



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas para cuantificar metotrexato en leucocitos humanos.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

ZAIRA XOCHIQETZAL GONZÁLEZ VENICIO



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:	Nuria Esturau Escofet	_____
VOCAL:	Juan Manuel Juárez González	_____
SECRETARIO:	Juan Luis Chávez Pacheco	_____
1er. SUPLENTE:	Carolina Flores Ávila	_____
2° SUPLENTE:	Alejandro Alfaro Romero	_____

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:

Zaira Xochiquetzal González Venicio.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	1
1. INTRODUCCIÓN	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. Generalidades	8
3.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	10
3.1.2. Epidemiología	10
3.1.3. Etiología	13
3.1.4. Etiopatogenia	13
3.1.5. Manifestaciones clínicas	14
3.1.6 Diagnóstico.....	15
3.1.7. Tratamiento	16
3.1.8 Toxicidad del tratamiento	18
3.2 METOTREXATO.....	19
3.2.1 Estructura.....	19
3.2.3. Propiedades fisicoquímicas	20
3.2.4. Mecanismo de acción	20
3.2.3. Farmacocinética	23
3.2.3.1. Absorción.....	23
3.2.3.2. Distribución.....	23
3.2.3.3. Metabolismo.....	23
3.2.3.4. Excreción.....	24
3.2.4. Resistencia al fármaco	24
3.2.5. Efectos adversos	24
3.3. LEUCOCITOS	25
3.3.1 Características generales de los leucocitos	25
3.3.1.1. Tipos de leucocitos	25
3.3.1.2. Concentraciones de diferentes leucocitos en la sangre	26
3.3.2. Génesis de los leucocitos	26

3.4. CULTIVOS CELULARES	27
3.4.1. Medio de cultivo	27
3.4.2. Células MCF-7	27
3.4.3. Contadores de células	28
3.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	29
3.5.1 Fundamento	29
3.5.2. El espectrómetro de masas	31
3.5.2.1 Entrada de la muestra	33
3.5.2.2. Fuente de iones.....	34
3.5.2.2.1. Impacto electrónico o ionización electrónica (Electron Impact EI).....	34
3.5.2.2.2. Ionización química (Chemical Ionization CI)	35
3.5.2.2.3. Ionización de campo (Field ionization FI)	35
3.5.2.2.4. Desorción de campo (Field desorption FD).....	36
3.5.2.2.5. Bombardeo con átomos rápidos (Fast-Atom Bombardment FAB)	36
3.5.2.2.6. Ionización por electrospray (Electrospray ionization ESI).....	37
3.5.2.3. Analizadores de masas	38
3.5.2.3.1. Analizador magnético.....	38
3.5.2.3.2. Analizador de masas de cuadrupolo	39
3.5.2.3.3. Analizador de tiempo de vuelo (Time-of-flight TOF)	40
3.5.2.3.4. Analizador de trampa de iones.....	41
3.5.2.4. Detectores	42
3.5.2.4.1. Caja de Faraday.....	42
3.5.2.4.2. Multiplicador de electrones.....	42
3.5.2.4.3. Detector Daly	42
1.5.2.4.4. Detector de microcanales.....	43
3.5.3. Espectrometría de masas en tándem.	44
3.5.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)	45

3.5.4.1. UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)	46
3.6. Validación de métodos analíticos.....	47
3.6.1. Definición	47
3.6.2. Parámetros de calidad.....	47
4. PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1. Equipos.....	49
4.2. Material biológico.....	49
4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO 4.3.1 Cultivo de células MCF-7.	49
4.3.2. Conteo de células en cámara de Neubauer.....	50
4.3.3. Separación de leucocitos por el método de ficoll (en campana de flujo laminar).	51
4.3.3. Cinética del metotrexato en leucocitos.	51
4.3.4. Cuantificación de metotrexato en leucocitos.	52
5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	53
5.1. Condiciones de “tuning” o sintonización.	53
5.2. Condiciones cromatográficas.....	54
5.3. Especificaciones espectrométricas.....	55
5.4. Preparación de soluciones y reactivos.....	56
5.5. Técnica extractiva: Líquido-Líquido	57
5.6. Curva de calibración y puntos control	58
5.7. Desempeño del sistema	58
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	59
6.1. Selectividad	60
6.2. Efecto de la matriz para métodos por espectrometría de masas	60
6.3. Efecto de acarreo o arrastre para métodos por espectrometría de masas	61
6.4. Límite inferior de cuantificación	63
6.5. Curva de calibración.....	64
6.6. Precisión.....	66
6.6.1. Repetibilidad.....	67
6.6.2. Reproducibilidad	68
6.7. Exactitud.....	69
6.8. Recobro absoluto.....	70

6.9. Estabilidad de la muestra	72
6.9.1 Estabilidad a corto plazo	73
6.9.2. Estabilidad a largo plazo	74
6.9.3. Estabilidad de la muestra procesada	75
6.9.4. Estabilidad en el automuestrador	76
6.9.5. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación	77
6.10. Resultados cinética del metotrexato en leucocitos.	78
6.11. Resultados cuantificación de metotrexato en leucocitos.	80
6.12. Resultados cuantificación de Metotrexato en muestra de paciente por UPLC-MS/MS.....	82
7. CONCLUSIONES	83
8. PERSPECTIVAS.....	84
9. REFERENCIAS	85

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la enfermedad maligna más común en niños, ya que representa el 77% de los casos de leucemia infantil. Debido a ello se busca optimizar el tratamiento con metotrexato por medio de su cuantificación dentro de la célula blanco; los leucocitos. La cuantificación se llevará a cabo por medio de un sistema de Cromatografía de Líquidos de Ultra Eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) debido a su alta sensibilidad, selectividad y eficiencia.

El desarrollo del método se basó en el artículo “*Simultaneous determination of methotrexate and its polyglutamate metabolites in Caco-2 cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).*” (1), en el cual se realiza la cuantificación del metotrexato dentro de células de cáncer de colon, por medio de LC-MS/MS.

La aplicación de un estándar interno se considera de gran ventaja para los métodos analíticos, especialmente en la extracción líquido-líquido. Entre los métodos con un estándar interno para el metotrexato, se utiliza teofilina, 8-cloroteofilina, aminopterina o el d-3-metotrexato, un metabolito del metotrexato. Sin embargo, el d-3-metotrexato es extremadamente costoso. La teofilina se utilizó en un estudio (Mo X., *et al.*, 2012) mostrando interferencias al eluirse. Por lo que se optó por Ifosfamida como estándar interno, ya que se cuenta con el reactivo grado USP en el laboratorio de Farmacología, sin embargo se debe de descartar que el paciente esté siendo tratado con este fármaco. Otro punto a favor fue que demostró tener un tiempo de retención apropiado y alta especificidad.

Se utilizó acetonitrilo (ACN) al 100%, un disolvente orgánico ampliamente utilizado en cromatografía de líquidos como fase móvil, para disolver el metotrexato y después de la centrifugación recuperarlo en la fase orgánica, dejando en la fase acuosa los compuestos que pudieran interferir en la cuantificación.

Las características de desempeño evaluadas en la validación del método analítico así como los criterios de aceptación y rechazo se basaron en la norma oficial mexicana vigente NOM-177-SSAI-2013, que en el apartado 9.1 se refiere a “Validación de métodos analíticos”.

Los leucocitos que se utilizarían para realizar la validación, se obtendrían a partir de cultivos celulares, determinando las condiciones óptimas del cultivo de leucocitos para su posterior propagación. Sin embargo, debido a problemas con la obtención de reactivos indispensables para la propagación de los mismos, no se lograron obtener cantidades adecuadas y se tuvo que utilizar otra matriz biológica, la cual se pudiera encontrar en grandes cantidades, como son las células MCF-7.

Para las pruebas de cuantificación, los leucocitos que se utilizaron para el estudio se obtuvieron de voluntarios sanos y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 en incubación a una temperatura de 37°C con 5% de CO₂.

Por último se realizó el análisis de la muestra de un paciente, cuantificando la concentración de metotrexato contenida en el plasma, en la sangre y en los leucocitos.

2. OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- ✓ Validar un método para cuantificar metotrexato dentro de leucocitos humanos por medio de UPLC-MS/MS.

- **Objetivos particulares**

- ✓ Establecer las condiciones óptimas para el cultivo de leucocitos humanos para su posterior propagación en un medio adecuado.
- ✓ Desarrollar un método para realizar la extracción de metotrexato a partir de los leucocitos.
- ✓ Cuantificar por medio de un método analítico por UPLC-MS/MS el metotrexato obtenido de los leucocitos.
- ✓ Validar el método desarrollado utilizando las células MCF-7 como matriz biológica alternativa para la cuantificación del metotrexato.

3. Generalidades

Las leucemias se pueden definir como un grupo de enfermedades malignas en las que, trastornos genéticos de una determinada célula hematopoyética, dan lugar a una proliferación clonal no regulada de células, como se muestra en la figura 1. La progenie de estas células muestra una ventaja de crecimiento sobre los elementos celulares normales debido a su mayor velocidad de proliferación y a la menor incidencia de apoptosis espontánea o por ambos mecanismos. La consecuencia es una interrupción de la función medular normal y, en último término, una insuficiencia medular. Las características clínicas, los hallazgos de laboratorio y la respuesta al tratamiento varían en función al tipo de leucemia. (2)

Las leucemias son las neoplasias malignas más frecuentes en la infancia y representan un 41% del total diagnosticado en niños menores de 15 años.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa el 77% de los casos de leucemia infantil, la mieloide aguda (LMA) un 11%, la mieloide crónica (LMC) un 2-3% y la mieloide crónica juvenil (LMCJ) un 1-2%. El resto de los casos son un conjunto de leucemias agudas o crónicas que no se ajustan a las definiciones de LLA, LMA, LMC o LMCJ.

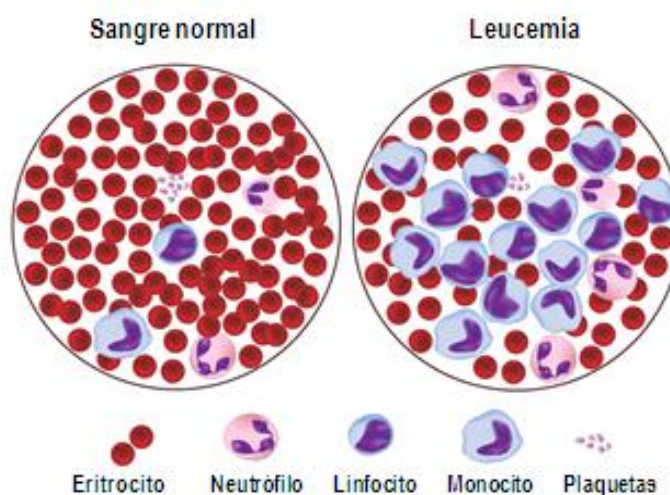


Figura 1. Muestra de sangre de una persona sana (izquierda) y de una persona con leucemia (derecha).

Las leucemias se dividen en dos tipos generales: *leucemias linfocíticas* y *leucemias mieloides*, dependiendo del tipo celular (figura 2). Las leucemias linfocíticas se deben a la producción neoplásica de células linfoides, que habitualmente comienzan en un ganglio linfático u otro tejido linfático y que se extienden a otras zonas del cuerpo. El segundo tipo de leucemia, la leucemia mieloide, comienza con la producción cancerosa de células mielógenas jóvenes en la médula ósea y después se extienden a otras zonas del cuerpo, de manera que los leucocitos se producen en muchos tejidos extramedulares, en especial en los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado. (6)

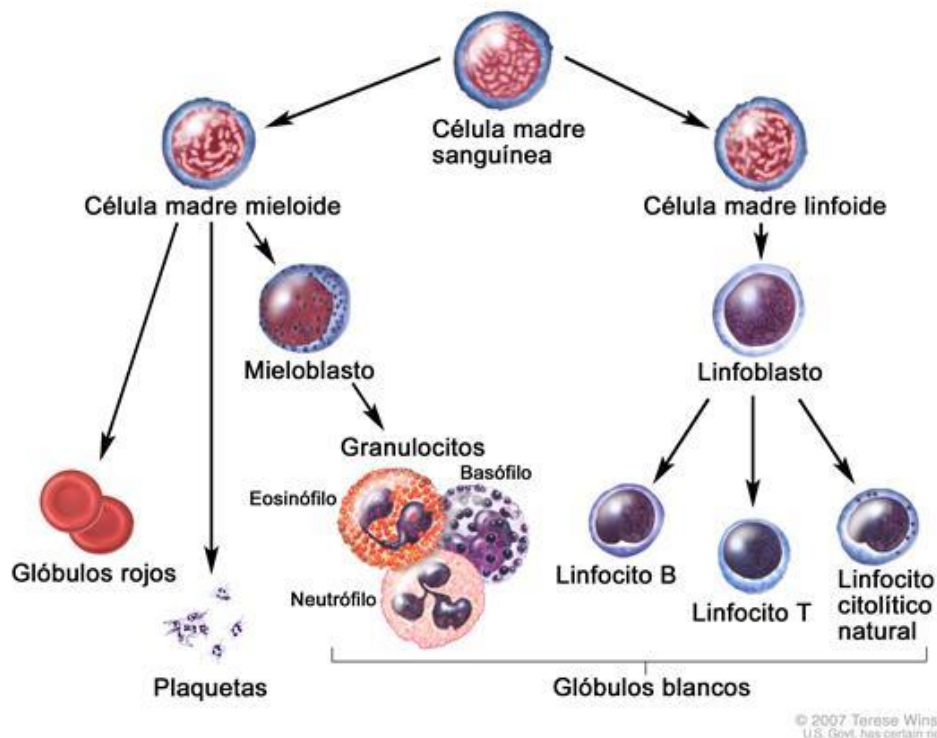


Figura 2. Evolución de una célula madre sanguínea (recuperado de http://www.cancer.gov/espanol/tipos/mieloproliferativas/paciente/tratamiento-mielodisplasicos-pdq#section/_1).

