantenimiento se administra vía TTI por 6 meses, 6 mercaptopurina, L-asparaginasa y doxorubicina (1 semana) y a partir del día 120 se aplica MTX oral ( $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{semana}$ ) en 2 dosis/semana y 2 tomas/día.

**1.5.3 LLA de alto riesgo.** Se divide en las mismas fases que las dos tipos anteriores, sin embargo las dosis varían de acuerdo a la estirpe celular, en células pre-B se administra MTX a  $2\text{g}/\text{m}^2$  y se incluye etopósido a la quimioterapia. Para

el caso de linaje T se considera de pronóstico desfavorable y se incrementa la dosis de MTX a  $5 \text{ g/m}^2$  así como etopósido.

**1.5.4 LLA de muy alto riesgo.** Pacientes con mala respuesta a la ventana de esteroide y/o no están en remisión completa después de inducción. Se inicia ventana de esteroides: prednisona ( $60 \text{ mg/m}^2$ ) en 3 dosis/7 días y después con dexametasona (21 días consecutivos a  $68.5 \text{ mg/m}^2/\text{día}$ ) con etapa de re-inducción de 1 semana, vincristina a  $1.5 \text{ mg/m}^2$  en bolo directo (días 8,15, 22 y 29), Ara-C a  $75 \text{ mg/m}^2/\text{día}$  en infusión IV de 30 min (del día 8 al 21), daunorrubicina a  $30 \text{ mg/m}^2$  en infusión de 1 h (días 8 y 9), L-asparaginasa a 5000 UI vía IV en 1 h (días 15, 18, 22, 25, 29 y 33), así como a 10,000 UI vía IM en 9 dosis (1 por semana), Terapia IT de MTX a 6 mg para  $<1$  año o de 8 mg para  $>1$  año los días 1 y 29, si se involucró al SNC entonces se aplica los días 1, 8, 22, 29 y hasta que se dé resultado negativo.

Ara-C en terapia IT se dosifica a 15 mg para  $\leq 1$  año o de 20 mg para  $>1$  año (día 15) y la hidrocortisona (terapia IT) a 12 mg para  $\leq 1$  año o de 15 mg para mayores y es concomitante a MTX y Ara-C. Después de la inducción se inicia Consolidación en 3 bloques: MARAM, OCTADD y VIMARAM, este último lo reciben todos los pacientes.

El MTX y la 6-mercaptopurina son fármacos de amplio uso en la quimioterapia y con predominancia en el éxito terapéutico de ésta. El MTX es un fármaco clave en la fase de consolidación (cuadro 1), administrándose en dosis dependientes del tipo de riesgo. Así mismo, este medicamento es de uso frecuente en la etapa de mantenimiento:

### Tipo de riesgo Dosis Administración

Tipo de riesgo	Dosis	Administración.
Muy bajo	2g/m <sup>2</sup>	4 sesiones (1 por semana)
Riesgo habitual	2g/m <sup>2</sup>	3 sesiones (días 36, 68, 94)
Alto riesgo (pre-B)	2g/m <sup>2</sup>	2 sesiones (días 47, 54)
Alto riesgo (pre-T)	5g/m <sup>2</sup>	4 sesiones (días 8, 22, 36 y 50)
Muy alto riesgo	5g/m <sup>2</sup>	4 sesiones (días 1 y 8 del curso MARAM y del VIMARAM)

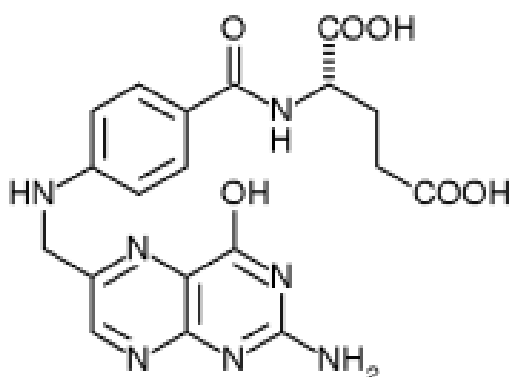
**Cuadro 2.** Dosis administrada de metotrexato según el tipo de riesgo de LLA.

## 1.6 ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico también conocido como vitamina B9<sup>16</sup>, es una vitamina hidrosoluble del complejo de vitaminas B.

La forma coenzimática es el ácido tetrahidrofólico (FH<sub>4</sub>), que actúa como transportador intermediario de fragmentos de un átomo de carbono, grupos tales como: formilo o metilo<sup>17</sup>, importante para la síntesis de ADN.

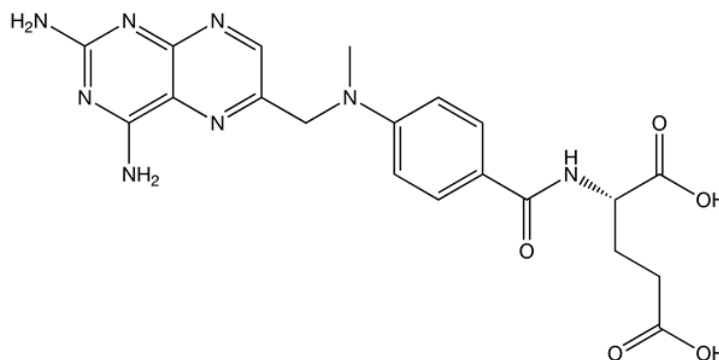
Los folatos activos metabólicamente son llamados poliglutamatos.



**Figura 4.** Estructura del ácido (2S)-2-[(4-[[[(2-amino-4-hydroxypteridin-6-yl)methyl]amino]phenyl]formamido]pentanedioico

## 1.7 METOTREXATO.

Este conocido inmunosupresor fue inicialmente utilizado sólo como antineoplásico, fue introducido en 1948 por *Farber et al*<sup>16</sup>, para el tratamiento de la leucemia aguda. Desde entonces ha sido usado en dosis bajas en el manejo de psoriasis, y varias enfermedades reumáticas.



**Imagen 5.** Ácido (2S)-2-[(4-[[[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil](metil)amino]benzoil)amino]pentanodioico.

### 1.7.1 Propiedades Físico-químicas del MTX

- Análogo de folatos.
- Administración: PO, IM, IV, SC, Intratecal.
- Utilizado en el tratamiento de Cáncer (Leucemia), Psoriasis, Enfermedades autoinmunes (reumatismo).

## **1.7.2 Farmacocinética.**

### **1.7.2.1 Absorción.**

En pacientes pediátricos con leucemia, la absorción oral de MTX parece ser dependiente de la dosis y se ha informado que varía ampliamente desde 23% hasta 60%, con una  $C_{máx}$  de 0.05-1045.2  $\mu\text{g/mL}$ , después de una administración oral de  $20\text{mg/m}^2$ .

Existe también una amplia variabilidad en el tiempo en el que se presenta la concentración máxima ( $T_{máx}$ ), que va desde las 0.67 hasta las 4 horas después de la administración.

Ha sido demostrado que la comida retarda la absorción y reduce la concentración máxima.

El MTX generalmente se absorbe completamente en vías parenterales. Después de una inyección IM, las concentraciones séricas máximas se producen de 30 a 60 minutos.

### **1.7.2.2 Distribución.**

Después de la administración intravenosa, el volumen inicial de distribución es de 0.18 L/Kg (18% del peso corporal), y el volumen de distribución en estado estacionario es aproximadamente 0.4 a 0.8 L/Kg (40 a 80% del peso corporal).

El MTX tiene una unión a albúmina de 35 a 50%.

### **1.7.2.3 Metabolismo.**

Después de la absorción el MTX sufre un bajo metabolismo hepático (hidroxilación por la aldehído oxidasa, produciendo 7-hidroxiemetotrexato<sup>20</sup>) e intracelular (principal) a poliglutamatos los cuales pueden convertirse de nuevo a MTX por enzimas hidrolasas.

Pequeñas cantidades de poliglutamatos de MTX pueden permanecer en tejidos durante periodos prolongados.

La vida media ( $t_{1/2}$ ) del MTX es entre 8 y 15 horas a las dosis usadas en la terapia antineoplásica.

#### **1.7.2.4 Excreción.**

La excreción renal es la principal vía de eliminación, cerca del 80% al 90% de la dosis administrada se excreta inalterada en la orina dentro de las 24 horas.

#### **1.7.3 Mecanismo de acción.**

El transporte del folato y fármacos estructuralmente análogos a éste, como el MTX, ocurre por dos mecanismos diferentes; ambos implican un transporte activo a través de la membrana celular. El mecanismo más relevante está asociado a una proteína unidora de folato asociada a la membrana (FBP), la cual posee alta afinidad por los folatos y sus derivados. Se expresa en múltiples líneas celulares y su concentración se incrementa cuando las células están adaptadas a bajas concentraciones de folato.<sup>11</sup>

Cuando existen altas concentraciones, el MTX difunde de manera pasiva. La difusión pasiva es la más importante en las células mutagénicas, dado que éstas no expresan el transportador de alta afinidad.<sup>11</sup>

Una vez en el espacio intracelular, el MTX es convertido a poliglutamatos,<sup>11,13</sup> los cuales son metabolitos de larga vida media.

El mayor blanco del MTX es la enzima dihidrofolato reductasa (DHDR), la cual es inhibida por la acción de los poliglutamatos, los que también poseen actividad inhibitoria sobre otras enzimas folato-dependientes, como la timidilato sintetasa (TS), 5-amino-imidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (AICAR), entre otras.<sup>11</sup> Por lo tanto, el MTX interfiere en con la síntesis del ADN, así como la reparación y la replicación celular.<sup>14</sup>

#### **1.7.4 Efectos adversos.**

Los que se presentan con mayor frecuencia son las úlceras orales, náuseas, vómitos y diarrea, que pueden estar acompañadas de cefalea y somnolencia. En ocasiones se observa una elevación de las enzimas hepáticas, por lo que se aconseja su monitorización. Con menor frecuencia se describen mielosupresión, neumonitis por hipersensibilidad, fibrosis y cirrosis hepática.

Se observa una menor frecuencia de efectos adversos al adicionar ácido fólico o polínico, sin una disminución en la eficacia clínica.<sup>11, 14</sup>

#### **1.7.5 Importancia del MTX y validación de un método analítico para su cuantificación en sangre y plasma.**

Dada la importancia del MTX en el tratamiento de la LLA infantil en el INP así como su amplia variabilidad farmacocinética, se buscó implementar y validar un método analítico para su cuantificación y con ello evitar la citotoxicidad del fármaco esto en base a los «protocolos técnicos cáncer en niños», el cual indica que el remanente de MTX a las 24 horas posteriores a su administración debe ser inferior a 1.0 $\mu$ M (0.454  $\mu$ g/mL).

Cabe señalar que existen diferentes métodos analíticos que permiten cuantificar MTX, sin embargo, el más empleado por su costo y eficiencia es la cromatografía de líquidos de alta resolución. En el cuadro 3 se presentan los métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de MTX, encontrados durante la revisión bibliográfica.



## 1.8 Métodos analíticos para la cuantificación de MTX en sangre y plasma.

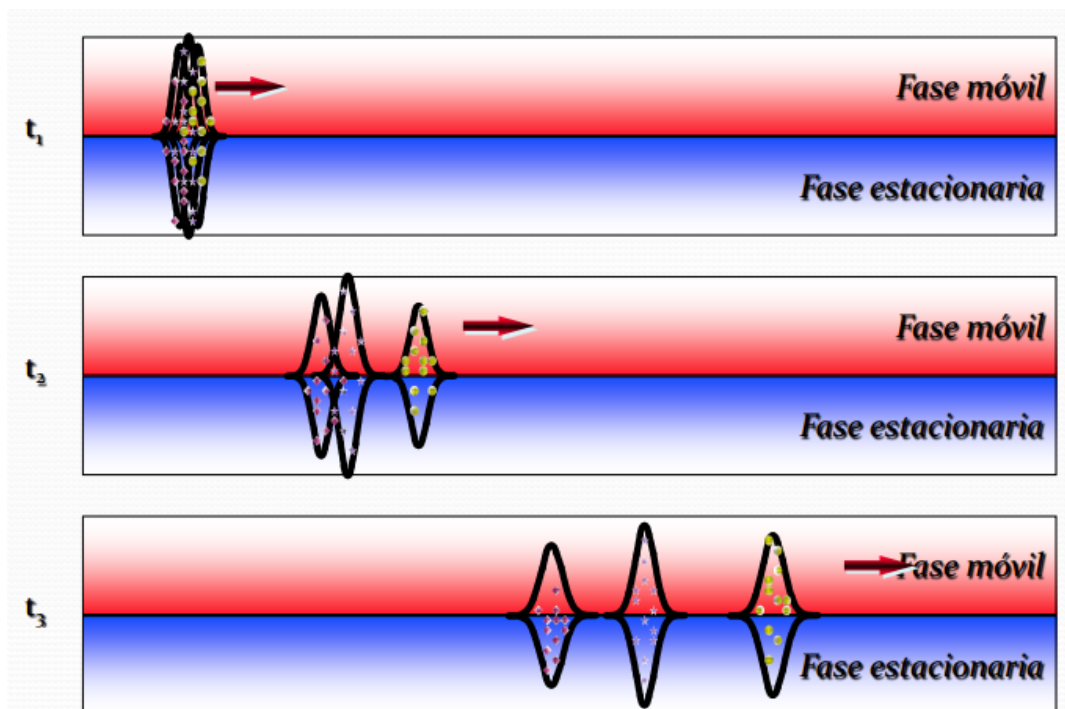
Autor.	Método.	Volumen de muestra utilizado	Columna utilizada.	Fase móvil.	Instrumentos utilizados.	Resultados.
Alex Sparreboom*, Walter J. Loos, Kees Nooter, Gerrit Stoter, Jaap Verweij	HPLC-UV	*1000 µL de plasma. *75µL de muestra para inyección.	*Inertsil ODS-80 C18, 150x4.6 mm D.I.	*Tetrahidrofurano/ Agua (5/95% v/v) a pH ajustado a 2.0 con ácido perclórico.	*HPLC constiaMetric 3200. *Bomba Waters modelo 717. *Detector UV Spectra Physics modelo UV-2000	*Recobro: No se menciona. *Linealidad (10-10000 ng/mL). R <sup>2</sup> =0.995
Thierry Dervieux, Diana Orentas Lein, John Marcellitti, Ken Pischel, Katie Smith, Michael Walsh, and Russell Richerson	HPLC-UV	*100 µL de plasma o sangre. *80 µL de muestra para inyección.	*Terra MS, C18, 25cm x 4.6mm D.I.	*Acetato de amonio 10mM pH 6.5 con 2mL/L de H2O2.	*HPLC Agilent 1100 con bomba cuaternaria y T= 4°C. *detector fluorométrico.	*Recobro: 60-80% *Linealidad (20.0-500 nM). R <sup>2</sup> > 0.995
Abdolhosein Moghbel*, Ahmad Zand-Moghaddamb, Saeid Rezaee, Mohamad Pedramc	HPLC-UV	*200 µL de plasma o sangre. *10-20 µL de muestra para inyección.	*Spherisorb ODS2, C18, 250x4.6 D.I.	*Buffer TRIS-fosfato 0.01 M pH 5.7. metanol: acetoniobilo (82:11:30)	*HPLC Cecil CE1100 equipado con bomba CE 1000. *Detector CE1200 onda variable. *inyector Rheodyne 20.	*Recobro: 61.5-72.7%. *linealidad (0.1-5µM). R <sup>2</sup> =0.999
TARA P. ASSADULLAHI*, ELIF DAGLI and JOHN O. WARNER	HPLC-UV	*500 µL plasma o sangre. *Se inyecta todo el sobrenadante de la extracción.	*, C18, 250x4.6 mm D.I.	Buffer fosfato monobásico de sodio 0.05M, PH= 4.85: tetrahidrofurano (95:5% v/v).	*Bomba Beckman modelo 114M, *Jeringa 210* inyección simple. *Detector modelo 160. *HPLC Ultrasphere ODS RP18	*Recobro: < 70% para la mayor concentración, y más bajo aun para las concentraciones más bajas. *Linealidad (0.01-10 µg/mL) R= 0.79

Cuadro 3. Métodos para cuantificación de MTX en sangre y plasma por HPLC.

## 1.9 Cromatografía de líquidos (HPLC).

La cromatografía líquida es una técnica física de separación de mezclas. Consiste en una fase estacionaria (columna) y una fase móvil la cual se mueve en una dirección definida, está última actúa como portador de la muestra a analizar.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) se encuentra dentro de la cromatografía de elución. En ésta, un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente.



**Figura 6.** Proceso de separación de una mezcla en HPLC.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica ampliamente utilizada en la investigación y análisis biológico gracias a su elevada sensibilidad y alta exactitud además de que es adecuada para la separación de especies termolábiles o no volátiles.

### Técnicas de cromatografía en HPLC.

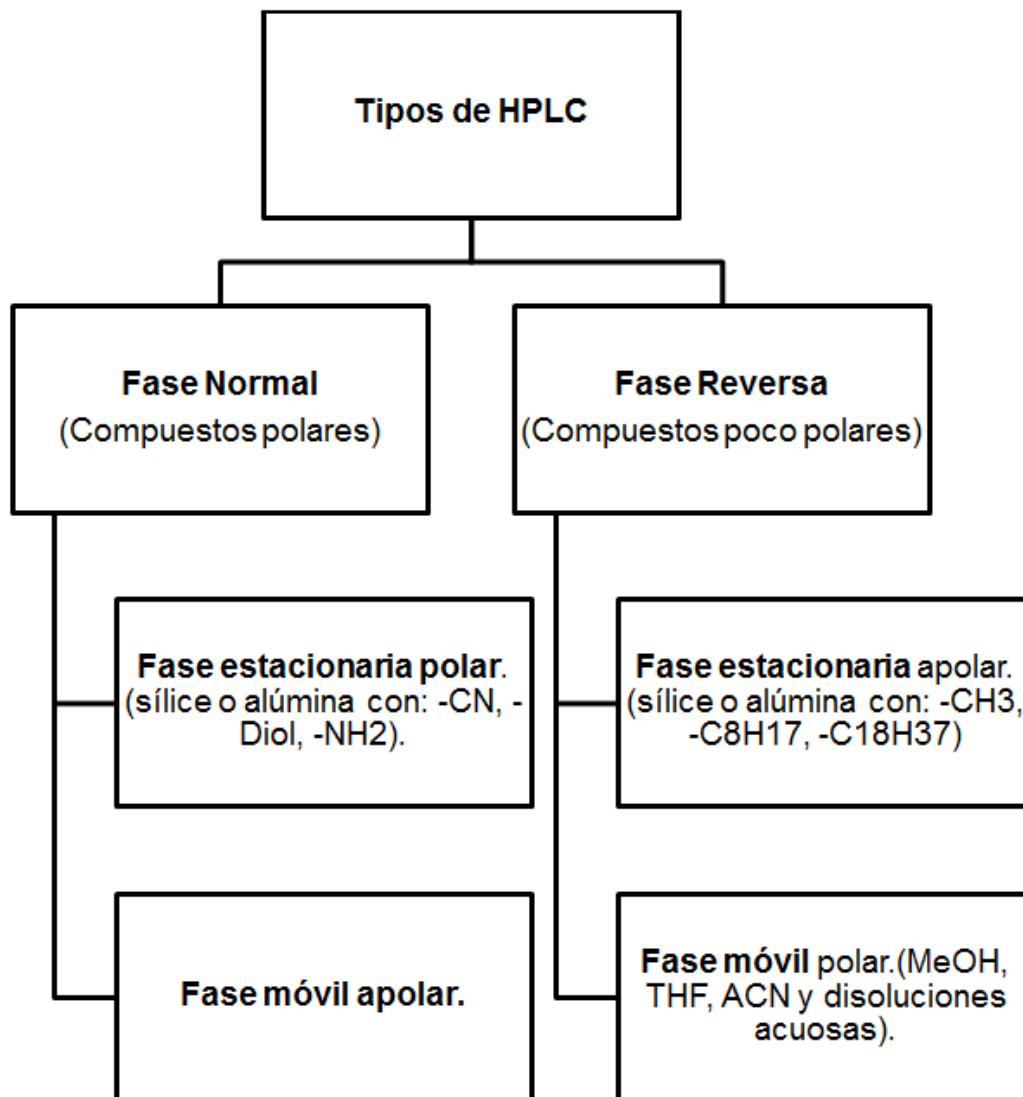


Figura 7, Tipos de cromatografía en HPLC

### 1.9.1 Instrumentación HPLC.

Los componentes básicos de un sistema cromatográfico para HPLC son: Fase móvil, Bomba, Inyector, Columna (Fase estacionaria), detector, Registrador, Integrador.

a) Fase Móvil.

b) Bomba.

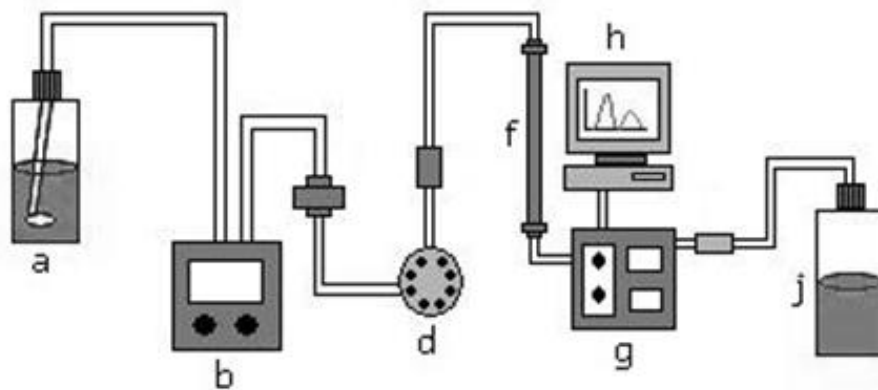
d) Inyector.

f) columna.

g) Detector.

h) Registrador.

j) Recolector de desechos.



**Figura 8.** Equipo HPLC.

## **1.10 Validación de métodos analíticos.**

La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia documental de que se han cumplido los criterios de calidad de un método analítico para una utilización o aplicación específica prevista.

**Validación de un procedimiento analítico:** es el procedimiento para establecer pruebas documentales que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.

### **1.10.1 Propósitos de la validación de un método analítico.**

La validación de un método analítico permite emitir resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para así generar confiabilidad.

### **1.10.2 Tipos de métodos analíticos.**

- ✓ Métodos normalizados.

Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente (ILAC-G18).\*

- ✓ Métodos no normalizados.

Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido aceptado por el laboratorio a partir de un método normalizado (ILAC-G18).

- ✓ Métodos desarrollados por el laboratorio.

Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio.\*

\* El desarrollo del método, así como su adaptación, incluyen la etapa de su validación.

### **1.10.3 Métodos que deben validarse.**

1. Los métodos no normalizados.
2. Métodos diseñados por el laboratorio.
3. Los métodos normalizados que han sido modificados por el laboratorio o utilizados fuera del alcance previsto.

### **1.10.4 Parámetros de desempeño del método analítico.**

Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen exactitud, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad, límite de cuantificación, curva de calibración (linealidad), estabilidad de la muestra.

### **1.10.5 Definiciones de los parámetros de desempeño<sup>15</sup>.**

**Exactitud:** Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero, sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado) y el valor encontrado (valor promedio).

**Linealidad:** Habilidad del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

**Límite de cuantificación:** Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para impurezas y productos de degradación. Se expresa como concentración del analito.

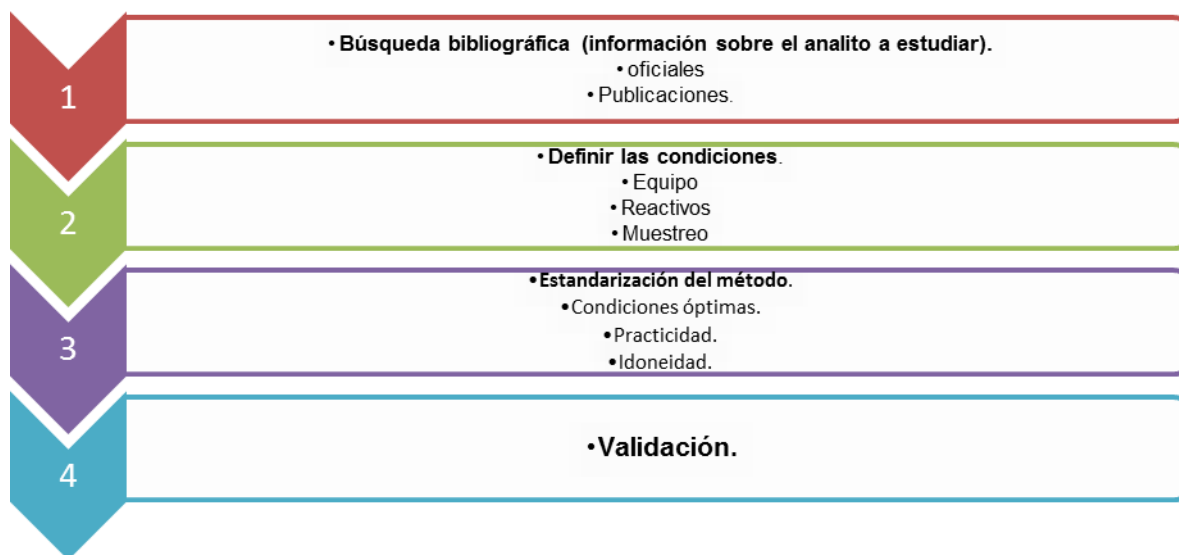
**Precisión:** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad;

**Repetibilidad:** A la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones;

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

**Selectividad:** a la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.

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



**Cuadro 4.** Etapas para desarrollar y validar un método analítico.

### **1.11 Parámetros para validar un método analítico acorde a la NOM-177-SSA1-2013.**

En nuestro país la norma oficial vigente en donde se incluye un apartado para la validación de métodos analíticos es la NOM-177-SSA1-2013<sup>14</sup> “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”, este es un documento oficial mexicano en el que se encuentra el apartado 9.1 “validación de métodos analíticos”, el cual es seguido en las instituciones de salud pública como lo mínimo necesario para validar un método analítico.

El INP al ser un hospital de salud pública sigue estos lineamientos para la validación de los métodos analíticos que en él se implementan.

El apartado 9.1 de esta norma “validación de métodos analíticos” se describen los parámetros mínimos que se deben cumplir para completar la validación.

#### **Los parámetros son los siguientes:**

- Curva de calibración (linealidad).
- Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad).
- Exactitud.
- Estabilidad.
- Límite de cuantificación.
- Selectividad.



## 1.12 Objetivos

### Generales.

- Optimizar y validar un método analítico por HPLC para la cuantificación de metotrexato en muestras de sangre y plasma de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda.

### Específicos

- Optimizar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificación de metotrexato en muestras de sangre y plasma en pacientes del Instituto Nacional de Pediatría.
- Validar el método analítico determinando la estabilidad, selectividad, linealidad, exactitud y precisión acorde a la NOM-177-SSA1-2013.
- Implementar posteriormente el método validado para cuantificar MTX en muestras de pacientes con diagnóstico de LLA del INP y como parte fundamental del proyecto de “Farmacogenética del metotrexato” correlacionar los SNPs en genes responsables de la farmacocinética de este antineoplásico.

### **1.13 Justificación**

Debido al mecanismo de acción del fármaco metotrexato de inhibir enzimas del metabolismo de folatos y en consecuencia afectar la síntesis de ADN y proteínas, es necesario vigilar que los niveles alcanzados para evitar la citotoxicidad del fármaco.

Altos niveles plasmáticos de metotrexato conllevarán a la afectación de tejidos y órganos no blancos (citotoxicidad). Por lo tanto en el Instituto Nacional de Pediatría es necesario optimizar y validar un método analítico que permita cuantificar los niveles plasmáticos de MTX en población pediátrica.

Este método además es de suma importancia para desarrollar un proyecto de farmacogenómica que buscar correlacionar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de proteínas del metabolismo del fármaco con las concentraciones encontradas en los pacientes bajo tratamiento de quimioterapia

## **2. parte experimental.**

### **2.1 Materiales.**

- ✓ Tubos Axigen® de 1.5 mL.
- ✓ Puntas de volumen variable para micropipetas.
- ✓ Matraces volumétricos de 1000 mL.
- ✓ Vasos de precipitados de 500 y 1000 mL.
- ✓ Agitadores magnéticos.
- ✓ Frascos de vidrio de 500 y 1000mL.
- ✓ Matraces Kitasato de 500 mL.
- ✓ Gradillas para microtubos.
- ✓ Embudos de tallo corto y largo.
- ✓ Embudo de filtración Millipore®.
- ✓ Membranas de filtración (medidas).
- ✓ Insertos para equipo HPLC.
- ✓ Tubos falcon de 15 mL.
- ✓ Matraces volumétricos de 10 y 5 mL.
- ✓ Probeta graduada de 500 mL.
- ✓ Matraces Erlenmeyer de 500mL.
- ✓ Pipetas Pasteur con bulbo.
- ✓ Guantes de nitrilo.
- ✓ Cubrebocas.