3.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia linfocítica aguda también denominada leucemia linfática aguda o leucemia linfoblástica aguda comprende un grupo de neoplasias malignas que afectan los precursores (blastos) de los linfocitos en la médula ósea. La mayoría son tumores de células progenitoras precursoras de linfocitos B (pre-B) aunque ocasionalmente se manifiestan LLA de células precursoras de linfocitos T (pre-T). En los niños, las leucemias agudas son la causa más frecuente de muerte por neoplasia. (3)

La LLA infantil ha representado el modelo de neoplasia para determinar los principios de diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer, siendo ésta la que se presenta en un mayor porcentaje.

3.1.2. Epidemiología

Es una enfermedad multifactorial con componentes genéticos y ambientales; algunas anomalías cromosómicas, alteraciones genéticas; así como la exposición a diferentes sustancias químicas, fármacos, virus y a la radiación pueden desencadenar los mecanismos para el desarrollo de leucemia en algunos individuos. (4)

El cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial. Cada año, más de 160,000 menores de 20 años son diagnosticados con cáncer en países desarrollados en donde 3 de cada 4 niños sobreviven al menos 5 años después de iniciar su tratamiento, a diferencia de los países en vías de desarrollo en los cuales los decesos superan la mitad de los pacientes ($\approx 60\%$). (5)

En México, la incidencia anual de cáncer infantil es aproximada a 7,000 casos y sólo 1,500 de estos cuentan con seguridad social, dichos casos incidentes, sumados a los prevalentes, hacen que anualmente cerca de 18,000 niños y adolescentes requieran atención oncológica, de los cuales 10,000 corresponden a la población sin seguridad social. En la tabla 1 se muestra el porcentaje de casos

de cáncer en menores de 20 años reportados del 2005-2010. Los tratamientos para padecimientos como las neoplasias malignas tienen un alto costo; la leucemia por ejemplo, cuyo tratamiento ideal es el trasplante de médula ósea, en promedio cuesta 250 mil dólares americanos (aproximadamente \$4,000,000.00 pesos/paciente).

El rezago socio-económico que sufre gran parte de la población de nuestro país es factor determinante para que dos terceras partes de los niños con leucemia no cuenten con un diagnóstico oportuno o un tratamiento eficaz. Un diagnóstico oportuno y certero salvaría la vida del 90% de los niños.

La tercera parte de los casos con cáncer detectados en Europa, Asia y América, corresponden a Leucemia linfoblástica aguda, seguidos por los tumores del Sistema Nervioso Central y Linfomas.

Esta enfermedad afecta con mayor frecuencia a niños con determinados trastornos cromosómicos, como el síndrome de Down, síndrome de Bloom, ataxia-telangiectasia y síndrome de Franconi.

Tabla 1. Casos de cáncer en menores de 20 años, según el tipo histológico del tumor. Unidades médicas acreditadas. Secretaría de Salud, 2005-2010.

Tipo histológico*	Casos	%
I. Leucemia	691	30.0
II. Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales	394	17.1
III. Tumores del Sistema Nervioso Central	274	11.9
IV. Tumores del Sistema Nervioso Simpático	79	3.4
V. Retinoblastoma	93	4.0
VI. Tumores renales	137	5.9
VII. Tumores hepáticos	40	1.7
VIII. Tumores óseos	189	8.2
IX. Sarcomas de tejidos blandos	158	6.9
X. Tumores de células germinales	161	7.0
XI. Carcinomas y otras neoplasias epiteliales	26	1.1
XII. Neoplasias inespecíficas	61	2.6
Subtotal	2,303	100.0
S/D	1,266	35.5
Total	3,569	100.0

Fuente: CENAVECE/DGAE/RCNA, 2005-2010

*Según Clasificación Internacional de Cáncer en la Niñez

Tabla 2. Principales causas de mortalidad en edad preescolar (de 1 a 4 años), 2009. Nacional.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	5 720	73.6	100.0
1	A00-A09	Enfermedades infecciosas intestinales	460	5.9	8.0
2	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	448	5.8	7.8
3	2/	Accidentes de vehículo de motor	425	5.5	7.4
4	Q20-Q24	Malformaciones congénitas del corazón	391	5.0	6.8
5	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	291	3.7	5.1
6	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	234	3.0	4.1
7	C91-C95	Leucemia	189	2.4	3.3
8	G40-G41	Epilepsia	102	1.3	1.8
9	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	84	1.1	1.5
10	W00-W19	Caídas accidentales	60	0.8	1.0

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050 y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

Tabla 3. Principales causas de mortalidad en edad escolar (de 5 a 14 años), 2008. Nacional.

Orden	Clave CIE 10a. Rev.	Descripción	Defunciones	Tasa ^{1/}	%
	A00-Y98	Total	6,565	30.4	100.0
1	2/	Accidentes de vehículo de motor	878	4.1	13.4
2	C91-C95	Leucemia	574	2.7	8.7
3	W65-W74	Ahogamiento y sumersión accidentales	317	1.5	4.8
4	X60-X84, Y87.0	Lesiones autoinfligidas intencionalmente (suicidios)	191	0.9	2.9
5	X85-Y09, Y87.1	Agresiones (homicidios)	189	0.9	2.9
6	Q20-Q24	Malformaciones congénitas del corazón	184	0.9	2.8
7	N00-N19	Nefritis y nefrosis	170	0.8	2.6
8	J10-J18, J20-J22	Infecciones respiratorias agudas bajas	145	0.7	2.2
9	E40-E46	Desnutrición calórico protéica	112	0.5	1.7
10	G40-G41	Epilepsia	111	0.5	1.7

^{1/} Tasa por 100,000 habitantes

Fuente: Secretaría de Salud/Dirección General de Información en Salud. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones 1979-2008 INEGI/SS y de las Proyecciones de la Población de México 2005 - 2050, y proyección retrospectiva 1990-2004. CONAPO 2006.

3.1.3. Etiología

La etiología de LLA se desconoce en casi todos los casos, aunque se han relacionado con ella varios factores genéticos. Se ha relacionado la exposición intraútero o durante la infancia a radiaciones con fines diagnósticos con una mayor incidencia de LLA. En determinados países en desarrollo, existe una asociación entre la infección por el virus de Epstein-Barr y la LLA de células B.

Tabla 4. Factores que predisponen a la leucemia infantil.

TRASTORNOS GENÉTICOS	FACTORES AMBIENTALES
Síndrome de Down	Radiación ionizante
Síndrome de Fanconi	Fármacos
Síndrome de Bloom	Alquilantes
Anemia de Blackfan-Diamond	Nitrosurea
Síndrome de Schwachman	Epipodofilotoxina
Síndrome de Klinefelter	Exposición al benceno
Síndrome de Turner	Edad avanzada de la madre
Neurofibromatosis tipo 1	
Ataxia-telangiectasia	
Inmunodeficiencia combinada grave	
Hemoglobinuria paroxística nocturna	
Síndrome de Li-Fraumeni	

3.1.4. Etiopatogenia

La clasificación de la LLA depende de la caracterización de las células malignas en la médula ósea dependiendo de su morfología, su fenotipo, las características de sus marcadores de membrana y sus rasgos moleculares y citogenéticos. Desde el punto de vista del fenotipo, los marcadores de superficie muestran que cerca de un 85% de las LLA deriva de progenitores de las células B, un 15% deriva de las células T y un 1% deriva de las células B. La mayoría de los pacientes con LLA presenta alteraciones cromosómicas que

puede relacionarse con el número de cromosomas o ser translocaciones o deleciones y aportan una información pronostica importante.

3.1.5. Manifestaciones clínicas

La LLA suele presentarse de forma inespecifica y relativamente rápida. Con frecuencia están presentes los siguientes síntomas:

- Anorexia
- Fatiga
- Irritabilidad
- Dolor óseo o, menos frecuentemente articular, sobre todo en las extremidades inferiores.
- A menudo, los pacientes refieren antecedentes de una infección respiratoria de vías altas en los 1-2 meses previos.

A medida que la enfermedad progresa, aparecen signos y síntomas obvios de insuficiencia medular, como:

- Palidez
- Fatiga
- Aparición de hematomas o epistaxis
- Fiebre, que puede deberse a la presencia de una infección.

La LLA de células pre-B primitivas (CD10⁺ o CALLA⁺) es el inmunofenotipo más frecuente, con un inicio entre el año y los 10 años de edad. La mediana del recuento leucocitario en el diagnóstico es de 33,000, aunque el 75% de los pacientes tienen recuentos <20,000; existe trombopenia en 75% de los pacientes y hepatoesplenomegalia en 30-40% de los pacientes. En todos los tipos de leucemia, existen síntomas del Sistema Nervioso Central (SNC) en el momento del diagnóstico en 5% de los pacientes, un 10-20% tienen blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Existe afectación testicular (20%) y ovárica (30%) pero no requieren biopsia.

3.1.6 Diagnóstico

Se debe sospechar de una LLA ante la existencia de datos sugestivos de insuficiencia medular en la sangre periférica. Cuando un análisis periférico sugiere una posible leucemia, se debe realizar de inmediato un estudio de médula ósea para confirmar el diagnóstico. Por lo general basta con un aspirado medular, aunque a veces es necesaria una biopsia de médula ósea.

La LLA se diagnostica cuando se demuestra que más del 25% de las células maduras corresponden a una población homogénea de linfoblastos. La estadificación de esta enfermedad se apoya parcialmente en un estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR). Cuando se identifiquen linfoblastos y el recuento de leucocitos en LCR sea superior a los valores normales, se podrá diagnosticar infiltración del sistema nervioso central (SNC) o meníngea por la leucemia. La punción lumbar para establecer la estadificación se puede realizar al tiempo que se administra la primera dosis de quimioterapia intratecal si ya se había diagnosticado la leucemia en un estudio de médula ósea.

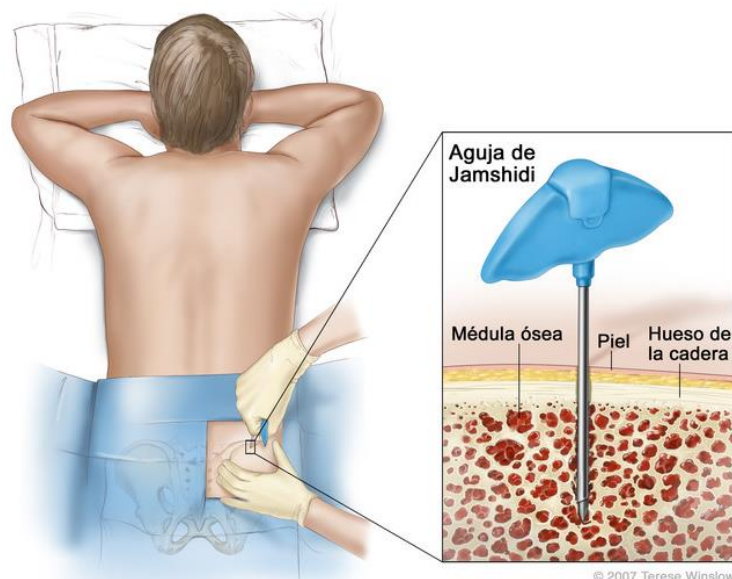


Figura 3. Aspirado y biopsia de médula ósea. (Terese Winslow, 2007)

3.1.7. Tratamiento

El tratamiento de la LLA depende del riesgo estimado de recidiva en cada paciente, que varía mucho según el subtipo de LLA. Los tres factores más importantes para definir el pronóstico son la edad en el momento del diagnóstico, el recuento inicial de leucocitos y la velocidad de la respuesta al tratamiento.

En general, un paciente de 1-10 años con un recuento leucocitario inferior a 50,000/ μ L define un riesgo medio, mientras que se consideran de alto riesgo los niños mayores de 10 años o con un recuento leucocitario inicial superior a 50,000/ μ L. Se puede mejorar el pronóstico de estos pacientes de alto riesgo con tratamientos más intensos, a pesar de su mayor toxicidad. Los lactantes con LLA y los niños que presentan trastornos cromosómicos específicos, como las translocaciones cromosómicas t(9;22) o t(4;11), tienen un riesgo mayor de recidiva a pesar del tratamiento intensivo.

El éxito en el tratamiento de la LLA infantil requiere el control de la enfermedad sistémica (de la médula, el hígado y el bazo, los nódulos linfáticos, etc.) así como el tratamiento (o prevención) de la enfermedad extramedular, particularmente en el SNC.