## 2.2 Equipos e instrumentos

- ✓ Agitador Vórtex®.
- ✓ Centrifuga para microtubos.
- ✓ Baño de ultrasonido.
- ✓ Campana de extracción.
- ✓ Parrilla de agitación magnética.
- ✓ Bomba de vacío.
- ✓ Cronómetro.
- ✓ Ultra congelador a -80°C (Panasonic).
- ✓ Congelador a 4°C (Torrey)
- ✓ Bomba Waters modelo 515.
- ✓ Autoinyector Waters modelo 717.
- ✓ Detector UV-Vis Waters modelo 486.
- ✓ Columna Gemini C18 (Phenomenex) de 150 x 4.6 mm, 5 µm.
- ✓ Balanza analítica OHAUS™
- ✓ Potenciómetro.
- ✓ Micropipeta volumen variable de 1-20 µL.
- ✓ Micropipeta volumen variable de 20-200 µL.
- ✓ Micropipeta volumen variable de 100-1000 µL.
- ✓ Equipo desionizador Millipore.
- ✓ Equipo destilador Millipore.
- ✓ Jeringas de 5 y 10 mL

## **2.3 Reactivos y sustancias de referencia.**

### **2.3.1 Reactivos.**

- ✓ Éter dietílico
- ✓ Acetona
- ✓ Butanol
- ✓ Fosfato dibásico de sodio monohidratado
- ✓ Agua desionizada.
- ✓ Solución salina isotónica.
- ✓ Tetrahidrofurano
- ✓ Dodecilsulfato de sodio

### **2.3.2 Sustancias de Referencia.**

- ✓ Metronidazol, ICN Biomedicals, LT 6159B.
- ✓ Dextrometorfano, ICN Biomedicals, LT 9462C.
- ✓ Piroxicam, Laboratorios Senosiain, LT 0512010939.
- ✓ Meloxicam, Laboratorios Senosiain, LT 0601011135.
- ✓ Ranitidina, ICN Biomedicals, LT R12112
- ✓ Ketorolaco, Laboratorios Senosiain, LT 0606011711.
- ✓ Verapamilo, ICN Biomedicals, LT 1190A.
- ✓ Naproxeno, ICN Biomedicals, LT 8065E.
- ✓ AAS, SIGMA, LT 94F0424.
- ✓ Acetaminofén, ICN Biomedicals, LT 2330C.
- ✓ Propanolol, MP Biomedicals, LT 3304H.
- ✓ Salicilamida, ICN Biomedicals, LT 2216E.
- ✓ Sulfametoxazol, SIGMA, LT 027K2097.
- ✓ Trimetoprim, ICN Biomedicals, LT 6776E.

## **2.4 Sustancia de referencia MTX.**

- ✓ Metotrexato, MP Biomedicals, lote: MR29561 Grado USP, EXP: 04/30/2017.

## 2.5 Material Biológico.

- ✓ Sangre humana.
- ✓ Plasma humano.

Ambos obtenidos del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Pediatría mediante oficio de donación para uso en investigación clínica. (Anexo III)

## 3. Validación del método analítico.

Posterior a la búsqueda bibliográfica de las diferentes técnicas cromatográficas utilizadas para la cuantificación de MTX en sangre y plasma, se compararon las diferentes técnicas encontradas, los diferentes reactivos utilizados en cada una de ellas, los rangos de análisis, etc., En base a esto se definió y adecuó a nuestros objetivos las técnicas descritas en los diagramas 1 y 2.

### 3.1 Condiciones cromatográficas adecuadas para cuantificación de MTX en sangre y plasma.

Condiciones cromatográficas	
<b>Fase Móvil.</b>	Solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio monohidratado con una concentración de 0.05M a un pH de 4.85 con tetrahidrofurano (95%/5% v/v).
<b>Fase estacionaria</b>	Columna Gemini C18.
<b>Volumen de inyección.</b>	100 µL.
<b>Longitud de onda.</b>	313 nm.
<b>Flujo.</b>	1.00 mL/min.

### **3.2 Cuantificación de metotrexato en sangre y plasma.**

Para establecer la curva de calibración y acorde al equipo utilizado en el laboratorio de farmacología del INP, se siguió lo descrito en la NOM-177-SSA1 2013, resultando un valor de 0.25 µg/mL y un límite superior de 10.00 µg/mL.

### **3.3 Preparación de la solución amortiguadora de fosfato dibásico de sodio monohidratado 0.05M pH=4.85**

Para la preparación de 1.00L de solución amortiguadora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  0.05M se pesan 6.90 gramos del compuesto, posteriormente se añade a un matraz volumétrico de 1.00L, se afora con agua desionizada y finalmente es llevando a un pH de 4.85 con NaOH 0.50N.

### **3.4 Preparación de la solución de SDS (docecil sulfato de sodio) 0.15M para lisar los eritrocitos en muestras de sangre.**

Para la preparación de 250mL de solución de SDS 0.15M se pesaron 10.81g de SDS, al ser un detergente es muy importante el uso de cubrebocas para su manipulación, posteriormente se traspasaron a un matraz aforado de 250mL y se aforó con agua desionizada.

### 3.5 Preparación de las diluciones de MTX para la curva de calibración y concentraciones de la curva de calibración.

Acorde a la literatura consultada el MTX es soluble en SSI ligeramente alcalina, por lo que se preparó una solución stock de MTX a una concentración de 1mg/mL de la cual se realizaron disoluciones para obtener los 7 puntos de la curva de calibración y los cuatro controles de calidad.

De la solución stock de 1mg/mL, se obtuvo una segunda solución stock de 100µg/mL ambas utilizadas para la preparación de la curva de calibración.

**Tabla 3.** Concentración de la curva de calibración y disoluciones para su preparación

Punto de la curva.	Concentración final en sangre.	Concentración de la solución de trabajo.	mL a tomar de las soluciones stock.	Volumen a aforar.
1	0.25 µg/mL	2.5 µg/mL	125 µL de 100 µg/mL	5mL
2	0.50 µg/mL	5.0 µg/mL	250 µL de 100 µg/mL	5mL
3	1.00 µg/mL	10.0 µg/mL	500 µL de 100 µg/mL	5mL
4	2.50 µg/mL	25.0 µg/mL	125 µL de 1000 µg/mL	5mL
5	5.00 µg/mL	50.0 µg/mL	250 µL de 1000 µg/mL	5mL
6	7.50 µg/mL	75.0 µg/mL	375 µL de 1000 µg/mL	5mL
7	10.00 µg/mL	100.0 µg/mL	500 µL de 1000 µg/mL	5mL
LIC	0.25 µg/mL	2.5 µg/mL	125 µL de 100 µg/mL	5mL
MCB	0.75 µg/mL	7.5 µg/mL	375 µL de 100 µg/mL	5mL
MCM	4.00 µg/mL	40.0 µg/mL	200 µL de 1000 µg/mL	5mL
MCA	8.00 µg/mL	80.0 µg/mL	400 µL de 1000 µg/mL	5mL



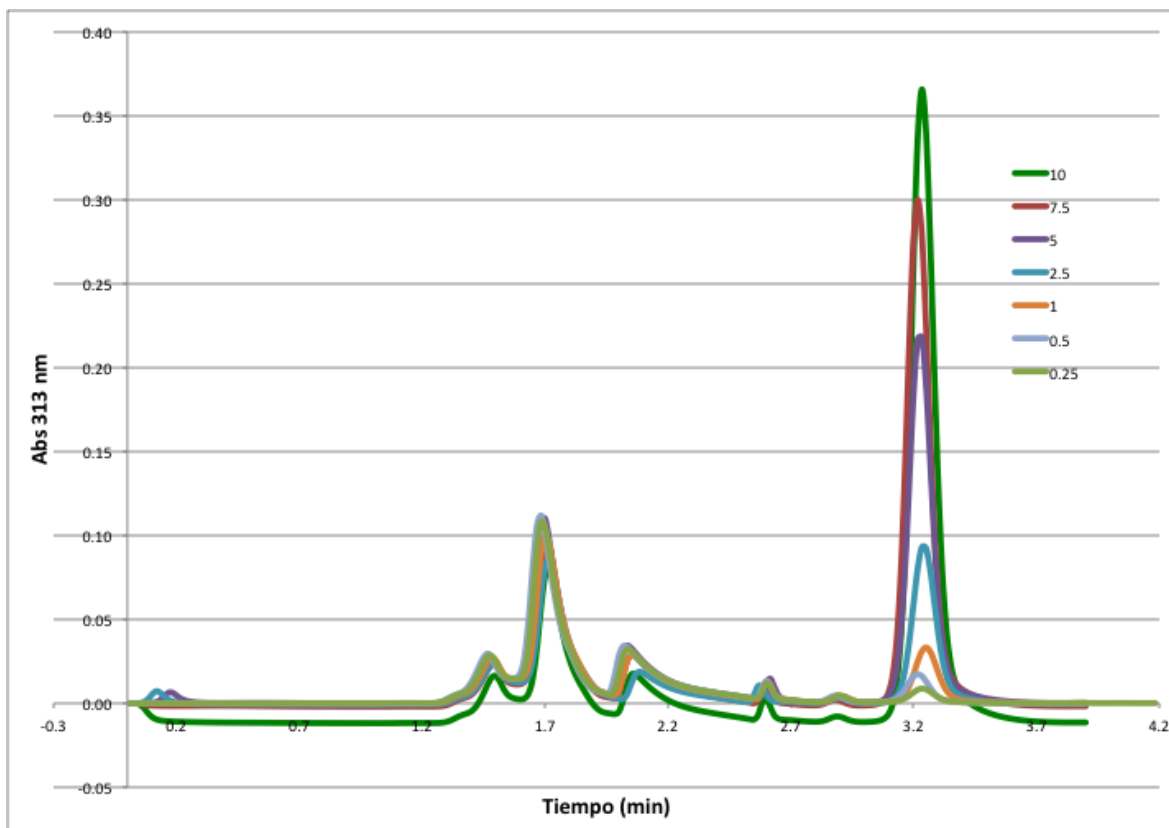
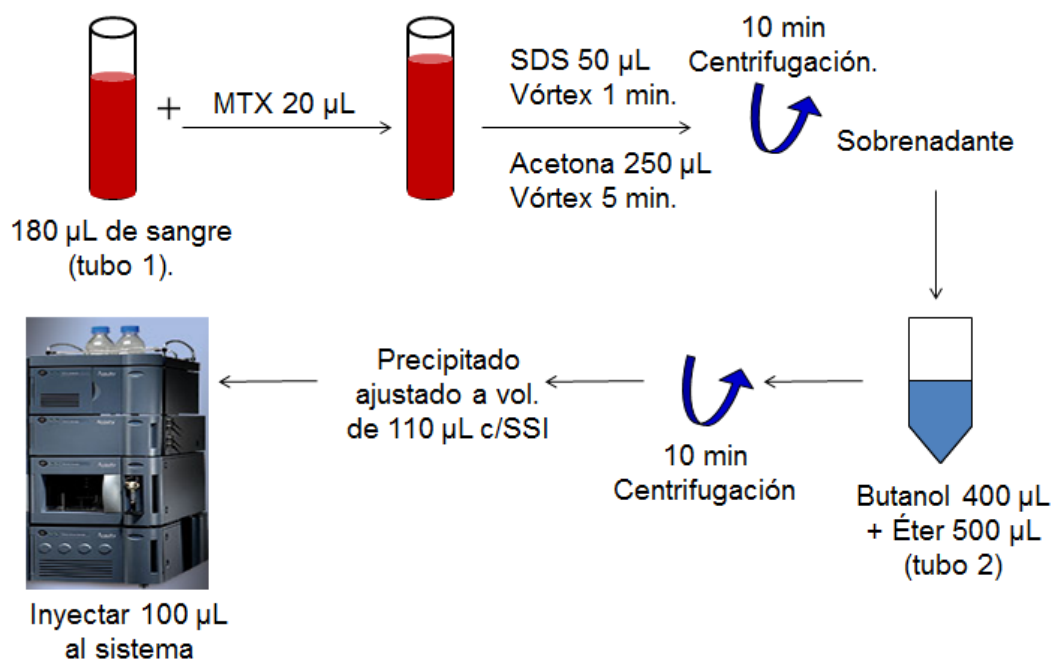


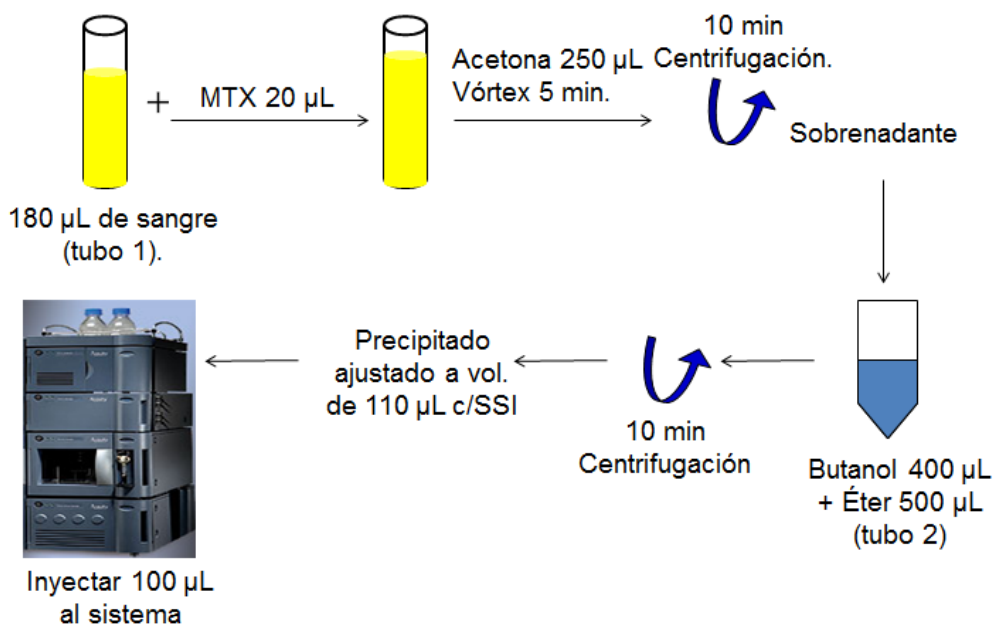
Imagen 8. Curva de calibración obtenida para cuantificación de MTX en sangre y plasma.(diferente cada día de análisis).