El tratamiento de los niños con LLA se divide en etapas:

- 🚦 **Inducción a la remisión:** Es el tratamiento inicial, el cual busca la erradicación de las células leucémicas de la médula ósea. En esta fase, la duración del tratamiento suele ser de 4 semanas e incluye la administración de vincristina una vez a la semana, un corticoide como dexametasona o prednisona y dosis repetidas de L-asparaginasa pegilada de larga duración. También se puede administrar citarabina o metotrexato por vía intratecal o ambos compuestos. Asimismo, los pacientes considerados de alto riesgo reciben una dosis semanal de daunomicina. Este tratamiento consigue la **remisión** en el 98% de los pacientes, definida como la persistencia de menos del 5% de blastos en la médula y la normalización casi total del

número de plaquetas y neutrófilos a las 4-5 semanas de tratamiento. Se suele administrar quimioterapia intratecal en el inicio del tratamiento y otra dosis adicional durante la inducción.

- ✚ **Tratamiento de post-remisión o consolidación:** La segunda fase del tratamiento se centra en el SNC, para tratar de evitar posibles recidivas posteriores a este nivel. La quimioterapia intratecal se administra de forma repetida mediante punción lumbar mientras se realiza una quimioterapia intensiva a nivel sistémico. Este tratamiento reduce el riesgo de recidiva posterior en el SNC a menos del 5%. Entre los factores que indican esta forma de tratamiento destacan la presencia de linfoblastos o bien la elevación del recuento leucocitario en el LCR en el momento del diagnóstico, así como los signos físicos de leucemia del SNC, como la parálisis de un nervio craneal.
- ✚ **Terapia de mantenimiento o continuación:** Por último, los enfermos reciben una dosis diaria de mercaptopurina y una semanal de metotrexato, que se suelen asociar con dosis intermitentes de vincristina y un corticoide. Este período dura 2-3 años, en función del protocolo elegido. En un pequeño porcentaje de los pacientes con rasgos pronósticos especialmente desfavorables, sobre todo aquellos con la translocación t(9;22) conocida como cromosoma Filadelfia, se puede realizar un trasplante de médula ósea durante la primera remisión.

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

El tratamiento también puede estratificarse mediante perfiles de expresión génica de las células leucémicas. Especialmente, los ensayos de expresión génica inducidos por la exposición al fármaco quimioterapéutico pueden predecir qué pacientes tienen una LLA resistente a fármacos.

El principal factor que condiciona una mala evolución es la recidiva de la enfermedad. Se produce en el 15-20% de los pacientes con LLA en médula ósea y se asocia con las complicaciones más graves, sobre todo cuando se produce en la fase final del tratamiento o al poco tiempo de completarlo. Esta recidiva medular debe tratarse con quimioterapia intensiva con fármacos que no han sido administrados antes a ese paciente, seguida de trasplante alogénico de células madre, con lo que se han conseguido supervivencias prolongadas en algunos casos.

El éxito del tratamiento ha determinado que la LLA deje de ser una enfermedad aguda con una mortalidad elevada y se convierta en una enfermedad crónica. Sin embargo, el tratamiento crónico tiene elevados costos académicos, psicosociales y en el desarrollo de los niños y causa un notable gasto y estrés a las familias. La intensidad del tratamiento conlleva a toxicidad aguda y a largo plazo.

3.1.8 Toxicidad del tratamiento

Los efectos tóxicos de la terapia dirigida al SNC para la LLA infantil, se puede dividir en dos grupos amplios:

- Toxicidad aguda-subaguda: La cual incluye convulsiones, derrames, síndrome de somnolencia y parálisis ascendente.
- Toxicidad crónica. Incluye la leucoencefalopatía y una variedad de trastornos conductuales, neuropsicológicos y neuroendocrinos.

Durante años se han reconocido los efectos nocivos que a largo plazo ocasiona la irradiación craneal, cuando ésta se utiliza como profilaxis del SNC sobre todo cuando las dosis sobrepasan los 1800cGy (centigray).

La toxicidad más frecuente relacionada con la terapia intratecal sola, en ausencia de radiación craneal, suelen ser convulsiones. Aproximadamente del 5% al 10% de los pacientes con LLA presentarán al menos una convulsión durante la terapia.

3.2 METOTREXATO

Este fármaco es un antagonista del ácido fólico con actividad citotóxica e inmunodepresora y una potente acción antirreumática.

Es el principal antagonista de folato, y por lo tanto es uno de los antimetabolitos que se utilizan de manera más generalizada en la quimioterapia antineoplásica. Los antimetabolitos son fármacos citotóxicos que bloquean o interrumpen una o más vías metabólicas que intervienen en la síntesis de ADN. Los folatos son esenciales para la síntesis de nucleótidos purínicos y de timidilato, que a su vez son fundamentales para la síntesis de ADN y la división celular. (9)

La principal acción de los antagonistas de folato consiste en interferir en la síntesis de timidilato, inhibe la síntesis de purinas y de desoxirribonucleótidos.

3.2.1 Estructura

En cuanto a su estructura, los folatos están formados por tres porciones: un anillo de pteridina, ácido *p*-aminobenzoico (PABA) y ácido glutámico (figura 4).

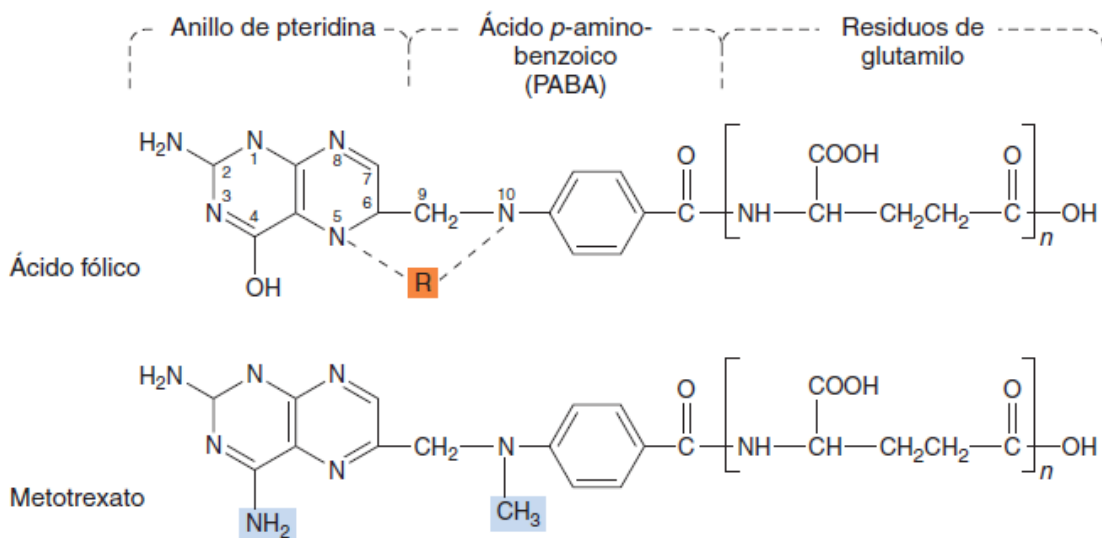


Figura 4. Estructura del ácido fólico y del metotrexato

3.2.3. Propiedades fisicoquímicas

- Nombre químico: ácido N-4-(2,4-diamino-6-pteridinil) metil metilamino benzoil-L-glutámico.
- pKa: 4.8 (fármaco ácido).
- Masa molecular: 454.44g/mol.

3.2.4. Mecanismo de acción

El principal mecanismo mediante el cual el metotrexato y los folatos naturales entran a la célula es mediante transporte activo secundario por el Transportador de Folato Reducido (RFC, también conocido como SLC19A1) especialmente cuando se administran bajas dosis de metotrexato (20-180 mg/m²), sin embargo también puede ingresar a través de la Proteína de Unión a Folato (PUF). (8)

Una vez dentro de la célula, el metotrexato es sustrato de la enzima intracelular folilpoliglutamato sintetasa (FPGS), que cataliza la formación de metotrexato poliglutamado (MTXPGs; metotrexato con 1-7 moléculas de glutamato), que inhibe múltiples blancos enzimáticos de timidilato y la síntesis de *novo* de purinas. Se ha reportado que a mayor grado de glutamilación mayor es el tiempo de residencia intracelular y por lo tanto mayor toxicidad hacia la célula blanco.

La escisión del MTXPG a metotrexato por la γ -glutamil hidrolasa lisosomal (GGH) es la ruta de degradación del MTXPG. Los MTXPG son moléculas más grandes e hidrofílicas que no son sustratos de los transportadores de folatos, por lo que son retenidos en la célula lo que incrementa la eficacia del metotrexato. La adición de residuos de glutamato al metotrexato incrementa su afinidad por otras enzimas como la Timidilato sintetasa (TYM) y enzimas de la síntesis de *novo* de purinas como: fosforibosil pirofosfato amidotransferasa (PPAT), fosforibosilglicinamida formiltransferasa (GART), e IMP ciclohidrolasa (ATIC).

El fármaco y sus conjugados afectan la actividad de enzimas del metabolismo de folatos: inhiben a la dihidrofolato reductasa (DHFR) enzima que reduce el

dihidrofolato en tetrahidrofolato, el cual es cofactor necesario para la timidilato sintasa (TS). La TS sintetiza dTMP a partir de dUMP y tetrahidrofolato; en presencia de MTX se inhibe por dos mecanismos: a) por reducción del sustrato tetrahidrofolato generado por la DHFR y b) por inhibición directa por los Pg-MTX. La inhibición de las DHFR y TS conlleva a una disminución significativa en la concentración de dTMP.

La enzima AICAR transformilasa utiliza el 10-formiltetrahidrofolato para formar tetrahidrofolato y formil-5 amino 4-carboxamida ribonucleótido, este último metabolito es un precursor en la biosíntesis de nucleótidos como dGTP y dATP, la disminución de ambos compuestos compromete los mecanismos de replicación y reparación del DNA. Como consecuencia de la disminución de 5-metil tetrahidrofolato se disminuye la síntesis de metionina y se afecta la capacidad de sintetizar proteínas, lo cual complica la viabilidad celular. (6)

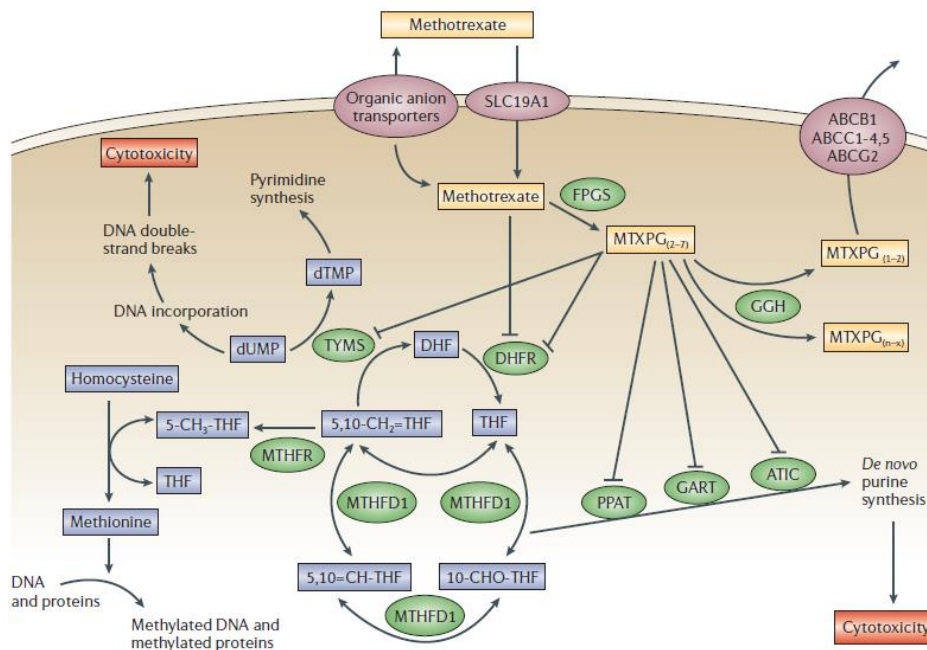


Figura 5. Metabolismo del metotrexato (recuperado de Cheek M., Evans W. Nature Rev. Cancer, 2006).

Los folatos se captan de manera activa hacia el interior de las células, en las que se convierten en folipoliglutamatos. A fin de actuar como coenzimas, los folatos se deben reducir a tetrahidrofolato (FH4). Esta reacción es catalizada por la enzima dihidrofolato reductasa y tiene lugar en dos etapas: en primer lugar dihidrofolato (FH2) y posteriormente FH4.

El FH4 actúa como cofactor en la transferencia de unidades unicarbonadas, un proceso que es esencial tanto para la metilación de uracilo a 2-desoxiuridilato (DUMP) como para formar timidilato (DTMP) y, por tanto, para la síntesis de ADN y también para la síntesis *de novo* de purinas. Durante la formación de DTMP a partir de DUMP, el FH4 se convierte de nuevo en FH2, lo que permite que se repita el ciclo. El metotrexato presenta una mayor afinidad por la dihidrofolato reductasa que FH2; de esta manera inhibe la enzima (figura 6) y produce una disminución de FH4 intracelular. La unión de metotrexato a la dihidrofolato reductasa supone un enlace adicional de hidrógeno o un enlace iónico que no está presente cuando se une FH2. La reacción más sensible a la depleción de FH4 es la formación de DTMP.