### 3.6 Técnica de extracción de MTX en muestras de sangre y plasma.

Se colocaron 180  $\mu\text{L}$  de sangre o plasma + 20  $\mu\text{L}$  de estándar de MTX en solución en un tubo eppendorf de 1.5mL (tubo 1), se agitó en vórtex por 1 min y se agregó 50 $\mu\text{L}$  de SDS para lisar los eritrocitos, se agitó por 1 min más, se agregó 250 $\mu\text{L}$  de acetona como agente desnaturante, se agitó por 5 min y se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm, se agregó en otro tubo eppendorf (tubo 2) 400 $\mu\text{L}$  de butanol + 500 $\mu\text{L}$  de éter dietílico al cual se agregó el sobrenadante del tubo 1 que se centrifugó; este último (tubo 2) se agitó una vez más por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, a la fase acuosa del tubo eppendorf se le agregó SSI hasta un volumen de 100 $\mu\text{L}$  se tomó la muestra resuspendida y se pasó al inserto del equipo HPLC agregando 10 $\mu\text{L}$  más de SSI para obtener un volumen final de 110 $\mu\text{L}$ . Para el plasma se tomaron los mismos volúmenes de plasma y estándar que en sangre, omitiendo el paso de adición de SDS.



**Diagrama 1:** Extracción MTX en sangre.



**Diagrama 2:** Extracción MTX en plasma.

## **4. Resultados de la validación.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la validación en sangre total y plasma acorde al apartado 9.1 de la NOM-177-SSA1-2013.

### **4.1 Selectividad en sangre y plasma.**

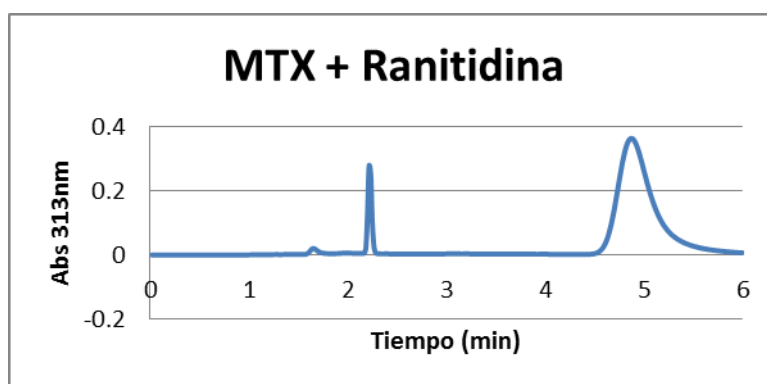
Tal como se describió anteriormente, la LLA infantil puede provocar un cuadro de múltiples sintomatologías, las cuales para su tratamiento el oncólogo recurre a la administración de otros medicamentos al paciente

Por tal motivo y con el objetivo de corroborar la selectividad del método de extracción en el análisis de metotrexato (MTX), se evaluaron un total de 14 fármacos diferentes para evaluar su posible interferencia con el análisis del MTX.

- ✓ Metronidazol.
- ✓ Dextrometorfano.
- ✓ Piroxicam.
- ✓ Meloxicam.
- ✓ Ranitidina.
- ✓ Ketorolaco.
- ✓ Verapamilo
- ✓ Naproxeno.
- ✓ AAS.
- ✓ Acetaminofén.
- ✓ Propanolol.
- ✓ Salicilamida.
- ✓ Sulfametoxazol.
- ✓ Trimetroprim.

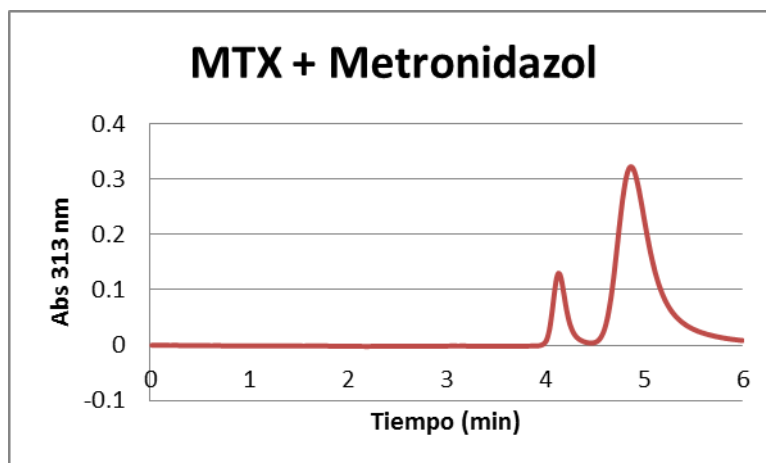
Al analizar los anteriores fármacos a una concentración de 10 $\mu$ g/mL (cabe señalar que no se evaluó la concentración plasmática normal de cada fármaco y la concentración analizada fue tomada como el valor más alto de la curva de calibración del MTX, esto solo con el fin de obtener una señal que pudiera interferir con la señal del MTX). En el análisis de las muestras de fármacos con MTX sólo dos mostraron una señal detectable por nuestro método mostrándose los cromatogramas a continuación.

#### Cromatograma de extracción de Metotrexato con ranitidina.



Ranitidina: 2.22min, MTX 4.85min

#### Cromatograma de extracción de metotrexato con Metronidazol.



Metronidazol: 4.11min, MTX 4.85min

## 4.2 Linealidad (curva de calibración).

Se prepararon 6 curvas de MTX en concentraciones de 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50 y 10.00 µg/mL en cada matriz a evaluar durante la validación (sangre y plasma).

La linealidad del método en el intervalo de concentración estudiado se comprobó calculando la recta de la regresión, el coeficiente de correlación, la relación de áreas con respecto a la concentración de las seis curvas de control analizadas así como la recuperación de cada curva de control al aplicar el arreglo lineal.

Adicionalmente para cada prueba (referencia en sangre y plasma), se realizó una prueba estadística de regresión lineal con el programa GraphPad Prism® V. 5.

En las tablas 4 y 5 se muestran los resultados de la prueba de linealidad para seis curvas de calibración en sangre y plasma respectivamente, expresados en relación de área de MTX con respecto a la concentración nominal. El promedio de los valores de áreas de MTX vs concentración nominal fue ajustado a través de un arreglo lineal.

Ecuación de la línea recta:

$$y = m * x + b$$

### 4.2.1 Prueba de linealidad patrón primario de MTX para sangre.

Relación de áreas prueba linealidad en sangre							
Concentración (µg/mL)	0.25	0.5	1	2.5	5	7.5	10
Curva 1	157912.000	261333.000	515984.000	1239792.000	2366812.000	3594746.000	4614423.000
Curva 2	160089.000	263554.000	521769.000	1252623.000	2435920.000	3650511.000	4730617.000
Curva 3	161101.000	269166.000	522821.000	1266600.000	2472631.000	3706907.000	4812084.000
Curva 4	165720.000	254098.000	531782.000	1323899.000	2489810.000	3746996.000	4685895.000
Curva 5	164749.000	262852.000	534400.000	1337550.000	2521645.000	3848955.000	4882621.000
Curva 6	165219.000	260915.000	544759.000	1297987.000	2521711.000	3817208.000	4948645.000
Promedio	162465.000	261986.333	528585.833	1286408.500	2468088.167	3727553.833	4779047.500
SD	3213.468	4869.394	10431.683	39653.467	59207.890	97112.225	125464.194
C.V. (%)	1.978	1.859	1.974	3.082	2.399	2.605	2.625

La curva de calibración del estándar de metotrexato en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación  $y=479354x + 55917$  y a un coeficiente de correlación igual a 0.9993 para el análisis en sangre.

#### 4.2.3 Prueba de linealidad de patrón primario de MTX en plasma.

**Tabla 5.** Linealidad del método para cuantificar MTX en plasma.

Relación de áreas prueba linealidad en plasma							
Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.25	0.5	1	2.5	5	7.5	10
Curva 1	165074.000	267172.000	532747.000	1237182.000	2314552.000	3572147.000	4620680.000
Curva 2	162572.000	263298.000	526879.000	1210651.000	2485727.000	3551844.000	4819612.000
Curva 3	159933.000	257038.000	526112.000	1213271.000	2472014.000	3563548.000	4739089.000
Curva 4	162902.000	263498.000	523648.000	1360773.000	2586959.000	3869296.000	4868289.000
Curva 5	159081.000	265245.000	534783.000	1316960.000	2513961.000	3862984.000	4691106.000
Curva 6	162531.000	262430.000	533212.000	1324393.000	2523792.000	3732749.000	4897764.000
Promedio	162015.500	263113.500	529563.500	1277205.000	2482834.167	3692094.667	4772756.667
SD	2175.492	3422.732	4578.252	64667.781	91578.094	150225.290	107588.418
C.V. (%)	1.343	1.301	0.865	5.063	3.688	4.069	2.254

La curva de calibración para el análisis en plasma responde a la ecuación;  $y=477683x + 57365$  con un coeficiente de correlación igual a 0.9995.

#### 4.2.4 Recuperación al aplicar el arreglo lineal en sangre y plasma.

En las tablas 6 y 7 se muestran los resultados de la prueba de linealidad para seis curvas de calibración en sangre y plasma respectivamente, expresados como concentración recuperada al aplicar el arreglo lineal.

**Tabla 6.** Concentración de MTX recuperada al aplicar el arreglo lineal en sangre.

Concentración recuperada al aplicar el arreglo lineal en sangre.							
Concentración (µg/mL)	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	7.50	10.0
Curva 1	0.213	*	0.960	2.470	4.821	7.382	9.510
Curva 2	0.217	0.433	0.972	2.496	4.965	7.499	9.752
Curva 3	0.219	0.445	0.974	2.526	5.042	7.616	9.922
Curva 4	0.229	0.413	0.993	2.645	5.077	7.700	9.659
Curva 5	0.227	0.432	0.998	2.674	5.144	7.913	10.069
Curva 6	0.228	0.428	1.020	2.591	5.144	7.847	10.207
Promedio	0.222	0.430	0.986	2.567	5.032	7.660	9.853
X % Desviación	9.579	13.960	2.050	3.133	2.070	2.656	2.388
SD	0.007	0.010	0.022	0.083	0.124	0.203	0.262
C.V. (%)	3.016	2.363	2.207	3.223	2.455	2.645	2.656

\*Datos omitidos al no cumplir con el criterio del valor nominal real < 15%.

**Tabla 7.** Concentración de MTX recuperada al aplicar el arreglo lineal en plasma.

Concentración recuperada al aplicar el arreglo lineal en plasma.							
Concentración (µg/mL)	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00	7.50	10.0
Curva 1	0.225	0.439	0.995	2.470	4.725	7.358	9.553
Curva 2	0.220	0.431	0.983	2.414	5.084	7.315	9.969
Curva 3	0.215	*	0.981	2.420	5.055	7.340	9.801
Curva 4	0.221	0.432	0.976	2.729	5.296	7.980	10.071
Curva 5	0.213	0.435	0.999	2.637	5.143	7.967	9.700
Curva 6	0.220	0.429	0.996	2.652	5.163	7.694	10.133
Promedio	0.219	0.433	0.989	2.554	5.078	7.609	9.871
X % desviación.	12.400	13.360	1.167	4.760	3.387	3.618	1.968
SD	0.005	0.004	0.010	0.135	0.192	0.314	0.225
C.V. (%)	2.079	0.924	0.970	5.301	3.776	4.133	2.282

\*Datos omitidos al no cumplir con el criterio del valor nominal real < 15%.

#### 4.2.5 Prueba significancia estadística linealidad en sangre.

Como se mencionó, adicionalmente se realizó a las curvas de calibración un análisis estadístico de regresión lineal, esto con el fin de corroborar estadísticamente la linealidad del método, para ello se establecieron las hipótesis estadísticas **H0** y **H1** con las cuales se pretendió demostrar si la pendiente de nuestra curva es diferente a 0 y con ello concluir que existe una relación concentración-respuesta lineal.

En las tablas 8 y 9 se muestran los valores obtenidos del análisis estadístico de regresión lineal realizado a las curvas de calibración (valores promedio) en sangre y plasma respectivamente.

**Tabla 8.** Valores del análisis estadístico de regresión lineal de la curva en sangre.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Cuadrado medio.	F0.	F 0.05, 1, 5
Regresión.	1.6424E+13	1	1.6424E+13	4985.704	6.61
Error residual.	1.3177E+10	5	3294239781		
Total.	1.6437E+13	6			

H0:  $\beta_1 = 0$

H1:  $\beta_1 \neq 0$

Rechazo o no rechazo de H0.

$F_0 > F_{0.05, 1, 5}$

**Se rechaza H0.**



#### 4.2.6 Prueba significancia estadística linealidad en plasma.

Tabla 9. Valores del análisis estadístico de regresión lineal de la curva en plasma.

Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Cuadrado medio.	F0.	F 0.05, 1, 5
Regresión.	1.9758E+13	1	1.9758E+13	10015.996	6.61
Error residual.	9863248624	5	1972649725		
Total.	1.9768E+13	6			

H0:  $\beta_1 = 0$

H1:  $\beta_1 \neq 0$

Rechazo o no rechazo de H0.

$F_0 > F_{0.05, 1, 5}$

**Se rechaza H0.**

**Con los anteriores resultados se concluye con el 95% de confianza que existe evidencia significativa de que las pendientes en las curvas de sangre y plasma son diferentes de 0.**

Los siguientes datos nos muestran los valores del intervalo de confianza del intercepto cuando X es igual a =0, además se muestran las curvas de regresión lineal y los gráficos de residuales de la prueba en sangre y plasma.

**Límite de confianza del intercepto curva en sangre. Graphpad Prism®.**

Intercepto en Y cuando X=0.0:

Límite inferior: -18440

Límite superior: 130300

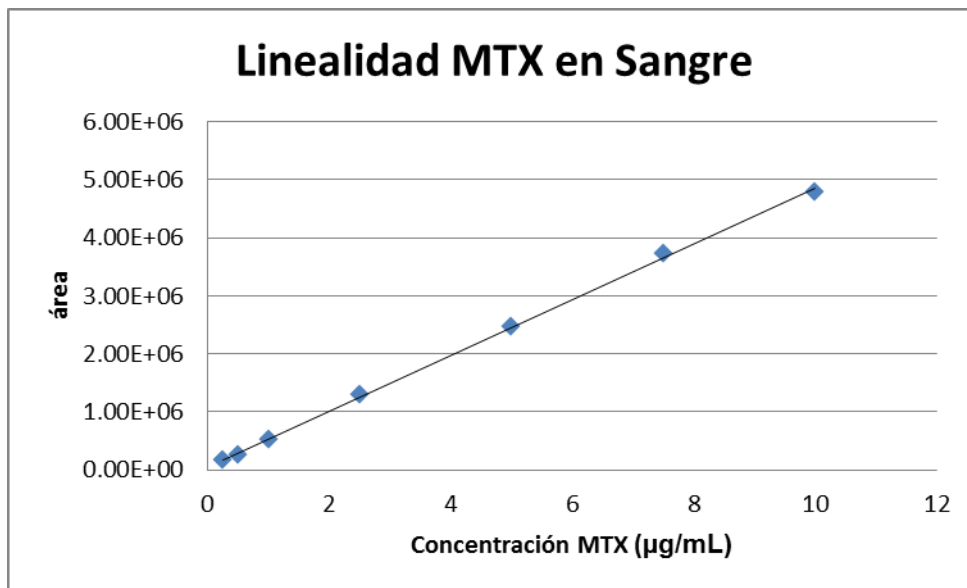
**Límite de confianza del intercepto. Graphpad Prism®.**

Intercepto en Y cuando X=0.0:

Límite inferior: -6899

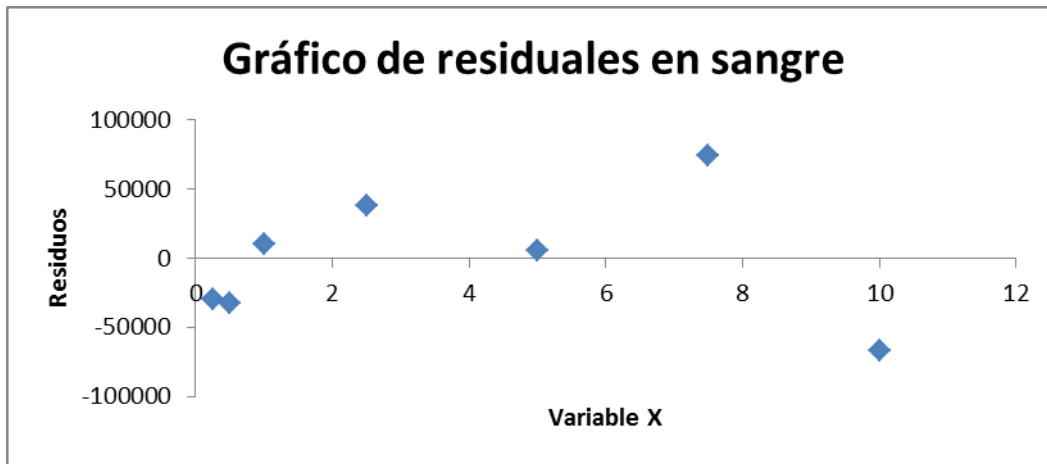
Límite superior: 120800

**Gráfica linealidad en sangre.**



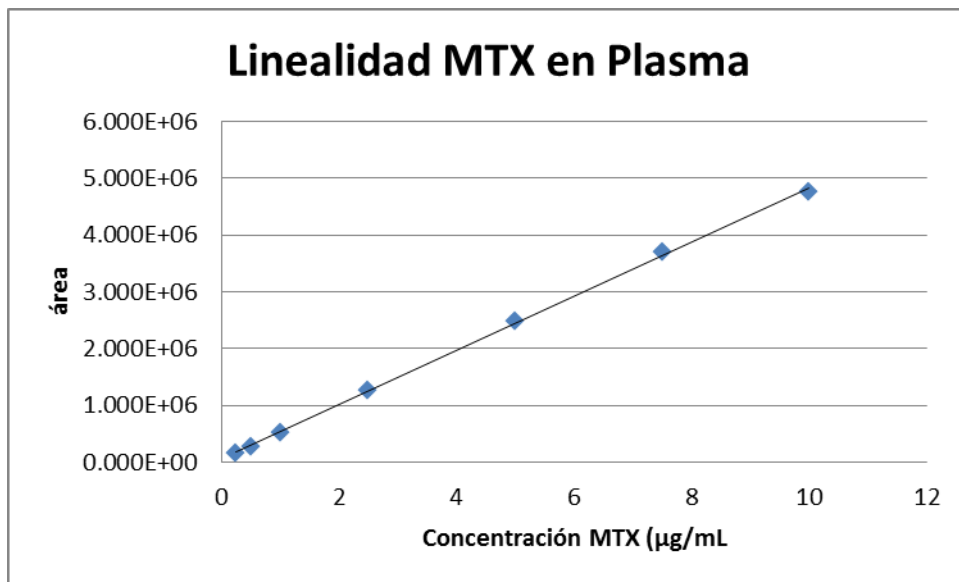
**Figura 9,** Gráfica regresión lineal MTX en sangre.

**Gráfica residuales linealidad sangre.**



**Figura 10,** Gráfico de residuales prueba en sangre.

**Gráfica linealidad en plasma.**



**Figura 11,** Gráfica regresión lineal MTX en plasma.

## Gráfica residuales linealidad plasma.

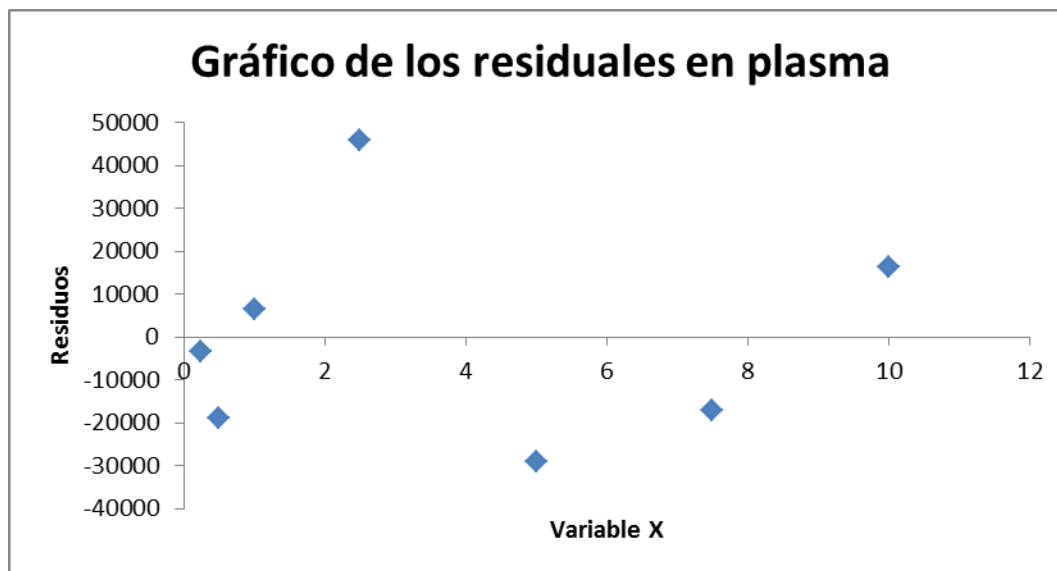


Imagen 12. Gráfico de residuales prueba en plasma.

### **4.3 Precisión en sangre y plasma (Medida como repetibilidad y reproducibilidad).**

#### **Repetibilidad.**

En la tabla 10 se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad en sangre y plasma, la cual se realizó analizando por quintuplicado en un mismo día las muestras: LIC, MCB, MCM, MCA, calculando la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. Como criterio de aceptación se tomó el %CV del valor promedio el cual no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

En la tabla 11 se ilustran de manera resumida los valores del %CV de los datos de repetibilidad en sangre y plasma.

### 4.3.1 Datos Repetibilidad en sangre y plasma.

Tabla 10. Datos repetibilidad en sangre y plasma.

Datos Repetibilidad en sangre y plasma		
Concentración nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración obtenida en sangre ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración obtenida en plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )
LIC = (0.25 $\mu\text{g/mL}$ )	0.286	0.235
	0.239	0.209
	0.229	0.248
	0.254	0.232
	0.208	0.284
<b>Promedio</b>	0.244	0.242
<b>SD</b>	0.029	0.028
<b>%CV</b>	<b>12.034</b>	<b>11.364</b>
MCB = (0.75 $\mu\text{g/mL}$ )	0.738	0.662
	0.596	0.670
	0.670	0.705
	0.728	0.738
	0.627	0.684
<b>Promedio</b>	0.672	0.692
<b>SD</b>	0.062	0.031
<b>%CV</b>	<b>9.205</b>	<b>4.416</b>
MCM = (4.00 $\mu\text{g/mL}$ )	4.227	4.232
	4.412	4.028
	3.528	4.420
	4.607	4.086
	3.830	4.681
<b>Promedio</b>	4.121	4.289
<b>SD</b>	0.438	0.266
<b>%CV</b>	<b>10.636</b>	<b>6.205</b>
MCA = (8.00 $\mu\text{g/mL}$ )	7.533	8.988
	8.101	8.023
	8.800	8.789
	8.782	8.020
	8.856	8.064
<b>Promedio</b>	8.414	8.377
<b>SD</b>	0.582	0.473
<b>%CV</b>	<b>6.914</b>	<b>5.643</b>

Tabla 11. Datos comparativos repetibilidad en sangre y plasma.

Resultados comparativos repetibilidad		
	Sangre (%)	Plasma (%)
N= 5 CV*	<b>LIC** = 12.034</b>	<b>LIC** = 11.364</b>
	<b>MCB = 9.205</b>	<b>MCB = 4.416</b>
	<b>MCM = 10.636</b>	<b>MCM = 6.205</b>
	<b>MCA = 6.914</b>	<b>MCA = 5.643</b>

\* Criterio de aceptación: CV<15%

\*\* Criterio de aceptación: CV <20%

### 4.3.2 Reproducibilidad en sangre y plasma

La tabla 12 y 13, muestran los resultados de la reproducibilidad del método en sangre y plasma respectivamente, la cual fue determinada analizando por quintuplicado durante tres días y corridas analíticas diferentes las muestras: LIC, MCB, MCM, MCA. Calculando la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. Como criterio de aceptación se tomó el %CV del valor promedio el cual no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

En la tabla 14 se ilustran de manera resumida los valores del %CV de los datos de reproducibilidad en sangre y plasma.

#### Datos en sangre

**Tabla 12.** Datos reproducibilidad en sangre.

Día	LIC (0.25µg/mL)	MCB (0.75µg/mL)	MCM (4.00µg/mL)	MCA (8.00µg/mL)
Día 1.	0.268	0.628	3.432	8.669
	0.288	0.686	3.838	8.033
	0.234	0.681	4.130	7.167
	0.254	0.568	4.480	8.566
	0.235	0.533	3.872	8.078
Día 2.	0.231	0.838	3.860	8.066
	0.272	0.846	4.232	8.599
	0.235	0.686	4.113	8.111
	0.266	0.698	4.005	8.093
	0.238	0.676	3.970	8.102
Día 3.	0.285	0.718	4.040	7.865
	0.236	0.687	4.402	8.235
	0.289	0.745	3.972	8.352
	0.235	0.653	3.780	8.034
	0.276	0.657	4.402	8.663
Promedio	0.257	0.687	4.035	8.176
S.D.	0.022	0.083	0.275	0.382
<b>%CV</b>	<b>8.740</b>	<b>12.066</b>	<b>6.803</b>	<b>4.668</b>

**Datos Plasma.**

**Tabla 13.** Datos reproducibilidad en plasma.

Día	LIC (0.25µg/mL)	MCB (0.75µg/mL)	MCM (4.00µg/mL)	MCA (8.00µg/mL)
Día 1.	0.248	0.672	4.032	8.082
	0.286	0.648	3.924	8.278
	0.266	0.705	4.080	8.664
	0.286	0.726	4.032	8.336
	0.233	0.805	4.043	8.047
Día 2.	0.268	0.653	4.069	8.051
	0.256	0.711	4.088	8.993
	0.276	0.729	4.036	8.087
	0.282	0.796	4.051	8.634
	0.235	0.698	4.054	8.054
Día 3.	0.258	0.711	4.080	8.003
	0.269	0.796	4.090	8.682
	0.257	0.684	4.015	8.651
	0.284	0.679	4.067	8.056
	0.235	0.709	4.097	8.976
Promedio	0.263	0.715	4.051	8.373
S.D.	0.019	0.050	0.043	0.359
<b>%CV</b>	<b>7.088</b>	<b>6.938</b>	<b>1.058</b>	<b>4.282</b>

**Tabla 14.** Datos comparativos reproducibilidad sangre vs plasma.

<b>Precisión medida como reproducibilidad. (3días)</b>		
N=5 CV*	Sangre (%)	Plasma (%)
	LIC** = 8.740	LIC** = 7.088
	MCB = 12.066	MCB = 6.938
	MCM = 6.803	MCM = 1.058
	MCA = 4.668	MCA = 4.282

\* Criterio de aceptación: CV<15%

\*\* Criterio de aceptación: CV <20%

#### 4.4 Exactitud en sangre y plasma.

Tal como lo indica el apartado 9.1.9.7 de la NOM-177-SSA1-2013, para evaluar la exactitud del método, de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Desviación} = \left| 100 * \frac{(\text{concentración adicionada}) - (\text{concentración obtenida})}{(\text{concentración adiconada})} \right|$$

Para considerar exacto el método el valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

Las tablas 15 y 16 ilustran los valores de % de desviación obtenidos de los datos de repetibilidad en sangre y plasma respectivamente.

Las tablas 17 y 18 ilustran los valores de % de desviación obtenidos de los datos de reproducibilidad en sangre y plasma respectivamente.