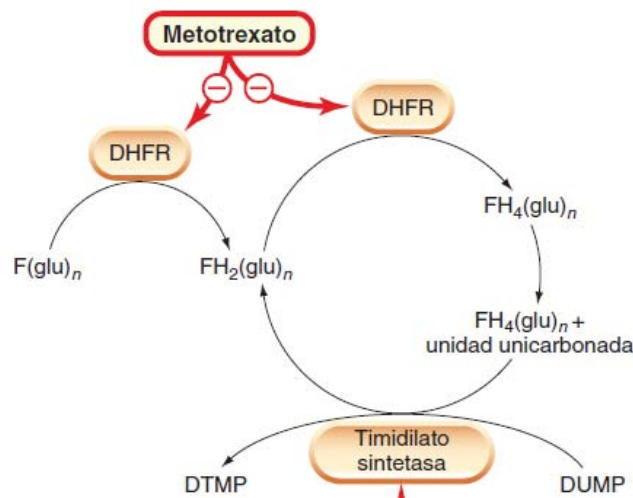


Figura 6. Diagrama simplificado de la acción de metotrexato sobre la síntesis del timidilato (adaptada de Rang H. *et al.*(2008). *Farmacología*).

3.2.3. Farmacocinética

3.2.3.1. Absorción

Es generalmente completa a partir de las rutas parenterales de inyección. Luego de una inyección intramuscular, el pico plasmático se presenta en 30 a 60 minutos.

En pacientes pediátricos con leucemia, la absorción oral del metotrexato varía ampliamente desde 23% hasta 60%, con una Cmax de 0.05-1045.22µg/mL, después de una administración oral de 10 mg/m².

El tiempo en el que se presenta la concentración máxima (Tmax) varía desde 0.67 horas hasta las 4 horas después de la administración.

3.2.3.2. Distribución

El volumen inicial de distribución, después de administración intravenosa, es de 0.18 L/Kg (18% peso corporal) y el volumen de distribución en estado estacionario es de 0.4 a 0.8 L/Kg (40-80% del peso corporal). La unión del fármaco fuera del compartimento plasmático, o su acumulación en la grasa corporal, incrementa el Vd por encima del agua corporal total.

No atraviesa la barrera hematoencefálica en las dosis terapéuticas normales, debido a su baja liposolubilidad. Pueden obtenerse altas concentraciones en el líquido cefalorraquídeo mediante administración intratecal.

Tiene una unión proteica moderada (aproximadamente el 50%), principalmente a la albúmina.

3.2.3.3. Metabolismo

El metabolismo del metotrexato es hepático (hidroxilación por la aldehído oxidasa produciendo 7-hidroximetotrexato) e intracelular, se convierte en poliglutamatos, los cuales pueden reconvertirse a metotrexato por hidrolasas.

Los poliglutamatos se retienen en la célula durante semanas (incluso meses en algunos casos) en ausencia de fármaco extracelular. Pequeñas cantidades de metotrexato pueden permanecer en los tejidos por períodos prolongados.

La vida media ($t_{1/2}$) a bajas dosis es de 3 a 10 horas y a altas dosis de 8 a 15 horas.

3.2.3.4. Excreción

La excreción renal es la ruta primaria de eliminación, y es dependiente de la dosis y la vía de administración, del 80 al 90% se elimina en las primeras 24 horas sin metabolizar. La excreción biliar representa el 10% o menos. Se ha detectado metotrexato en la leche materna.

3.2.4. Resistencia al fármaco

Se puede desarrollar una resistencia a metotrexato en las células tumorales en la que intervienen diversos mecanismos, por ejemplo:

- Reducción de la cantidad de fármaco que capta la célula.
- Aumento de la concentración de la enzima diana.
- Aumento de la utilización de vías metabólicas alternativas.
- Mutación de diversos genes que sintetizan la molécula diana.

3.2.5. Efectos adversos

- ✚ Mielodepresión
- ✚ Lesión del epitelio del aparato digestivo.
- ✚ Puede haber neumonitis.
- ✚ Cuando se utilizan regímenes de dosis altas, puede surgir una nefrotoxicidad por precipitación del fármaco o del metabolito en los túbulos renales. Los regímenes de dosis altas (dosis 10 veces mayores que las habituales), a veces utilizados en pacientes con resistencia a metotrexato, se deben seguir de un «rescate» con ácido folínico (una forma de FH4).

3.3. LEUCOCITOS

Los leucocitos, también llamados células blancas sanguíneas, son las unidades móviles del sistema protector del organismo. Se forman en parte en la médula ósea (granulocitos y monocitos y unos pocos linfocitos) y en parte en el tejido linfático (linfocitos y células plasmáticas). Tras su formación son transportados en la sangre a diferentes partes del organismo donde son necesarios.

La principal función de los leucocitos es que la mayoría de ellos se transporta específicamente a zonas de infección e inflamación intensas, lo que contribuye a una defensa rápida y potente frente a los microorganismos infecciosos. (7)

3.3.1 Características generales de los leucocitos

3.3.1.1. Tipos de leucocitos.

Normalmente hay seis tipos de leucocitos en la sangre (figura 7):

- Polimorfonucleares: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.
- Monocitos
- Linfocitos (T y B)
- En ocasiones, las células plasmáticas.

Los granulocitos y monocitos protegen el organismo frente a los microorganismos invasores sobre todo mediante fagocitosis. Los linfocitos y las células plasmáticas actúan sobre todo en conexión con el sistema inmunitario.



Figura 7. Tipos de leucocitos. (Terese Winslow, 2007).

3.3.1.2. Concentraciones de diferentes leucocitos en la sangre

El ser humano adulto tiene unos 7000 leucocitos por microlitro de sangre.

Tabla 5. Porcentajes normales de los diferentes tipos de leucocitos.

LEUCOCITOS	PORCENTAJE
Neutrófilos	62%
Eosinófilos	2.3%
Basófilos	0.4%
Monocitos	5.3%
Linfocitos	30%

3.3.2. Génesis de los leucocitos

Existen dos líneas principales de leucocitos; la línea mielocítica, que comienza con el mieloblasto, y la línea linfocítica que comienza con el linfoblasto.

Los granulocitos y los monocitos se forman sólo en la médula ósea. Los linfocitos y las células plasmáticas se producen sobre todo en los diferentes órganos linfógenos, en especial los ganglios linfáticos, el bazo, el timo y las amígdalas; también se pueden formar en varias bolsas de tejido linfático situadas en otras partes del cuerpo como en la médula ósea y las conocidas como placas de Peyer situadas debajo del epitelio de la pared intestinal.

Los leucocitos formados en la médula ósea se almacenan dentro de la misma hasta que son necesarios en el sistema circulatorio. Se almacenan unas tres veces más leucocitos de los que circulan normalmente por toda la sangre.

Los linfocitos tienen una vida de semanas o meses; su duración depende de la necesidad del organismo de estas células.

3.4. CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células '*in vitro*', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

El ambiente óptimo en el cual las células en cultivo viven y que es controlado por la incubadora de CO₂ se caracteriza por tres factores fundamentales:

- Temperatura: La temperatura óptima de incubación de la mayor parte de los tipos celulares procedentes de tejidos de mamíferos es de $36.5 \pm 5^\circ\text{C}$.
- Mezcla de gases: Las condiciones habituales de incubación de la mayor parte de los cultivos celulares son de aire atmosférico mezclado con un 5% de CO₂.
- Humedad: Las placas de cultivos celulares deben mantenerse en condiciones de humedad ambiental muy elevada, para evitar que se evapore agua del medio de cultivo que sustenta a las células y pueda comprometerse la presión osmótica correcta del medio. (15)

3.4.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo aporta condiciones fisicoquímicas y nutrientes adecuados para el mantenimiento de las células en cultivo.

Las propiedades fisicoquímicas reguladas por el medio líquido son: la osmolaridad, el pH, la tensión superficial y la viscosidad.

3.4.2. Células MCF-7

MCF-7 es una línea celular que fue aislada por primera vez en 1970, es una línea celular (humana) de adenocarcinoma de mama y ha sido utilizada ampliamente en la investigación.

Las células MCF-7 se cultivan normalmente hasta que llegan a confluencia. Aunque son fáciles de propagar, las células son, por lo general, de crecimiento lento.

Las células miden aproximadamente 20-24 μ m y son adherentes. (16, 17).

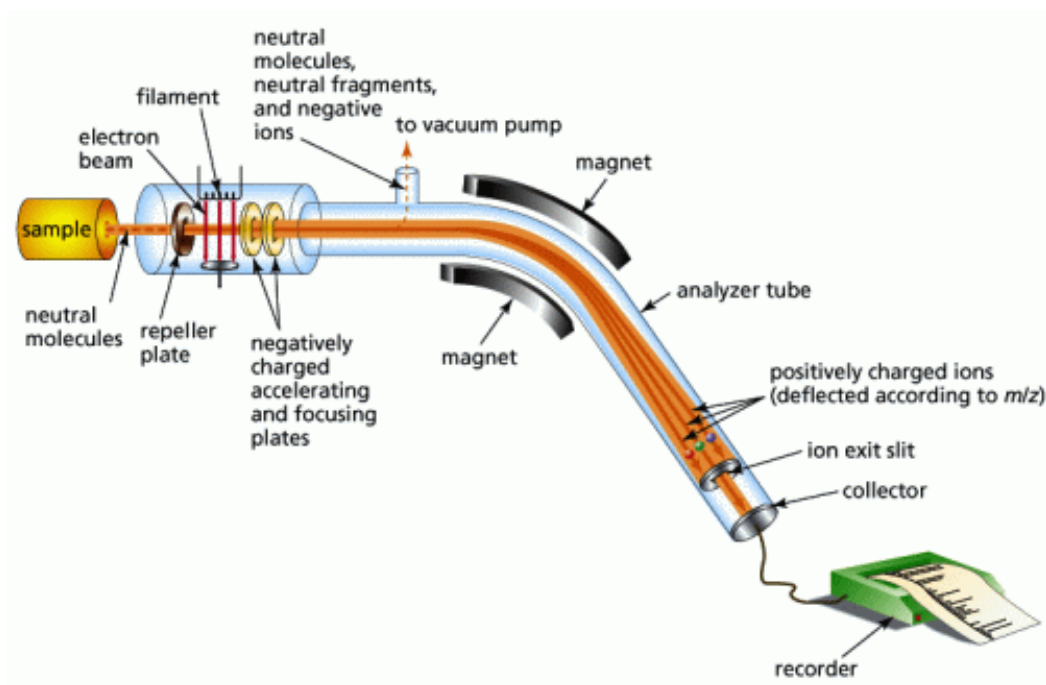
3.4.3. Contadores de células

Uno de los datos más importantes que se tienen que tener en cuenta a la hora de realizar un cultivo celular es el número de células del cual se parte en un cultivo primario.

- Cámara de Neubauer: Se trata del hemocitómetro clásico, el cual se utiliza en el laboratorio de análisis clínicos para realizar recuentos de células rojas y blancas de sangre pero aplicado en cultivos celulares al recuento de células.

3.5. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas es una técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas, en algunos hasta picomoles de muestra y obtener información característica como el peso y algunas



veces la estructura del analito. (25)

Figura 8. Espectrómetro de masas.

3.5.1 Fundamento

El proceso de análisis por espectrometría de masas comienza en llevar el compuesto a analizar a fase gaseosa, la muestra debe tener una presión de vapor de 10^{-2} mmHg, debido a que las moléculas deben migrar por difusión desde el sistema de entrada hacia la cámara de ionización.

Ya que las moléculas neutras difunden en forma aleatoria por la fuente de ionización, sólo una porción es ionizada. El proceso de ionización más común en análisis en fase gaseosa es el de impacto electrónico (*EI*), en el cual se transfiere energía a la molécula neutra en estado de vapor, dándole suficiente energía para expulsar uno de sus electrones y de ese modo tener una carga residual positiva.

La molécula ionizada puede tener energía excesiva que puede ser disipada a través de la fragmentación de ciertos enlaces químicos. El rompimiento de varios enlaces químicos permite la producción de fragmentos de ion cuya masa es igual a la suma de las masas atómicas del grupo de átomos que retienen la carga positiva durante el proceso de fragmentación.

Después de producir los iones, el siguiente paso es su análisis en el analizador de iones, los iones tienen una carga eléctrica que les permite ser controlados por campos eléctricos; son separados por su relación de masa/carga (*m/z*). Los iones son analizados de acuerdo a su abundancia a lo largo de la escala *m/z*. Durante el proceso de adquisición de datos provenientes del detector, los datos pueden ser organizados en forma tabular o en formato de gráfica de barras para dar finalmente el espectro de masas de la muestra analizada, como se muestra en la figura 9.

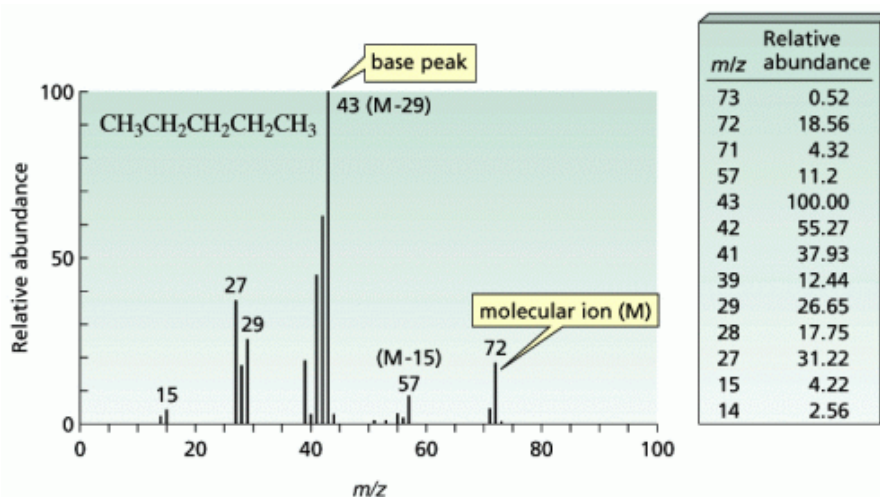


Figura 9. Ejemplo de espectro de masas.