#### 4.4.1 Datos de repetibilidad y % de desviación en sangre.

**Tabla 15.** Datos Exactitud en sangre y plasma

Datos Repetibilidad en sangre.		
Concentración nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración obtenida en sangre ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Desviación
LIC = (0.25 $\mu\text{g/mL}$ )	0.286	14.600
	0.239	4.240
	0.229	8.240
	0.254	1.760
	0.208	16.760
	<b>Promedio</b>	<b>9.120</b>
MCB = (0.75 $\mu\text{g/mL}$ )	0.738	1.600
	0.596	20.533
	0.670	10.667
	0.728	2.933
	0.627	16.400
	<b>Promedio</b>	<b>10.427</b>
MCM = (4.00 $\mu\text{g/mL}$ )	4.227	5.675
	4.412	10.300
	3.528	11.800
	4.607	15.175
	3.830	4.250
	<b>Promedio</b>	<b>9.440</b>
MCA = (8.00 $\mu\text{g/mL}$ )	7.533	5.838
	8.101	1.263
	8.800	10.000
	8.782	9.775
	8.856	10.700
	<b>Promedio</b>	<b>7.515</b>

#### 4.4.2 Datos de repetibilidad y % de desviación en plasma

**Tabla 16.** Datos de exactitud en plasma.

Datos Repetibilidad en plasma.		
Concentración nominal ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración obtenida en plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Desviación
LIC = (0.25 $\mu\text{g/mL}$ )	0.235	5.680
	0.209	16.280
	0.248	0.560
	0.232	7.080
	0.284	13.680
	<b>Promedio</b>	<b>8.656</b>
MCB = (0.75 $\mu\text{g/mL}$ )	0.662	11.733
	0.670	10.667
	0.705	6.000
	0.738	1.600
	0.684	8.800
	<b>Promedio</b>	<b>7.760</b>
MCM = (4.00 $\mu\text{g/mL}$ )	4.232	5.800
	4.028	0.700
	4.420	10.500
	4.086	2.150
	4.681	17.025
	<b>Promedio</b>	<b>7.235</b>
MCA = (8.00 $\mu\text{g/mL}$ )	8.988	12.350
	8.023	0.287
	8.789	9.863
	8.020	0.250
	8.064	0.800
	<b>Promedio</b>	<b>4.710</b>

**Tabla 17.** Datos de reproducibilidad y % de desviación en sangre.

Día	LIC (0.25µg/mL)	% Desviación	MCB (0.75µg/mL)	% Desviación	MCM (4.00µg/mL)	% Desviación	MCA (8.00µg/mL)	% Desviación
Día 1.	0.268	7.520	0.628	16.267	3.432	14.2	8.669	8.363
	0.288	15.480	0.686	8.533	3.838	4.05	8.033	0.412
	0.234	6.080	0.681	9.200	4.130	3.25	7.167	10.413
	0.254	1.680	0.568	24.267	4.480	12	8.566	7.075
	0.235	5.920	0.533	28.933	3.872	3.2	8.078	0.975
Día 2.	0.231	7.520	0.838	11.733	3.860	3.5	8.066	0.825
	0.272	9.000	0.846	12.800	4.232	5.8	8.599	7.488
	0.235	5.840	0.686	8.533	4.113	2.825	8.111	1.388
	0.266	6.680	0.698	6.933	4.005	0.125	8.093	1.163
	0.238	4.520	0.676	9.867	3.970	0.75	8.102	1.275
Día 3.	0.285	14.080	0.718	4.267	4.040	1	7.865	1.688
	0.236	5.400	0.687	8.400	4.402	10.05	8.235	2.937
	0.289	15.840	0.745	0.667	3.972	0.7	8.352	4.400
	0.235	5.760	0.653	12.933	3.780	5.5	8.034	0.425
	0.276	10.680	0.657	12.400	4.402	10.05	8.663	8.288
<b>Promedio</b>		<b>8.133</b>		<b>11.716</b>		<b>5.133</b>		<b>3.808</b>

**Tabla 18.** Datos de reproducibilidad y % de desviación en plasma.

Día	LIC (0.25µg/mL)	% Desviación	MCB (0.75µg/mL)	% Desviación	MCM (4.00µg/mL)	% Desviación	MCA (8.00µg/mL)	% Desviación
Día 1.	0.248	0.560	0.672	10.400	4.032	0.800	8.082	1.025
	0.286	14.560	0.648	13.600	3.924	1.900	8.278	3.475
	0.266	6.760	0.705	6.000	4.080	2.000	8.664	8.300
	0.286	14.720	0.726	3.200	4.032	0.800	8.336	4.200
	0.233	6.440	0.805	7.333	4.043	1.075	8.047	0.588
Día 2.	0.268	7.200	0.653	12.933	4.069	1.725	8.051	0.638
	0.256	2.720	0.711	5.200	4.088	2.200	8.993	12.413
	0.276	10.600	0.729	2.800	4.036	0.900	8.087	1.088
	0.282	13.120	0.796	6.133	4.051	1.275	8.634	7.925
	0.235	5.680	0.698	6.933	4.054	1.350	8.054	0.675
Día 3.	0.258	3.240	0.711	5.200	4.080	2.000	8.003	0.038
	0.269	7.880	0.796	6.133	4.090	2.250	8.682	8.525
	0.257	3.000	0.684	8.800	4.015	0.375	8.651	8.138
	0.284	13.800	0.679	9.467	4.067	1.675	8.056	0.700
	0.235	5.760	0.709	5.467	4.097	2.425	8.976	12.200
<b>Promedio</b>		<b>7.736</b>		<b>7.307</b>		<b>1.517</b>		<b>4.662</b>

#### **4.5 Recobro en sangre y plasma.**

En el apartado 9.1 de la NOM-177-SSA1-2013, no se menciona realizar el recobro en la validación del método analítico, pero se realizó para ilustrar los resultados obtenidos del recobro absoluto del método para cuantificar MTX en sangre y plasma.

El recobro fue definido como el cociente de la concentración del analito (MTX) obtenido de los estándares de control: MCB, MCM y MCA después de haberse sometido al método de extracción en fluido biológico (sección 3.6 “Técnica de extracción de MTX en muestras de sangre y plasma”), entre la respuesta obtenida en muestras en solución en concentración equivalente, las cuales no se sometieron al proceso de extracción. Los resultados se muestran en la tabla 19.

Al no ser una prueba requerida para la validación del método analítico en la NOM-177-SSA1-2013, no existe un criterio de aceptación definido.

#### 4.5.1 Recobro en sangre y plasma.

**Tabla 19.** Recobro de MTX en sangre y plasma.

Muestra.	Recobro en sangre.			Recobro en plasma.		
	MTX en Solución.	MTX en Extracción.	%Recobro.	MTX en Solución.	MTX en Extracción.	%Recobro.
MCB (0.75 µg/mL)	0.693	0.398	57.431	0.701	0.426	60.770
	0.688	0.390	56.686	0.689	0.443	64.296
	0.698	0.413	59.169	0.704	0.428	60.795
	0.708	0.415	58.616	0.708	0.465	65.678
	0.701	0.349	49.786	0.702	0.452	64.387
Promedio.	0.6976	0.393	56.338	0.7008	0.4428	63.185
S.D.	0.008	0.027	3.790	0.007	0.016	2.260
%CV.	1.095	6.797	6.727	1.016	3.709	3.577
<b>Recobro.</b>			<b>56.338</b>			<b>63.185</b>
MCM (4.00 µg/mL).	4.015	2.098	52.254	4.191	2.815	67.168
	4.03	2.029	50.347	4.160	2.840	68.269
	4.043	2.083	51.521	4.168	3.088	74.088
	4.054	2.273	56.068	4.099	2.841	69.310
	3.994	2.306	57.737	4.158	2.961	71.212
Promedio.	4.027	2.158	53.585	4.155	2.909	70.009
S.D.	0.024	0.123	3.159	0.034	0.103	2.724
%CV.	0.586	5.723	5.895	0.819	3.538	3.891
<b>Recobro.</b>			<b>53.585</b>			<b>70.009</b>
MCA (8.00 µg/mL).	8.129	4.418	54.349	8.107	5.726	70.630
	8.162	3.696	45.283	7.919	5.928	74.858
	8.171	4.229	51.756	8.152	5.615	68.879
	8.178	4.657	56.945	8.148	5.683	69.747
	8.209	4.690	57.132	8.137	5.464	67.150
Promedio.	8.170	4.338	53.093	8.093	5.683	70.253
S.D.	0.029	0.405	4.887	0.099	0.169	2.878
%CV.	0.353	9.336	9.204	1.219	2.976	4.096
<b>Recobro.</b>			<b>53.093</b>	<b>70.227%</b>		<b>70.253</b>
<b>Recuperación global</b>						
Fluido	<b>Sangre</b>			<b>Plasma</b>		
<b>Promedio global.</b>	<b>54.338%</b>			<b>67.816%</b>		

#### **4.6 Estabilidad de las muestras.**

La prueba de estabilidad tiene como finalidad determinar el efecto de los cambios de temperatura sobre el analito de interés, esto con el fin de evaluar el tiempo de almacenamiento de la muestra en la cual el analito no sufre alteraciones que modifiquen o alteren su cuantificación.

En el apartado 9.1.9.8 de la NOM-177-SSA1-2013, se mencionan diferentes condiciones de análisis para las muestras tales como: Estabilidad a corto plazo, estabilidad a largo plazo, estabilidad en muestra procesada, estabilidad en automuestreador, estabilidad en ciclos de congelación-descongelación así como estabilidad en solución. Para nuestro caso sólo se evaluó la estabilidad a largo plazo a una temperatura de 4°C (almacenamiento durante toma de la muestra en el área de oncología) y -80°C (almacenamiento del plasma en el laboratorio de farmacología una vez separado de la sangre total).

Se evaluó por triplicado la respuesta del analito (MTX), a las concentraciones de las muestras MCB y MCA las cuales fueron analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas ( días 0, 3, 7, 15, 30 y 60).

Las muestras control son interpoladas en una curva de control recién preparada y las concentraciones obtenidas son comparadas con la concentración nominal. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

Para considerar las soluciones estables la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor al 10%.

Las tablas 20, 22 de sangre y 30, 32 de plasma muestran los valores de concentración obtenidos de las muestras MCB y MCA frescas, así mismo muestran los valores promedio del recobro, y si cumplen con el IC al 15% del valor nominal de cada muestra.

En las tablas 24, 26 de sangre y 34, 36 de plasma se muestran los valores de concentración obtenidos de las muestras MCB y MCA almacenadas a 4°C en caso de sangre y a -80°C en caso de plasma, así mismo muestran los valores promedio de recobro, y si cumplen con el IC al 15% del valor nominal de cada muestra.

En las tablas 21 y 23 de muestras de sangre fresca y 25 y 27 de sangre almacenada a 4°C se muestran los valores % de desviación totales obtenidos así como su promedio, de las muestras MCB y MCA.

En las tablas 31 y 33 de muestras de plasma fresco y 35 y 37 de plasma almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  se muestran los valores % de desviación totales obtenidos así como su promedio, de las muestras MCB y MCA.

Como ayuda a una mejor comprensión de los valores obtenidos se realizaron las tablas 28 de sangre y 38 de plasma, en las cuales se realiza una lista en la que se muestra si los valores obtenidos cada nivel evaluado: MCB y MCA, cumplen con el IC del 15% del valor nominal de la muestra evaluada.

Así mismo las tablas 29 de sangre y 39 de plasma nos muestra una comparativa del % de desviación obtenido de las muestras frescas VS las muestras evaluadas durante el proceso de estabilidad, en dichas tablas también se observa el valor de diferencia de % de desviación entre muestras frescas VS muestras almacenadas, esto con el fin de facilitar la comparación de datos.



#### 4.6.1 Estabilidad de las muestras de sangre.

Resultados de las muestras de sangre preparadas el día de cada prueba.

**Tabla 20.** Valor obtenido de la muestra MCB en sangre, recién preparada y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCB 0.750 µg/mL	0.712	0.689	0.679	0.710	0.710	0.693
	0.690	0.712	0.668	0.690	0.698	0.688
	0.723	0.734	0.681	0.701	0.675	0.698
Promedio	0.708	0.712	0.676	0.700	0.694	0.693
SD	0.017	0.023	0.007	0.010	0.018	0.005
%CV	2.384	3.162	1.036	1.430	2.562	0.722
IC 15% Nominal= (0.6375µg/mL - 0.8625µg/mL)						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 21.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCB de sangre, recién preparada.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado %						
	5.027	8.133	9.467	5.333	5.333	7.600
	8.013	5.067	10.933	8.000	6.933	8.267
	3.600	2.133	9.200	6.533	10.000	6.933
Promedio	5.547	5.111	9.867	6.622	7.422	7.600

**Tabla 22.** Valor obtenido de la muestra MCA en sangre, recién preparada y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCA 8.00 µg/mL	7.950	8.030	8.114	8.030	8.078	8.029
	8.055	8.110	7.976	8.090	8.090	8.062
	7.897	8.052	8.032	8.050	8.050	8.071
Promedio	7.967	8.064	8.041	8.057	8.073	8.054
SD	0.080	0.041	0.069	0.031	0.021	0.022
%CV	1.009	0.512	0.863	0.379	0.254	0.275
IC 15%= (6.8µg/mL - 9.2µg/mL)						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 23.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCA de sangre, recién preparada.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado %						
	0.625	0.375	1.425	0.375	0.975	0.362
	0.687	1.375	0.300	1.125	1.125	0.775
	1.288	0.650	0.400	0.625	0.625	0.887
Promedio	0.867	0.800	0.708	0.708	0.908	0.675

**Resultados de las muestras de sangre almacenadas a 4°C.**

**Tabla 24.** Valor obtenido de la muestra MCB en sangre, almacenada a 4°C y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCB 0.750 µg/mL	0.690	0.714	0.695	0.703	0.677	0.695
	0.705	0.695	0.705	0.71	0.71	0.689
	0.710	0.745	0.691	0.714	0.696	0.702
Promedio	0.702	0.718	0.697	0.709	0.694	0.695
SD	0.010	0.025	0.007	0.006	0.017	0.007
%CV	1.483	3.515	1.035	0.785	2.385	0.936
IC 15% = (0.6375µg/mL - 0.8625µg/mL)						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 25.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCB de sangre, almacenada a 4°C.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado %						
	8.000	4.800	7.333	6.267	5.467	7.333
	6.000	7.333	6.000	5.333	5.333	8.133
	5.333	0.667	7.867	4.800	7.200	6.400
Promedio	6.444	4.267	7.067	5.467	6.000	7.289

**Tabla 26.** Valor obtenido de la muestra MCA en sangre, almacenada a 4°C y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCA 8.00 µg/mL	8.134	8.064	8.113	7.896	8.020	8.010
	8.010	8.059	8.029	8.040	8.080	8.031
	7.954	8.150	8.040	8.050	8.030	8.014
Promedio	8.033	8.091	8.061	7.995	8.043	8.018
SD	0.092	0.051	0.046	0.086	0.032	0.011
%CV	1.147	0.632	0.566	1.078	0.400	0.139
IC 15%= (6.8µg/mL - 9.2µg/mL)						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 27.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCA de sangre, almacenada a 4°C.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado %						
	0.425	0.800	0.162	1.300	0.250	0.125
	0.125	0.737	0.362	0.500	1.000	0.388
	0.575	1.875	0.500	0.625	0.375	0.175
Promedio	0.792	1.138	0.758	0.808	0.542	0.229

**Tabla 28.** Resumen comparativo del IC al 15% de muestras de sangre fresca VS muestras de sangre almacenada a 4 ° C.

Día	Muestras de sangre fresca		Muestras de sangre almacenadas 4°C	
	Cumplen con IC para MCB	Cumplen con IC para MCA	Cumplen con IC para MCB	Cumplen con IC para MCA
0	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓
30	✓	✓	✓	✓
60	✓	✓	✓	✓

**Tabla 29.** Comparativa en porcentaje de desviación de muestras de sangre fresca VS muestras de sangre almacenada a 4 ° C.