Actualmente, los espectrómetros de masas son utilizados para el estudio de un amplio rango de sustancias y materiales con alta precisión y sensibilidad.

3.5.2. El espectrómetro de masas

Un espectrómetro de masas (figura 8) es un instrumento que mide las masas, por medio de la relación m/z de moléculas individuales que han sido convertidas en iones.

Los espectrómetros de masas tienen principalmente los siguientes componentes (los cuales también se muestran en la figura 10):

- Un sistema de entrada
- Una fuente de iones
- Un analizador de masas
- Un detector
- Un procesador de datos

El sistema de entrada, junto con la fuente de iones y el tipo de analizador de masas definen el tipo de espectrómetro y las capacidades del sistema, los diferentes tipos se muestran en la tabla 6.

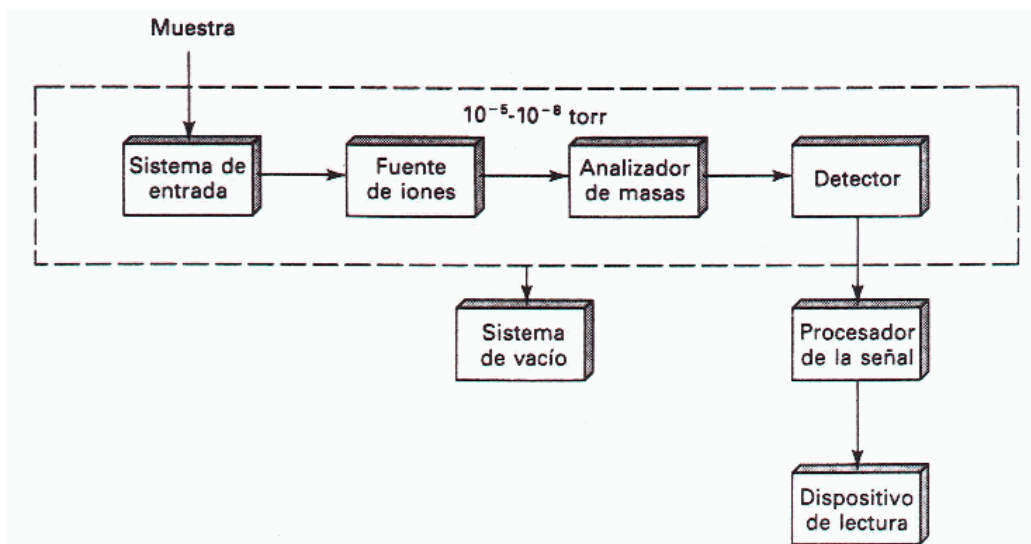


Figura 10. Componentes básicos de un espectrómetro de masas.

Tabla 6. Variantes de componentes del sistema de espectrometría de masas.

Componente	Variantes
Sistema de entrada	<ol style="list-style-type: none"> 1. Indirecto 2. Directo 3. Columna capilar cromatográfica
Fuente de iones	<ol style="list-style-type: none"> 1. Impacto electrónico 2. Ionización química 3. Ionización de campo 4. Desorción de campo 5. Bombardeo con átomos rápidos 6. Electrospray, incluyendo nanospray y microspray. 7. <i>Matrix-assisted laser desorption</i> (MALDI).
Analizador de masas	<ol style="list-style-type: none"> 1. Magnético 2. Cuadrupolo 3. Trampa de iones (<i>Ion-trap</i>) 4. Tiempo de vuelo (<i>Time-of-flight</i> TOF) 5. Analizador FT-ICR

Los procesos básicos asociados con la espectrometría de masas abarcan desde la generación de iones en fase gaseosa de un analito, y la medición de las relaciones m/z de estos iones.

3.5.2.1 Entrada de la muestra

El principal factor limitante en la espectrometría de masas, es la posibilidad de vaporización de la muestra. Como norma general, se puede decir que la condición necesaria para que se pueda obtener el espectro de un compuesto, es que su presión de vapor sea igual o superior a 10^{-6} mmHg, a una temperatura tal que la muestra no pirolíce.

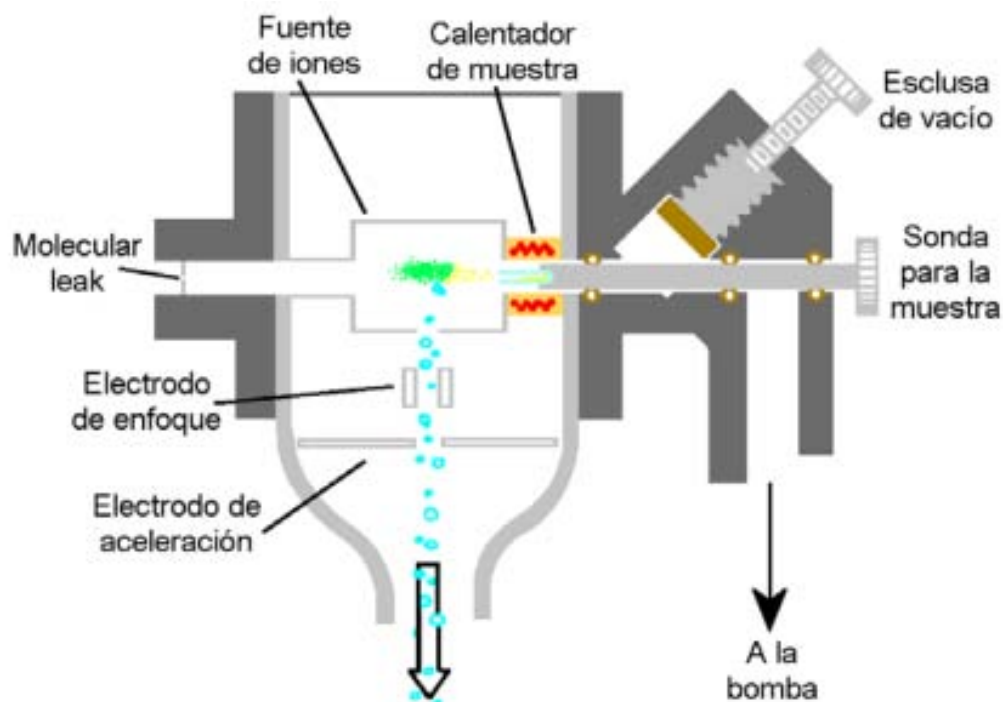


Figura 11. Sistema de introducción de muestras.

3.5.2.2. Fuente de iones

Existen diferentes métodos de ionización, los cuales se describen a continuación.

3.5.2.2.1. Impacto electrónico o ionización electrónica (Electron Impact EI)

El analito es introducido dentro de la fuente de ionización que está al vacío y subsecuentemente ionizado por colisiones con un flujo de electrones.

Los electrones para este proceso son generados por emisión térmica de un filamento caliente. Los electrones son subsecuentemente acelerados al aplicar un potencial entre el filamento y la muestra.

Para enfocar los electrones dentro de una trayectoria determinada, se utiliza un campo magnético dispuesto paralelamente a la dirección en la que se mueven los electrones, de forma que estos describen una trayectoria helicoidal hasta llegar a un ánodo donde son recogidos. (Figura 12).

Una vez ionizada y en su caso fragmentada la molécula, se utiliza una placa con carga positiva para repeler los iones y expulsarlos fuera del haz de electrones. Para sacar a las moléculas ionizadas de la fuente de iones, se utiliza un potencial eléctrico muy elevado, entre 1 y 10 kV.

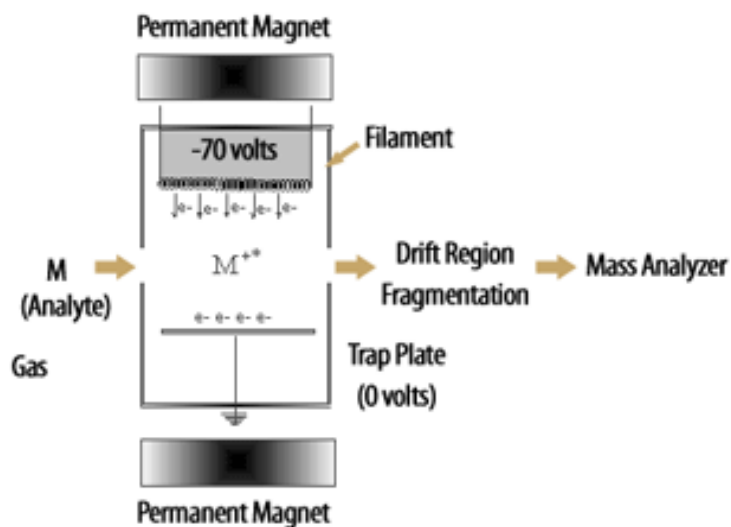


Figura 12. Ionización por impacto electrónico.

3.5.2.2.2. Ionización química (Chemical Ionization CI)

Es el primer método de ionización suave, se utiliza como agente ionizante un ion de un reactivo gaseoso, generado por medio de *EI*, que va a transferir su carga a la molécula de muestra por medio de una reacción biomolecular.

Entre los agentes gaseosos utilizados se incluyen el metano, el isobutano y el amoníaco, formando iones CH_5^+ , C_4H_9^+ , y NH_4^+ respectivamente como especies predominantes. La ionización química genera iones de energía interna relativamente baja, exhibiendo un bajo nivel de fragmentación.

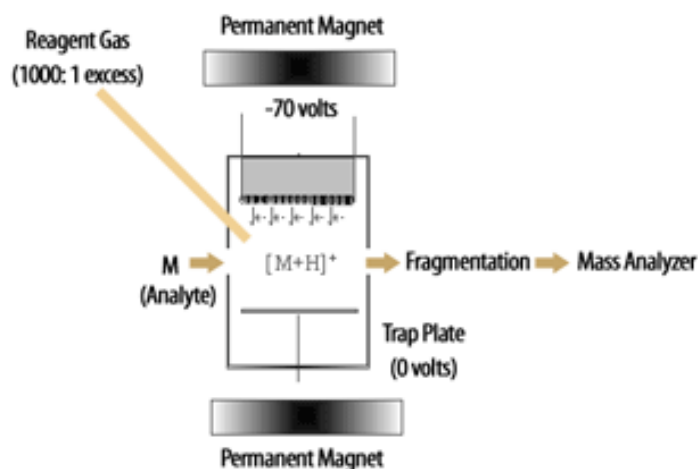


Figura 13. Ionización química.

3.5.2.2.3. Ionización de campo (Field ionization FI)

Es un método de ionización suave, sin embargo tiene riesgo de descomposición térmica de la muestra.

Las moléculas son ionizadas por medio de ionización en los bordes del campo del ánodo emisor. El emisor consiste de un alambre de tungsteno de 10-13 μm de diámetro que es activado por un procedimiento especial creando miles de microagujas en su superficie. Un potencial alto de 10-12 kV es aplicado al emisor causando polarización y finalmente ionización de las moléculas que están cerca

de las puntas de las microagujas donde el campo eléctrico alcanza una gran fuerza.

3.5.2.2.4. Desorción de campo (Field desorption FD)

Es un método de ionización muy suave, está basado en el de Ionización de campo. Ha sido desarrollado al combinar la desorción y la ionización del analito, pero no hay necesidad de evaporación antes de la ionización, generando iones con muy baja energía interna y casi nula fragmentación.

3.5.2.2.5. Bombardeo con átomos rápidos (Fast-Atom Bombardment FAB)

Es un método de ionización suave, resulta de la combinación de desorción del analito desde una fase condensada (mezcla de analito sólido+matriz) con su subsecuente ionización. La matriz está formada de moléculas orgánicas (glicerol ó 3-nitroencil alcohol) que mantienen una superficie homogénea para el bombardeo. Ocurre el bombardeo de la muestra con átomos rápidos (Ar o Xe de 3-10 keV) o iones rápidos (Cs^+ arriba de 35 keV). Si se utilizan iones rápidos la técnica se conoce también como *liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS)*.

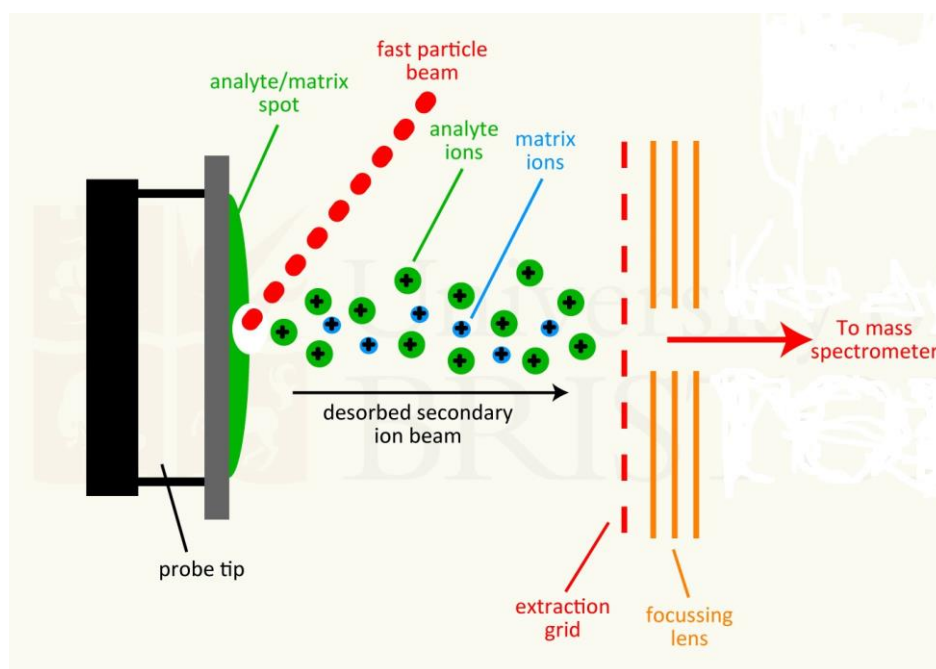


Figura 14. Bombardeo con átomos rápidos.

3.5.2.2.6. Ionización por electrospray (Electrospray ionization ESI)

Este método puede ser llevado a cabo a presión atmosférica a diferencia de otros métodos, por lo que se le conoce también como *atmospheric pressure ionization (API)* también se encuentra el ESI a presión elevada. Es ampliamente utilizado en aplicaciones de ciencias bioquímicas y biomédicas debido a su capacidad de analizar moléculas altamente polares tales como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos.

En el proceso general de electrospray, la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un elevado potencial ($\pm 3-5$ kV), lo que permite producir un spray de microgotas cargadas, las cuales debido a repulsiones electrostáticas se dividen hasta provocar la desolvatación y evaporación de los iones.

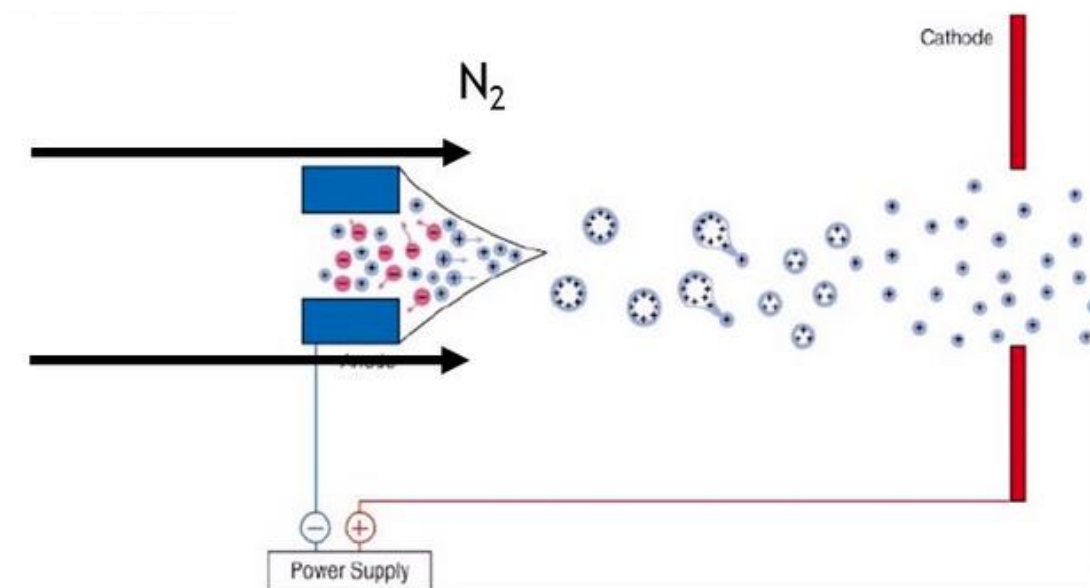


Figura 15. Ionización por electrospray.

El proceso de evaporación y rompimiento de gotas se repite hasta que el tamaño y carga de las gotas desorba moléculas protonadas dentro de la fase gaseosa, donde pueden ser dirigidas en el espectrómetro de masas por medio de campos eléctricos apropiados.

3.5.2.3. Analizadores de masas

Los analizadores de masas llevan a cabo la separación de los iones producidos, de acuerdo a su relación m/z para que puedan llegar al detector. La unidad para m/z es el Thomson (Th).

En el espectro de masas aparecen dos clases principales de iones; el ion molecular, que es la molécula completa del analito, y fragmentos iónicos, los cuales contienen sólo una parte de la estructura.

3.5.2.3.1. Analizador magnético

Los iones que llegan de la fuente de iones son acelerados a una gran velocidad, se les aplica un campo magnético perpendicular al movimiento de los iones. Su velocidad permanece constante, pero se mueven en dirección circular, es por esto que el sector magnético tiene forma de arco. Está provisto de una rendija de salida con el fin de aislar los iones cuyas trayectorias tengan el radio de deflexión necesario que los dirigirá hacia el detector.

El analizador de masas de sector magnético es un modelo clásico que posee varias ventajas: alta reproducibilidad, alto desempeño en análisis cuantitativos, alta resolución, sensibilidad y rango dinámico.

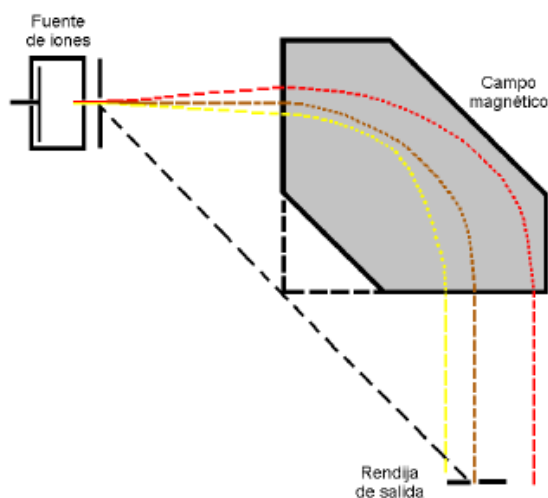


Figura 16. Analizador de masas de sector magnético.

3.5.2.3.2. Analizador de masas de cuadrupolo

El analizador de cuadrupolo está formado por cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica, exactamente rectas y paralelas, dispuestas con gran precisión sobre una circunferencia, de tal forma que el haz de iones procedente de la fuente incide sobre el centro del dispositivo.

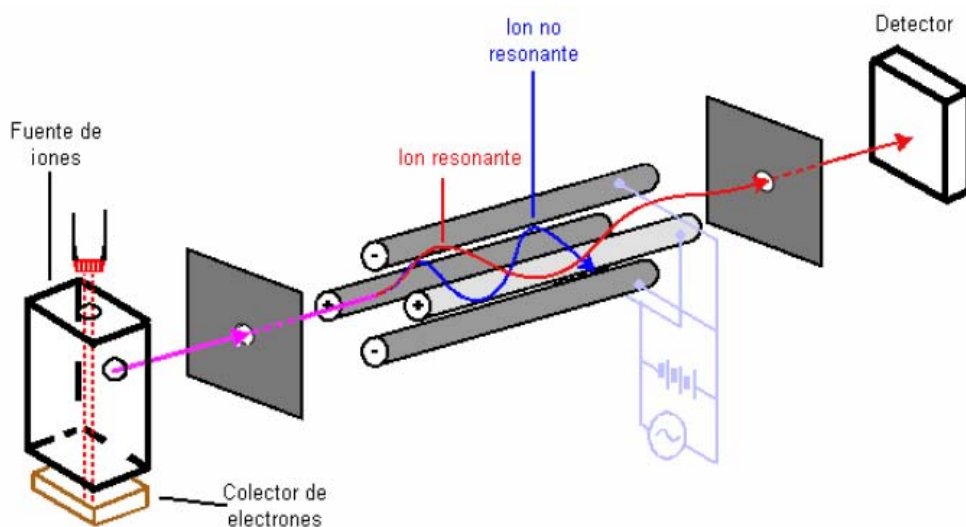


Figura 17. Analizador de masas cuadrupolar.

Sobre estas barras, por pares alternos, se aplica un potencial constante (V), y un potencial alterno de radiofrecuencia superpuesto. La combinación de los campos origina un movimiento lateral complejo.

Entre las ventajas se encuentra que los barridos pueden ser extraordinariamente rápidos (0.01s) y que la escala de masas es lineal con respecto a los potenciales utilizados.

La principal desventaja consiste en su poder de resolución, que es relativamente pequeño, del orden de 500 a 1,000, y su limitado rango de utilización, ya que sólo permite la separación de iones con relaciones m/z menores de 1,000.

3.5.2.3.3. Analizador de tiempo de vuelo (Time-of-flight TOF)

El principio de operación del analizador de tiempo de vuelo (*time-of-flight TOF*) involucra la medición del tiempo requerido por un ion para viajar desde la fuente de iones hasta el detector localizado a 1-2m de la fuente. Los iones se separan en grupos de acuerdo a su velocidad como van recorriendo la región libre de campo entre la fuente de iones y el detector. Los iones chocan secuencialmente en el detector en forma de un incremento de m/z . Los iones de baja m/z llegan al detector antes que aquellos con m/z alta.

Ofrecen dos importantes ventajas sobre los restantes tipos de analizadores: en primer lugar, su tiempo de análisis es extraordinariamente corto y, por otra parte y de mayor importancia es que no existen limitaciones en la masa de los iones que pueden ser separados.

El principal problema de este tipo de analizadores es que el tiempo que tardan los iones en alcanzar el detector es alrededor de unos pocos microsegundos, lo que exige sistemas de detección extremadamente rápidos.

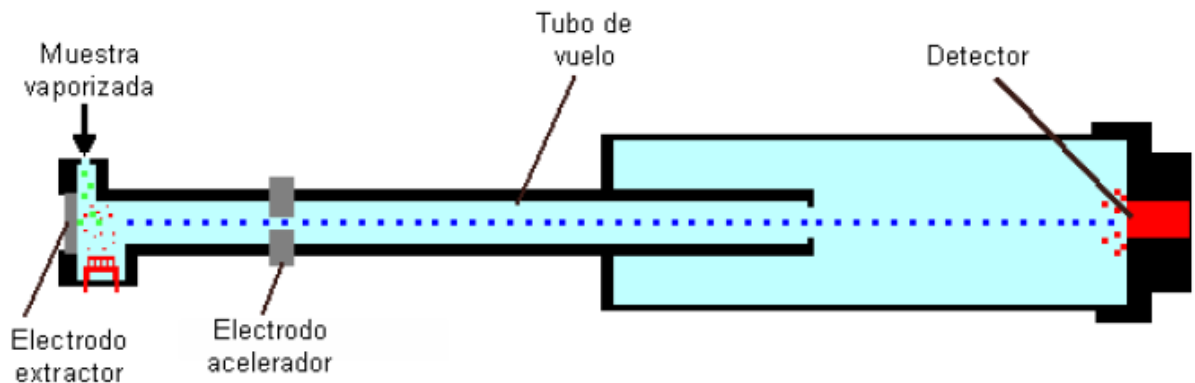


Figura 18. Analizador de tiempo de vuelo.

3.5.2.3.4. Analizador de trampa de iones

El analizador de trampa de iones utiliza campos eléctricos oscilantes para atrapar los iones en forma controlada. En la trampa de iones cuadrupolo, los iones son atrapados en un espacio tridimensional.

La trampa de iones cuadrupolo atrapa los iones en un pequeño volumen entre tres electrodos, uno circular y dos electrodos hiperbólicos en los extremos, por medio de campos eléctricos oscilantes. Los tres electrodos forman una cavidad en la que se producen la ionización, la fragmentación y el análisis de masas.

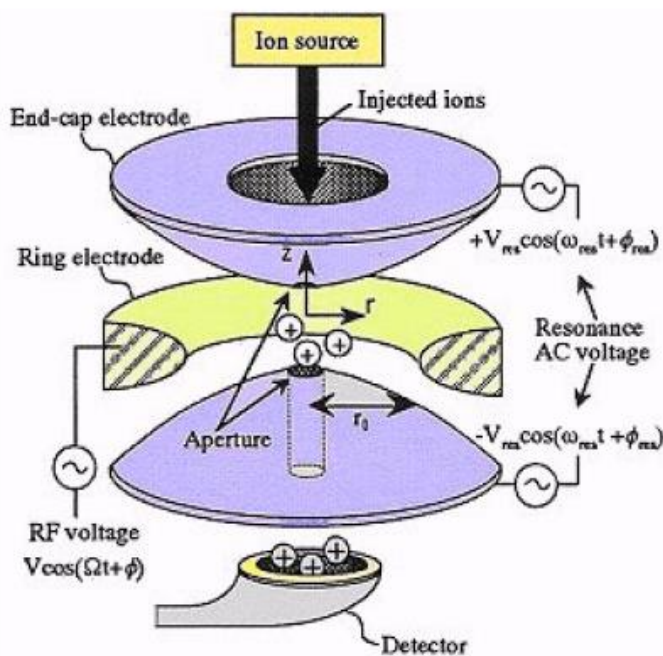


Figura 19. Analizador de trampa de iones.

Este sistema posee alta sensibilidad además de ser equipos relativamente compactos, pero ofrecen poca capacidad en análisis cuantitativos, pueden sufrir efectos por cargas y reacciones de los iones, muchos parámetros influyen la calidad del espectro obtenido por este método (excitación, atrapado y detección de los iones) por lo que debe contarse con sistemas de control sumamente precisos. Puede acoplarse a sistemas cromatográficos.