<b>Día</b>	<b>Muestras de sangre fresca</b>		<b>Muestras de sangre almacenadas 4°C</b>	
	% Desviación en MCB	% Desviación en MCA	% Desviación en MCB	% Desviación en MCA
<b>0</b>	5.547	0.867	6.444	0.792
<b>3</b>	5.111	0.800	4.267	1.138
<b>7</b>	9.867	0.708	7.067	0.758
<b>15</b>	6.622	0.708	5.467	0.808
<b>30</b>	7.422	0.908	7.422	0.542
<b>60</b>	7.600	0.675	7.289	0.229
<b>Promedio</b>	7.028	0.778	6.326	0.711
<b>% desviación Fresco vs 4°C*</b>	9.988	8.612	-	-

\*Criterio de aceptación %Desviación < 10%

#### 4.6.2 Estabilidad de las muestras de plasma, resultados de las muestras de plasma preparadas el día de cada prueba.

**Tabla 30.** Valor obtenido de la muestra MCB en plasma, recién preparada y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día.	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido ( $\mu\text{g/mL}$ )						
MCB 0.750 $\mu\text{g/mL}$	0.701	0.706	0.701	0.706	0.698	0.701
	0.689	0.711	0.698	0.703	0.702	0.697
	0.704	0.709	0.689	0.705	0.696	0.688
Promedio	0.698	0.709	0.696	0.705	0.699	0.695
SD	0.008	0.003	0.006	0.002	0.003	0.007
%CV	1.137	0.355	0.897	0.217	0.437	0.958
IC 15% = (0.6375 $\mu\text{g/mL}$ - 0.8625 $\mu\text{g/mL}$ )						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 31.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCB de plasma, recién preparada.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado (%)						
MCB 0.750 $\mu\text{g/mL}$	6.533	5.867	6.533	5.867	6.933	6.533
	8.133	5.200	6.933	6.267	6.400	7.067
	6.133	5.467	8.133	6.000	7.200	8.267
Promedio	6.933	5.511	7.200	6.044	6.844	7.289

**Tabla 32.** Valor obtenido de la muestra MCA en plasma, recién preparada y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido ( $\mu\text{g/mL}$ )						
MCA 8.000 $\mu\text{g/mL}$	8.070	8.051	8.080	8.070	8.090	7.896
	7.919	8.093	8.020	8.030	8.035	8.042
	8.052	8.007	8.030	8.040	8.049	8.074
Promedio	8.014	8.050	8.043	8.047	8.058	8.004
SD	0.082	0.043	0.032	0.021	0.029	0.095
%CV	1.029	0.534	0.400	0.259	0.355	1.186
IC 15% = (6.8 $\mu\text{g/mL}$ - 9.2 $\mu\text{g/mL}$ )						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 33.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCA de plasma, recién preparada.

% Desviación del valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado (%)						
MCA 8.000 µg/mL	0.875	0.638	1.000	0.875	1.125	1.300
	1.013	1.163	0.250	0.375	0.438	0.525
	0.650	0.087	0.375	0.500	0.612	0.925
Promedio	0.846	0.629	0.542	0.583	0.725	0.917

**Resultados de las muestras de plasma almacenadas a -80°C.**

**Tabla 34.** Valor obtenido de la muestra MCB en plasma, almacenada a -80°C y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCB 0.750 µg/mL	0.706	0.695	0.686	0.708	0.702	0.707
	0.703	0.698	0.704	0.702	0.708	0.699
	0.705	0.706	0.687	0.706	0.687	0.679
Promedio	0.705	0.700	0.692	0.705	0.699	0.695
SD	0.002	0.006	0.010	0.003	0.011	0.014
%CV	0.217	0.813	1.461	0.433	1.547	2.075
IC 15%= (0.6375µg/mL - 0.8625µg/mL)						
Aprueba	sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 35.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCB de plasma, almacenada a -80°C.

%Desviación valor nominal						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado (%)						
MCB 0.750 µg/mL	5.867	7.333	8.533	5.600	6.400	5.733
	6.267	6.933	6.133	6.400	5.600	6.800
	6.000	5.867	8.400	5.867	8.400	9.467
Promedio	6.044	6.711	7.689	5.956	6.800	7.333

**Tabla 36.** Valor obtenido de la muestra MCA en plasma, almacenada a -80°C y su respectiva comparación con el IC al 15% del valor nominal.

Día	0	3	7	15	30	60
Valor obtenido (µg/mL)						
MCA 8.000 µg/mL	8.060	8.034	8.060	8.050	8.047	8.035
	8.076	8.054	8.090	8.080	8.054	8.030
	8.082	8.033	8.010	8.040	8.089	8.042
Promedio	8.073	8.040	8.053	8.057	8.063	8.036
SD	0.011	0.012	0.040	0.021	0.023	0.006
%CV	0.141	0.147	0.502	0.258	0.279	0.075
IC 15%= (6.8µg/mL - 9.2µg/mL)						
Aprueba	Sí	sí	sí	sí	sí	sí

**Tabla 37.** % de desviación del valor nominal de la muestra MCA de plasma, almacenada a -80°C.

% Desviación valor nominal.						
Día	0	3	7	15	30	60
Valor calculado (%)						
MCA 8.000 µg/mL	0.750	0.425	0.750	0.625	0.588	0.438
	0.950	0.675	1.125	1.000	0.675	0.375
	1.025	0.412	0.125	0.500	1.113	0.525
Promedio	0.908	0.504	0.667	0.708	0.792	0.446

**Tabla 38.** Resumen comparativo del IC al 15% de muestras de plasma fresco VS muestras de plasma almacenados a -80°C.

Día	Muestras de plasma fresco		Muestras de plasma almacenadas a -80°C	
	Cumplen con IC para MCB	Cumplen con IC para MCA	Cumplen con IC para MCB	Cumplen con IC para MCA
0	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓	✓
30	✓	✓	✓	✓
60	✓	✓	✓	✓

**Tabla 39.** Comparativa en porcentaje de desviación muestras de plasma frescas VS muestras de plasma almacenadas a -80°C.

<b>Día</b>	<b>Muestras de plasma fresco</b>		<b>Muestras de plasma almacenadas a -80°C</b>	
	% Desviación en MCB	% Desviación en MCA	% Desviación en MCB	% Desviación en MCA
<b>0</b>	6.933	0.846	6.044	0.908
<b>3</b>	5.511	0.629	6.711	0.504
<b>7</b>	7.200	0.542	7.689	0.667
<b>15</b>	6.044	0.583	5.956	0.708
<b>30</b>	6.844	0.725	6.800	0.792
<b>60</b>	7.289	0.917	7.333	0.446
<b>Promedio</b>	6.637	0.707	6.756	0.671
<b>% desviación Fresco vs -80°C*</b>	1.793	5.090	-	-

\*Criterio de aceptación %Desviación < 10%



#### 4.7 Límite de cuantificación.

En la Tabla 40 se muestran los valores obtenidos al analizar un quintuplicado del LIC y su respectivo CV% y su exactitud.

Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

Valor nominal: 0.250  $\mu\text{g/mL}$

Valor nominal al  $\pm 20\%$  (0.200  $\mu\text{g/mL}$  – 0.300  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabla 40.** Resultados límite de cuantificación del método.

Quintuplicado LIC	
Número de inyección.	Valor obtenido ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0.286
2	0.248
3	0.267
4	0.231
5	0.239
Promedio	<b>0.254</b>
CV%*	<b>8.758</b>

\* Criterio de aceptación <20%.

## 5. Análisis de resultados.

En primera instancia para optimizar y validar un método analítico para la cuantificación de un fármaco en algún fluido biológico, se debe realizar una búsqueda bibliográfica, la cual nos proveerá de información útil para nuestros propósitos, tal como propiedades fisicoquímicas del analito a cuantificar, condiciones de análisis y procesamiento de las muestras, entre otras. Dicha información en nuestro caso se empleó para seleccionar un método, optimizarlo y posteriormente validarlo, tomando como principal característica el tipo de material y compuestos utilizados y que fueron fácilmente accesibles en el laboratorio donde se desarrolló el proyecto.

Para validar un método analítico hay muchas posibles opciones para poder hacerlo, sin embargo en farmacología clínica la norma vigente es la NOM-177-SSA1-2013, "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad", la cual en su apartado 9.1 se hace mención la validación de métodos analíticos para el análisis de muestras biológicas, y que el INP tiene que cumplir como una institución de salud pública.

Así, el primer parámetro evaluado fue la selectividad en el cual al hacer el análisis de 14 fármacos diferentes en combinación con MTX se pudo observar que sólo dos fármacos mostraron una señal medible sin llegar a interferir totalmente en el análisis; estos dos fármacos fueron la ranitidina y el metronidazol. Para la ranitidina el tiempo de retención fue 2.22 minutos y para el metronidazol 4.11 minutos, sabiendo que el MTX obtuvo un tiempo de retención de 4.85 minutos, la diferencia entre la retención del MTX con ranitidina fue 45.77% mientras que para el metronidazol se obtuvo 15.26%. Para interferencia la NOM-177-SSA1-2013 describe que debe ser < 20%, en consecuencia el único fármaco con posibilidad de interferir en nuestra cuantificación es metronidazol, aunque como lo muestra el cromatograma respectivo los picos de ambos analitos se resuelven perfectamente y es posible realizar su integración.

Al analizar las muestras hemolizadas y lipémicas, no se obtuvo alteración en la cuantificación del MTX, por lo que si las muestras presentan estas características podrán ser analizadas sin temor a que pueda interferir su condición en la cuantificación del MTX.

El límite de cuantificación establecido para este método fue de 0.25µg/mL, esto debido a que el propósito de éste método analítico es ser utilizado para obtener información sobre la cantidad remanente de MTX al momento de dar de alta a los pacientes con LLA del INP y evitar posibles efectos adversos debidos a la citotoxicidad del fármaco.

Para establecer este valor se tomó como referencia el libro “Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia”, el cual es una referencia utilizada en el INP para tratamiento de pacientes con LLA, en el cual se indica que la cantidad remanente de MTX para poder dar de alta al paciente debe ser  $<1.0\mu\text{M}$  ( $<0.454\ \mu\text{g/mL}$ ), obteniéndose así con el límite de cuantificación establecido un amplio rango de cuantificación para los pacientes, ya que con este valor se pueden evaluar concentraciones mayores o menores que pudieran estar presentes en las muestras.

Así mismo se realizó el análisis para evaluar el límite de cuantificación establecido en el apartado 9.1 de la NOM-177-SSA1-1998, cumpliendo de igual forma con los criterios de aceptación.

La curva de cuantificación establecida (tabla 3) tuvo un rango de concentraciones de 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50, y 10.00  $\mu\text{g/mL}$ . Los parámetros obtenidos en la evaluación de la concentración-respuesta están representados en las tablas 4 y 5 para el caso de sangre, y las tablas 7 y 8 para el caso de plasma. Estos resultados muestran la asociación lineal directa entre las variables de área y concentración del tipo  $y = mx + b$ , donde el coeficiente de correlación para ambos análisis fue superior a 0.9990, de las 6 curvas de extracción analizadas en sangre y plasma se observa en las tablas 5 y 8 respectivamente que los más de la mitad de las curvas cumplen con el criterio de aceptación en el caso del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración para cada punto de la curva así como con el porcentaje de desviación que también cumplió con el criterio de aceptación, el cual fue  $<20\%$  para el límite inferior de cuantificación y  $<15\%$  para las demás concentraciones de la curva.

Adicionalmente al análisis establecido en la norma para evaluar la linealidad del método, se realizó para cada extracción (sangre y plasma) la prueba de significación estadística de la varianza de la pendiente, en ambos casos se rechazó la hipótesis nula  $H_0: (m=0)$  asimismo el 0 quedó incluido en el intervalo de confianza del término independiente con un 95% de confianza.

Para la evaluación de la precisión; el coeficiente de variación de las 5 réplicas de las concentraciones LIC, MCB, MCM, MCA del ensayo de repetibilidad (tabla 11) fueron de: 12.034% y 11.364% para LIC, 9.205% y 4.416% para MCB, 10.636% y 6.205% para MCM y 6.914% y 5.643% para MCA; para sangre y plasma respectivamente, observando que todas las muestras cumplen con el criterio de aceptación el cual es:  $<20\%$  para LIC y  $<15\%$  para MCB, MCM, MCA.

En el caso de reproducibilidad se analizaron por quintuplicado (tabla 12 y 13), las muestras control: LIC, MCB, MCM, MCA durante tres días diferentes obteniendo los siguientes resultados de porcentaje de coeficiente de variación para sangre y plasma respectivamente: LIC: 8.740% y 7.088%, MCB: 12.066% y 6.938%, MCM: 6.803% y 1.058% y MCA: 4.668% y 4.282%. Los cuales como se observa en la tabla 14 cumplen con el criterio de aceptación estipulado en la norma.

Los datos de exactitud se observan en las tablas 15 y 17 para sangre y, tablas 16 y 18 para plasma. Los datos obtenidos como se observa en ambos casos cumplieron con los criterios de aceptación obteniendo para sangre y plasma valores promedio de porcentaje de desviación menor al 15%.

El recobro no es necesario realizarlo acorde a la norma vigente pero se realizó obteniéndose un recobro de: 53.098% para el caso de sangre y 70.227 para plasma, con coeficientes de variación menores al 10%, lo que nos muestra que los valores de recobro fueron reproducibles y repetibles.

Como se puede observar en el cuadro 3 el recobro de nuestro método se encuentra dentro de los valores reportados en la bibliografía consultada, tomado en cuenta que no se utilizó derivatización en nuestro método.