3.5.2.4. Detectores

3.5.2.4.1. Caja de Faraday

Consiste en una caja dentro de la cual se tiene una placa, ligeramente inclinada para evitar la reflexión de iones; al chocar con la placa, los iones toman de ésta electrones para neutralizar su carga, y midiendo la corriente electrónica necesaria para neutralizar a todos los iones, se puede tener una idea bastante exacta del número de iones que han alcanzado la placa. Este tipo de detector es simple, barato, resistente y fiable. Posee alta precisión, sensibilidad y produce poco ruido de salida. (25)

3.5.2.4.2. Multiplicador de electrones

Utiliza el principio de emisión secundaria de electrones para afectar la amplificación. En el dinodo discreto los iones provenientes del analizador de masas son enfocados sobre un dinodo que emite electrones en proporción directa al número de iones bombardeados hacia él. Los electrones secundarios del dinodo son acelerados y enfocados hacia un segundo dinodo, el cual también emite electrones secundarios. De este modo, la amplificación es llevada a cabo a través de un “efecto cascada” de electrones secundarios de dinodo a dinodo.

La desventaja que presenta este detector es que las corrientes inicial y final no presentan una proporcionalidad suficientemente buena como para poder ser utilizados en determinaciones cuantitativas muy exactas. Tienen rápida respuesta y alta sensibilidad.

3.5.2.4.3. Detector Daly

Una corriente de iones positivos pasan por la hendidura del detector y son atraídos hacia un cátodo de aluminio (el botón *Daly*) teniendo un gran potencial negativo (-15000 V). Ocurre el impacto con el botón Daly, el cual esencialmente sirve como un dinodo de conversión que produce más de ocho veces electrones secundarios que son atraídos hacia un aparato centelleante, los electrones secundarios

generan fotones que son amplificados en un fotomultiplicador. Sólo es capaz de detectar iones de alguna m/z específica ya es un detector de canal simple.

1.5.2.4.4. Detector de microcanales

Consta de un arreglo de capilares de vidrio huecos (de 10-25 μm de diámetro), unidos a un material emisor de electrones, formando microcanales. Manteniendo estos microcanales a un alto potencial permite a los iones golpear el material y expulsar electrones, esto causa una avalancha, creando electrones secundarios con una ganancia de 10^3 - 10^4 . Estos detectores son útiles en señales de baja intensidad.

3.5.3. Espectrometría de masas en tándem.

Esta técnica analítica se introdujo en los laboratorios de análisis clínicos aproximadamente en 1980. La técnica usualmente se abrevia como: tándem MS, MS/MS, MS², QqQ (en el caso de los equipos de triple cuadrupolo). Uno de los equipos más utilizados en química clínica es el de triple cuadrupolo, acoplado a una fuente de ionización por “electrospray” (ESI). Este equipo funciona de la siguiente manera: Una vez que la muestra ha sido introducida, sufre una ionización suave por ESI para adquirir carga; posteriormente pasa al MS₁ en donde los componentes de la muestra se separan y ordenan de acuerdo a su m/z. Los iones pasan por la celda de colisión en donde se generan fragmentos como producto de su colisión con un gas inerte; los fragmentos generados pasan por el MS₂, los cuales se pueden correlacionar con las moléculas intactas producidas en el MS₁. (Figura 20).

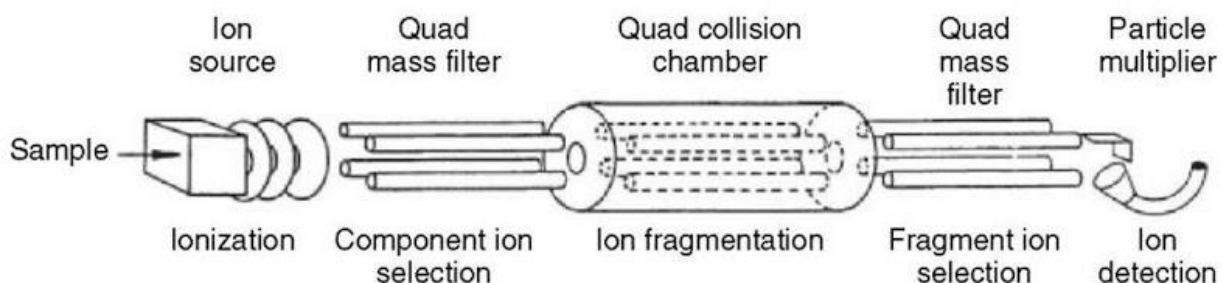


Figura 20. Espectrómetro de masas en tándem.

Los resultados generados se registran en forma de espectro de masas que es como la huella digital de los compuestos. Con esta técnica se pueden detectar y cuantificar selectivamente múltiples analitos dentro de una familia de compuestos. También se puede obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación de fragmentos específicos y es útil para descubrir compuestos en mezclas complejas de acuerdo a su patrón de fragmentación. (26)

La espectrometría de masas en tándem puede ser usada para cuantificación. Esto se consigue realizando la adquisición de dos estados del ión seleccionado. El primer espectrómetro es programado para transmitir el primer ión de interés a la celda de colisión, y luego uno de sus iones producto, es monitorizado después del segundo espectrómetro. Con la selección de un estándar interno adecuado, el espectrómetro de masas puede ir cambiando rápidamente entre los cuatro iones (dos iones precursores y dos iones producto asociados) y las correspondientes intensidades de los iones producto monitoreadas. Esta técnica es conocida como *reacción múltiple monitoreada (multiple reaction monitoring (MRM))*, y es capaz de alcanzar altos niveles de especificidad.

3.5.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

El poder de los sistemas HPLC-MS reside; en que se acopla un sistema de separación que permite obtener espectros de masas de cada uno de los analitos de las muestras. Facilitan el análisis de muestras poco volátiles, expanden significativamente el uso analítico de la espectrometría de masas para compuestos orgánicos (desde fármacos hasta proteínas). (11)

Entre los sistemas de ionización como es el API-ES (Ionización a presión atmosférica) y el APCI (Ionización química a presión atmosférica) se pueden analizar compuestos de peso molecular hasta aproximadamente 100kDa con un intervalo de polaridades que va desde analitos no polares hasta los muy polares.

La técnica de ESI es más apropiada para la determinación de analitos polares y/o con pesos moleculares relativamente altos. Así ESI presenta ciertas ventajas respecto a APCI como son:

- Información sobre el peso molecular
- Apto para analitos volátiles y no volátiles, así como para analitos iónicos/polares
- Alta sensibilidad

Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes, tales como:

- Limitado a flujos relativamente bajos
- El analito ha de ser ionizable en disolución
- Supresión iónica con altas concentraciones de sales
- Información estructural limitada

Si se combina la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas el resultado es una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad.

3.5.4.1. UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)

Esta relativamente nueva categoría de separación analítica mantiene prácticamente los principios de HPLC, pero incrementando la rapidez, sensibilidad y la resolución. Cuenta con columnas con partículas más pequeñas e instrumentos adecuados para bombear la fase móvil a presiones del orden de 15,000 psi, o incluso 100,000 psi. (18)

3.6. Validación de métodos analíticos.

3.6.1. Definición

La validación de un método se puede definir como el proceso de demostración experimental y documentada de que un método analítico realiza lo que se espera de él. (21)

Todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados, independientemente si son metodologías desarrolladas por la unidad analítica o se adquieren comercialmente.(22)

3.6.2. Parámetros de calidad

Son los criterios cuantitativos que se utilizan para decidir si un método es adecuado o no para resolver un determinado problema analítico. Son, por lo tanto, los criterios que se utilizan en la validación de los métodos analíticos.

La norma oficial vigente NOM-177-SSA1-2013 contiene lo referente a la validación de métodos analíticos en el apartado 9.1, en donde se describen los parámetros que deben cumplir los métodos analíticos para que pueda considerarse que emiten resultados exactos, precisos, reproducibles, y por lo tanto confiables.

- *Exactitud:* Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- *Linealidad:* Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra.
- *Selectividad:* Es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra.
- *Precisión:* Se puede definir como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando un método se aplica, repetidamente y desde el

principio, sobre distintas porciones representativas de una misma muestra. Puede estimarse de varias formas:

- *Repetibilidad*: Es la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.
 - *Reproducibilidad intralaboratorio*: Es la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.
-
- *Límite inferior de cuantificación*: Es la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio.
 - *Límite superior de cuantificación*: Es la concentración más alta del analito que puede medirse con la precisión y exactitud.
 - *Sensibilidad*: Mide la capacidad de un método para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito.
 - *Límite de detección (LD)*: Es la concentración mínima de analito que proporciona una señal en el instrumento que difiere significativamente de la señal del blanco.
 - *Robustez*: Es la capacidad del método analítico para no ser afectado por pequeños pero deliberados cambios en las condiciones experimentales. Se expresa como la desviación estándar absoluta, desviación estándar relativa o coeficiente de variación de los mismos.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Equipos

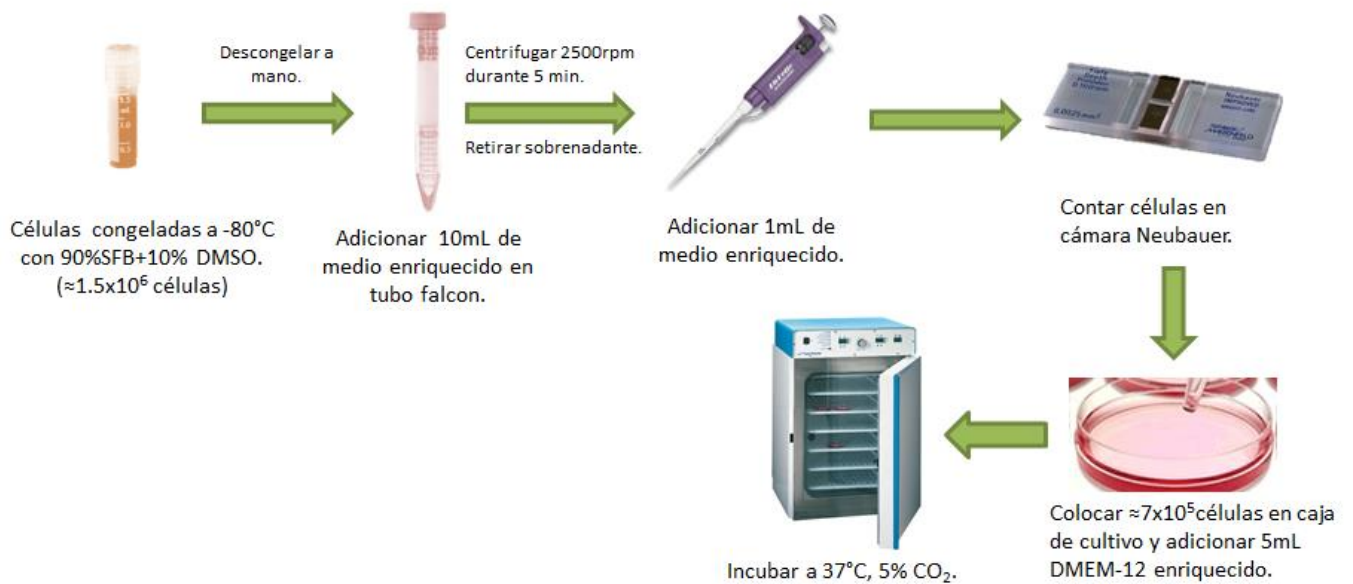
Para la separación cromatográfica se empleó un cromatógrafo Acquity UPLC. El espectrómetro de masas fue de triple cuadrupolo modelo Quattro Micro marca Waters. Los datos obtenidos fueron tratados mediante el programa MassLynx v. 4.1.

4.2. Material biológico

- Sangre humana obtenida de voluntarios sanos.
- Leucocitos humanos separados a partir de sangre total.
- Células MCF-7

4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 Cultivo de células MCF-7.



Una vez que las células han alcanzado aproximadamente el 90% de confluencia se absorbe el medio y se le colocan 3mL de tripsina para separar las células, cuando la capa de células se haya dispersado se toma este volumen y se coloca en un tubo falcon de 15mL y se adicionan 10mL de medio DMEM-F12 para desactivar la tripsina y evitar daño celular. Posteriormente se centrifuga a 2,500rpm por 5 minutos, se elimina el medio con tripsina, se resuspende el botón celular en medio de cultivo, se colocan $\approx 7 \times 10^5$ células por caja de cultivo y se incuban.