Se analizó el análisis de estabilidad de las muestras procesadas de sangre a una temperatura de 4°C y para plasma a una temperatura de -80°C temperaturas establecidas por el tipo de almacenamiento de las muestras dentro del instituto, se analizaron un total de 3 muestras de las muestras control MCB y MCA durante un periodo de 0, 3, 7, 15, 30 y 60 días vs muestras MCB y MCA preparadas el mismo día del análisis, esto con el fin de comparar los resultados obtenidos y determinar si las muestras son estables durante el periodo de tiempo estudiado.

Como se observa en las tablas 28 y 38 los resultados obtenidos indican que se cumplió con los criterios de aceptación establecidos en la norma ya que todas las muestras entraron dentro del IC del 15% del valor nominal.

Las tablas 29 y 39 nos muestran de manera comparativa los resultados del % de desviación y el valor promedio de éste, pudiéndose observar que tal y como menciona la norma no hay una diferencia mayor al 10% entre las muestras frescas y las muestras evaluadas durante el ensayo de estabilidad, lo que se traduce en que las muestras fueron estables durante todo el periodo de prueba.

A continuación se muestra una tabla comparativa sobre los métodos de cuantificación de MTX en sangre y plasma por la técnica de HPLC UV-Vis reportados y el método optimizado y validado en el laboratorio de farmacología del INP.

<b>Autor.</b>	<b>Volumen muestra.</b>	<b>Tiempo retención.</b>	<b>% recobro.</b>
Alex Sparreboom*, Walter J. Loos, Kees Nooter, Gerrit Stoter, Jaap Verweij. <sup>20</sup>	1000µL	9.3 minutos.	No mencionado.
Thierry Dervieux, Diana Orentas Lein, John Marcelletti, Ken Pischel, Katie Smith, Michael Walsh, and Russell Richerson. <sup>21</sup>	100µL	12.5 minutos.	60 – 80%.
Abdolhosein Moghbel*, Ahmad Zand-Moghaddamb, Saeid Rezaee, Mohamad Pedramc. <sup>22</sup>	200µL	4.44 minutos.	61.5-72.7%.
TARA P. ASSADULLAHI*, ELIF DAGLI and JOHN O. WARNER. <sup>23</sup>	500µL	14.7 minutos.	<70%.
Método validado en INP.	200µL	4.85 minutos.	54.34-67.81%.

## 6. Conclusiones.

La validación es una forma de garantizar que un método analítico utilizado funciona tal para lo que fue diseñado; con esto se asegura que los resultados que obtengamos al utilizarlo serán confiables.

La leucemia linfoblástica aguda infantil es un problema de salud muy importante en México; ya sea por el número de defunciones que conlleva cada año o el costo total de su tratamiento en instituciones de salud pública, es por eso que se validó e implementó un método de análisis para la cuantificación de MTX en sangre y plasma con el cual se podrán monitorear los niveles del fármaco y así evitar posibles intoxicaciones en los pacientes que reciben el tratamiento, resultando así en una disminución en el costo de la quimioterapia y una mayor seguridad al paciente.

Con los resultados obtenidos se afirma que se optimizó y validó un método por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que permite la cuantificación de metotrexato presente en sangre y plasma de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda del INP, resultando el mismo ser; selectivo, preciso y exacto además de que nos permite almacenar las muestras hasta por 2 meses antes de su análisis cuestión útil en caso de que algún insumo necesario para el análisis o fallas en el equipo impidan su procesamiento de manera inmediata después de la toma.

Cabe señalar que el método desarrollado es hasta el momento el único para determinar Metotrexato en sangre y plasma en el INP; con lo que se buscó su validación para obtener resultados confiables y útiles para evitar citotoxicidad en los pacientes con LLA del INP además de que se acorta con ello el tiempo de espera de resultados por parte de un laboratorio tercero; que es como anteriormente se determinaba el nivel de éste fármaco en sangre y plasma.

Un punto importante es que se desarrolló y validó un método microvolumétrico empleando únicamente 200  $\mu$ L de fluido biológico, algo que es de suma relevancia cuando se trata de cuantificar fármacos en pacientes pediátricos.

## **7. Perspectivas.**

El presente trabajo permitió desarrollar métodos analíticos para cuantificar metotrexato en volúmenes de 200  $\mu$ L de fluido biológico con un recobro total de 55-70%, una perspectiva al proyecto es optimizar el proceso de extracción para ser capaces de utilizar 100  $\mu$ L de fluido y aumentar el porcentaje de recobro, como podría ser la precipitación de proteínas con ácido percloracético.

Estudiar los posibles factores de respuesta que afectan la recuperación así como evaluar el uso de la derivatización para la cuantificación del MTX.

Así mismo, este trabajo es parte integral de un proyecto de investigación que pretende correlacionar los niveles de fármaco en sangre, plasma y leucocitos con variantes de un solo nucleótido (SNPs) en genes del metabolismo del metotrexato, por lo cual es necesario continuar con un método para cuantificar los niveles intraleucocitarios del analito.

## 8. Referencias.

1. Fred Hutchinson, Acute Lymphoblastic Leukemia Cancer Research Center, The Leukemia and Lymphoma Society, <http://www.fhcrc.org/en/diseases/leukemia/acute-lymphoblastic-leukemia.html> (fecha de consulta 22-Noviembre-2013).
2. Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento, Seguro Popular, México.
3. Asselin B, Shuster J, Amylon M, et al.: Improved event-free survival (EFS) with high dose methotrexate (HDM) in T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) and advanced lymphoblastic lymphoma (T-NHL): a Pediatric Oncology Group (POG) study. Proceedings of the American Society of Clinical Oncology A-1464, 2001.
4. Sistema nacional de información en salud, SINAIS, SSA. 2001.
5. Uderzo C, Conter V, Dini G, et al.: Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica* 2001; 86(1): 1-7.
6. De Jonge R, Tissing WJ, Hooijberg JH, et al.: Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 113 (10): 2284-9, 2009.
7. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al.: Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41 (9): 1006-10, 2009
8. Treviño LR, Yang W, French D, et al.: Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41 (9): 1001-5, 2009
9. Rivera Luna R. Editor. Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia. 374 pp. Impreso en México ISBN 978-607-7817-10-9, 2010.
10. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. *Immunopharmacology* 2000; 47:247-257.
11. Chan E, Cronstein B. Molecular action of Methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research* 2002; 4 (4):266-73.
12. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, Genovese MC, Wasko MC, Moreland LW, Weaver AL, Markenson J, Finck BK. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *NEngl J Med* 2000; 343:1586-1593.
13. Swierkot J, Szechinski J. Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacological Reports* 2006; 58:473-492.
14. NOM-177-SSA1-2013, "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad". México, 2013.



15. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W (1989). "Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects". *Journal of the American Medical Association* 262 (20): 2847-2852.
16. Lehninger AL. Vitaminas y coenzimas. En: *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2 ed. Barcelona: Ediciones Omega; 1978:352-4.
17. [http://www.druglib.com/druginfo/methotrexate/description\\_pharmacology/](http://www.druglib.com/druginfo/methotrexate/description_pharmacology/)
18. Practical HPLC method development Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirlland and Joseph L. Glach ISBN 0-471-00703 John Wiley and Sons Inc
19. Lennard L. Therapeutic drug monitoring of antimetabolic cytotoxic drugs *Br J Clin Pharmacol*. 1999;47(2):131-43
20. Sparreboom A, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Verweij J, Liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of methotrexate in cancer patients co-treated with docetaxel, *Journal of Chromatography B*, 735 (1999) 111-119.
21. Thierry Dervieux, Diana Orentas Lein, John Marcelletti, Ken Pischel, Katie Smith, Michael Walsh, and Russell Richerso, HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem*, 2003 Oct;49(10):1632-41.
22. Moghbel A, Moghaddam A, Rezaee S, Pedram M, High-Performance Liquid Chromatography Determination of Methotrexate in Plasma, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2003) 149-152.
23. TARA P. ASSADULLAHI, ELIF DAGLI and JOHN O. WARNER, High-performance liquid chromatography method for serum methotrexate levels in children with severe steroid-dependent asthma. *J, Chromatography*, 1991 Apr 19; 565(1-2):349-56.



## 9. ANEXO I:

### Carta de consentimiento informado

Yo C. \_\_\_\_\_ doy fe que he sido informado(a) e invitado(a) a participar en el protocolo: **“Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda”**, el cual está enfocado en conocer la cantidad del fármaco metotrexato presente en el paciente después de haber sido administrado para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda; así mismo, busca identificar componentes genéticos que afectan la cantidad de fármaco y su eficacia.

He sido notificado que el estudio ha sido aprobado por los Comités de Investigación y de Ética del INP con número de registro 085/2011. Me han informado que para el estudio es necesaria la toma de 5 mL de sangre el día en el que se administre el metotrexato y las tomas de rutina para medir el medicamento.

Me indicaron que las tomas realizadas a las 0, 2, 24 y 36 h forman parte del tratamiento y se requieren para medir la cantidad de metotrexato en forma rutinaria como se especifica en los protocolos de atención. He sido informado que una de las muestras se usará para obtener el material genético (ADN), el cual será utilizado para el análisis genético. Me indicaron que **el ADN sólo será usado para este estudio** y almacenado por 2 años para posteriormente eliminarlo. Se me comunicó que las tomas de muestra serán realizadas por personal capacitado y que la punción venosa es de **riesgo mínimo** de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud (Artículo 17).

Entiendo que mi participación en el estudio es **voluntaria** y **no tendrá costo**. Declaro que **no recibiré pagos** o bonificaciones por participar en el proyecto. Soy **libre de retirarme** del estudio en cualquier momento y sin que esto tenga consecuencia alguna.

Los investigadores responsables se han comprometido a manejar la información en forma confidencial los resultados del estudio y a proteger la identidad de mi hijo(a). He leído y entendido todo lo antes escrito, los investigadores me han dado información suficiente y han resuelto mis dudas y me han indicado que están en la disposición de responder todas las que tenga durante el avance del proyecto.

Por lo anterior doy mi conformidad para que mi hijo(a) participe en este estudio.

### Firmas

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Padre o Tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la Madre o Tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo no. 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo no.2

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Investigador responsable

\_\_\_\_\_  
Fecha

Responsables: Dr. Juan Luis Chávez Pacheco Ext. 1426    Dr. Martín Pérez García Ext.  
QFB. Francisco Juárez Nicolás Ext. 1655                      QFB. Hugo Juárez Olguín Ext. 1428



## 10. ANEXO II.

### Carta de asentimiento informado.

Yo C. \_\_\_\_\_ en mi calidad de paciente del Instituto Nacional de Pediatría declaro que he sido invitado a participar en el protocolo **Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda**, el cual está enfocado en conocer la cantidad del fármaco metotrexato presente en el paciente después de haber sido administrado para el tratamiento de la leucemia; así mismo, busca identificar componentes genéticos que afectan la cantidad de fármaco y su eficacia.

Me informaron que mi participación implica la toma de 5 mL de sangre en el día que acuda a quimioterapia y las que son necesarias después de que me inyecten el medicamento y se utilizan para medir la cantidad de medicamento que hay en mi cuerpo.

El investigador me indicó que en las muestras se medirá la cantidad de metotrexato y se obtendrá mi material genético (DNA) para los objetivos de este estudio. Mi DNA solo se usará para este estudio y después de 2 años lo eliminarán. Me explicaron que la obtención de sangre será hecha por enfermeras y/o personal capacitado y que esto es de **bajo riesgo** para mí.

He sido informado de que mi participación es **voluntaria** y mis papás **no deberán pagar nada** por este estudio. Soy **libre** de retirarme del proyecto en el momento que lo decida sin que esto afecte mi tratamiento. Declaro que **no recibiré pago** o beneficio alguno por mi participación.

Los investigadores responsables se han comprometido a manejar los resultados del estudio en forma confidencial y a proteger mi identidad. He leído y entendido todo lo antes escrito, los investigadores me han dado información suficiente y han resuelto mis dudas y me han indicado que están en la disposición de responder todas las que tenga durante el avance del proyecto.

### Firmas

\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Padre o Tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de la Madre o Tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo no. 1

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo no.2

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del Investigador responsable

\_\_\_\_\_  
Fecha

Responsables: Dr. Juan Luis Chávez Pacheco Ext. 1426    Dr. Martín Pérez García Ext. QFB. Francisco Juárez Nicolás Ext. 1655    QFB. Hugo Juárez Olguín

## 11. ANEXO III.

### Oficio de donación para uso en investigación clínica.



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

México D. F. a 27 de Septiembre de 2013.

**Dra. Dinora Aguilar Escobar.**  
**Jefe del Banco de Sangre**  
**Presente.**

Por medio de la presente me permito solicitar a usted un concentrado de linfocitos (buffy coat) y una unidad de sangre total (sin procesar), la cual contenga todos los componentes celulares.

Este paquete celular se utilizará para desarrollar un método de cuantificación del fármaco metotrexato en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, proyecto vigente 085/2011 y para ifosfamida, proyecto 068/2013, ambos aprobados por los Comités de Ética e Investigación de nuestro instituto.

El buffy coat que se nos otorgue puede ser de cualquier tipo sanguíneo, entendemos que es el desecho de la obtención de plasma, por lo que acudiremos en el momento que el equipo de Banco de Sangre haga este proceso y, se requiera de recoger el concentrado celular para garantizar la viabilidad de las células. El paquete de sangre se utilizará para determinar ifosfamida en gota de sangre seca, un método menos invasivo para los pacientes con tumores sólidos.

Agradezco la atención que se sirva dar a la presente, sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente.

Dr. Juan Luis Chávez Pacheco  
Jefe del Laboratorio de Farmacología.  
Instituto Nacional de Pediatría

Torre de Investigación Dr. Joaquín Cravioto

Laboratorio de Farmacología

México D. F. a 13 de Febrero de 2013



Dra. Dinora Aguilar Escobar

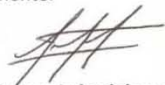
Jefe del Banco de Sangre

Presente.

Por medio de la presente me permito solicitar a usted 2 bolsas de plasma y 1 de sangre total sin fraccionar, con la finalidad de realizar curvas de calibración en fluidos biológicos para la validación de métodos analíticos, con el fin de medir niveles plasmáticos de medicamentos de mas uso en la práctica pediátrica.

Agradezco la atención que se sirva dar a la presente, sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente.



Dr. en C. Juan Luis Chávez Pacheco

Jefe del Laboratorio de Investigación.

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA  
RECEBIDA  
FEB 13 2013  
ALBUQUERQUE