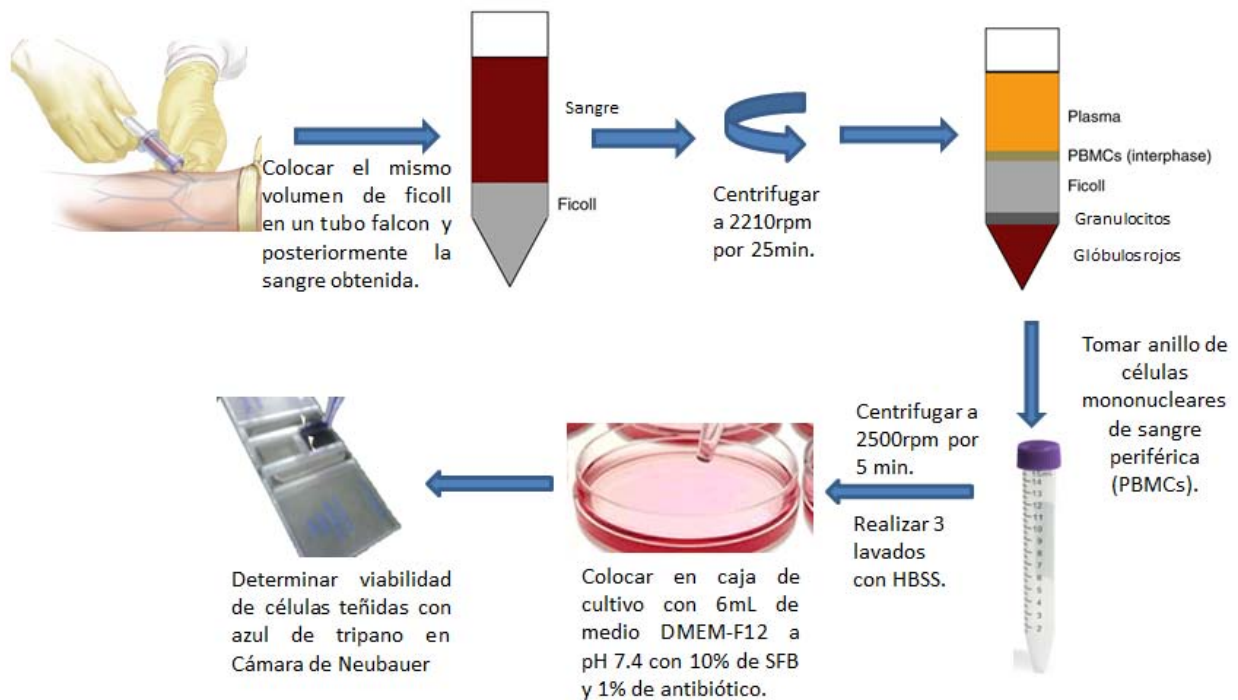
El proceso anterior se repite, hasta que se hayan realizado de 2 a 3 pases, después de esto las células pueden ser utilizadas para los procesos experimentales correspondientes.

4.3.2. Conteo de células en cámara de Neubauer.



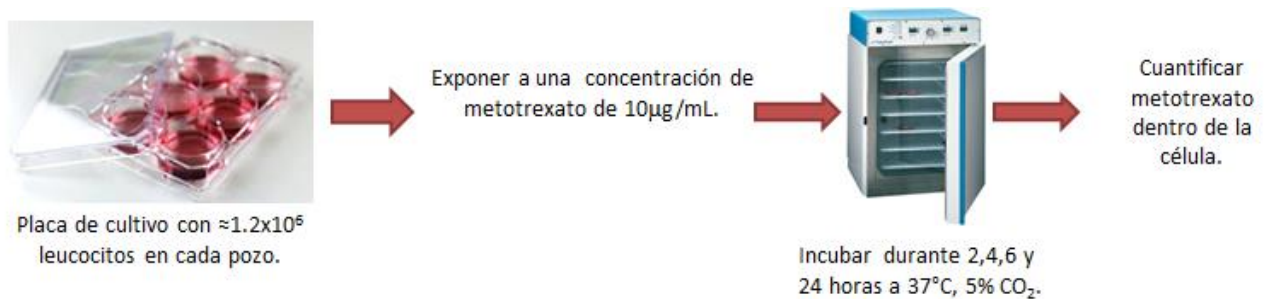
$$\text{Concentración } \left(\frac{\text{cél}}{\text{mL}} \right) = \text{Promedio cél. cuadrantes} * \text{Vol. Suspensión cel.} * 5 * 10^4$$

4.3.3. Separación de leucocitos por el método de ficoll (en campana de flujo laminar).



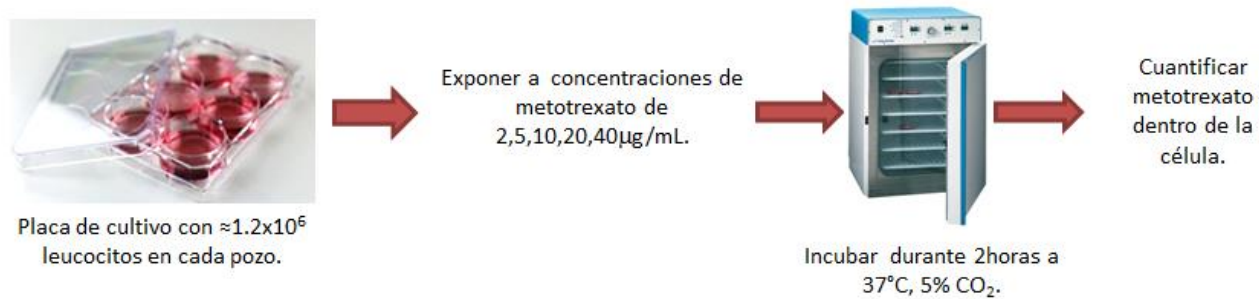
4.3.3. Cinética del metotrexato en leucocitos.

Para conocer la cinética del metotrexato dentro de los leucocitos éstos se expusieron a una misma concentración a diferentes tiempos y posteriormente se sometieron al proceso de extracción para cuantificarse por UPLC-MS/MS.



4.3.4. Cuantificación de metotrexato en leucocitos.

Se realizaron dos pruebas de cuantificación dentro de los leucocitos con dos voluntarios sanos, realizando cada uno por duplicado exponiendo a diferentes concentraciones de metotrexato e incubando durante 2 horas, por último se realiza la extracción del metotrexato para poder cuantificarlo por UPLC-MS/MS.



5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.1. Condiciones de “tuning” o sintonización.

Para comenzar a analizar o cuantificar algún compuesto por espectrometría de masas es necesario realizar un “tuning” el cual determinará las condiciones a las cuales se trabajará con el analito. El “tuning” tiene como principales funciones; ajustar las masas del espectrómetro, conseguir la máxima sensibilidad y comprobar el estado del espectrómetro de masas.

Para realizar el “tuning” del metotrexato se probaron dos fases móviles; Ácido fórmico (0.1%): ACN (55:45% v/v) y $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (5mM): ACN (40:60 v/v), resultado la primera la que obtuvo una mejor resolución del analito. Los parámetros de ionización y del analizador se optimizaron para obtener la máxima intensidad y sensibilidad del analito.

- a. Tipo de ionización: ESI (+).
- b. Solución para tuning del analito (metotrexato): 100ng/mL (diluyente: MeOH 70%).
- c. Transición optimizada del analito: 455.21>308.29 Th
- d. Solución para tuning estándar interno (Ifosfamida): 100ng/mL (diluyente: MeOH 70%)
- e. Transición optimizada del estándar interno: 261.09>91.62 Th
- f. Velocidad de infusión: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$
- g. Fase móvil UPLC: Ácido fórmico (0.1%): ACN 50:50 v/v
- h. Flujo UPLC: 0.2 mL/min
- i. Transiciones:
Ion Padre (IP): 455.21 (Metotrexato)

Ion hijo (IH): 308.29

Estándar interno (E.I): 261.09>91.62 (Ifosfamida)

5.2. Condiciones cromatográficas

- a. Fase móvil: Ácido fórmico 0.1%: ACN 100% (55:45)% v/v
- b. Fase de lavado débil: ACN 100%: H₂O (50:50)% v/v
- c. Fase de lavado fuerte: H₂O:ACN:MeOH: Isopropanol (2-propanol) (25:25:25:25)%v/v
- d. Fase de lavado de sellos: H₂O: ACN (90:10)% v/v
- e. Velocidad de flujo UPLC: 0.2 mL/min
- f. Volumen de inyección: 10 µL/min
- g. Modo de inyección: Partial Loop with needle over fill
- h. Split ratio: N/A
- i. Temperatura de automuestreador: 15 °C
- j. Temperatura de la columna cromatográfica: 40°C
- k. Volumen del loop empleado: 10 µL
- l. Tiempo de inyección: 2.5 min corrida
- m. Columna cromatográfica utilizada:

Tipo de soporte	Diámetro interno (mm)	Longitud (mm)	Tamaño de partícula (µm)	Código
UPLC BEH C18	2.1	50	1.7	#parte: 186002350

5.3. Especificaciones espectrométricas

A) Parámetros de ionización	ANALITO	ESTÁNDAR INTERNO
Capilar (kV)	3	
Cono (V)	28	28
Extractor (V)	1	
RF lens (V)	0.1	
Temperatura del "Source" (°C)	130	
Temperatura de desolvatación (°C)	420	
Flujo de gas-Cono-(L/h)	60	
Flujo de gas-desolvatación-(L/h)	700	

A) Parámetros del analizador	ANALITO	ESTÁNDAR INTERNO
LM 1 Resolution	15	
HM 1 Resolution	15	
Ion Energy 1	0.3	
Entrance	5	
Collision	20	25
Exit	5	
LM 2 Resolution	15	
HM 2 Resolution	15	
Ion Energy 2	2.0	
Multiplier (V)	650	
Dwell (mseg)	0.2	0.2

5.4. Preparación de soluciones y reactivos

Nota: El metotrexato es un fármaco fotosensible, por lo que debe de protegerse de la luz.

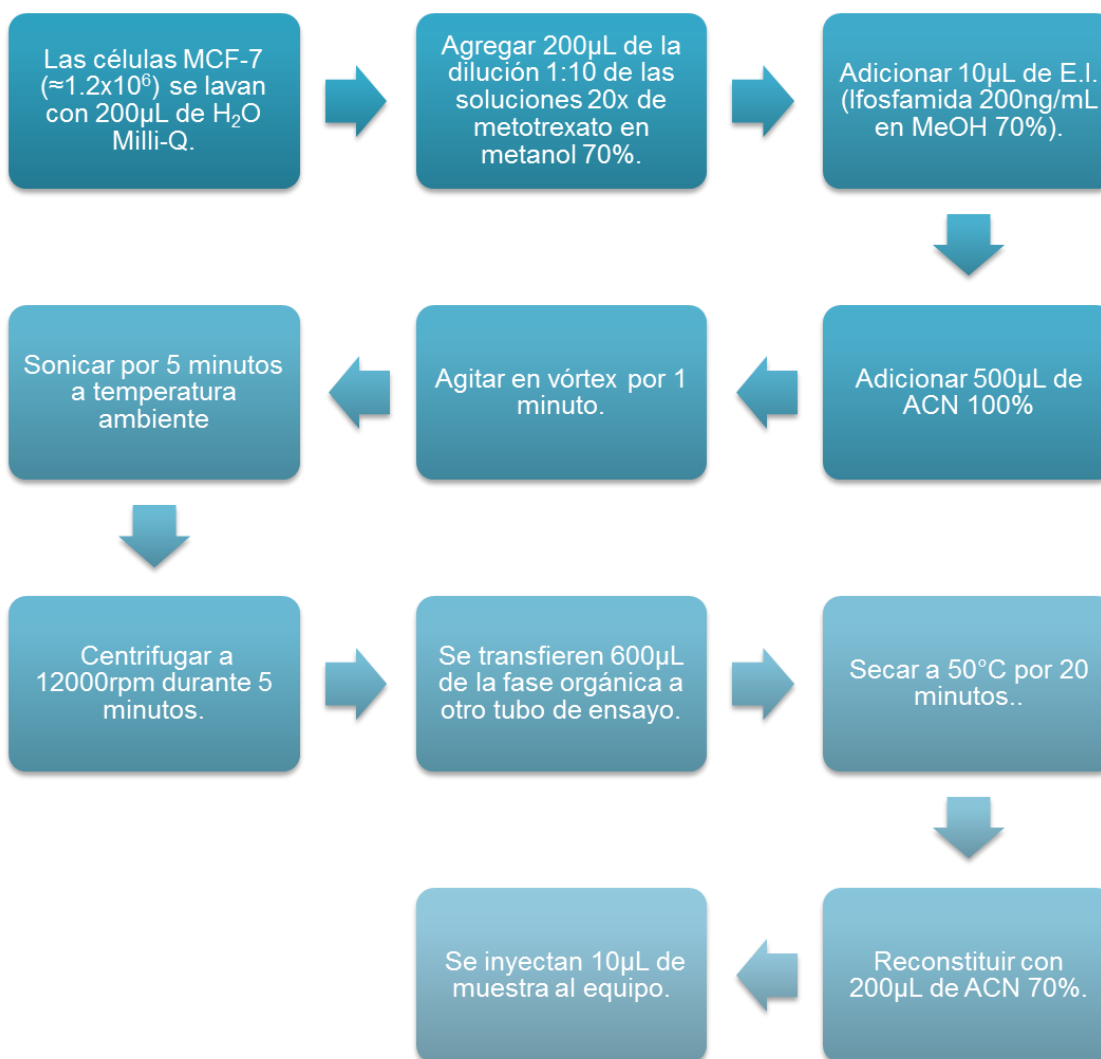
- **Solución A:** Metotrexato [1mg/mL] [1,000,000 ng/mL] 10.0mL
Pesar 0.010 g de metotrexato, disolver con MeOH 70% y aforar a 10.0mL con MeOH 70%, almacenar a -80°C. Se adicionó 10µL NH₄OH [28-30°C]
- A partir de la solución A se realizaron diluciones, obteniendo concentraciones de metotrexato de 100,000ng/mL, 10,000ng/mL y 1,000ng/mL.
- **Solución I de:** Ifosfamida [1mg/mL] 10.0mL
Pesar 0.010g de Ifosfamida, disolver y aforar a 10.0mL con MeOH 70% v/v, almacenar a 4°C.
- A partir de la solución I se realizaron diluciones, obteniendo concentraciones de Ifosfamida de 100,000ng/mL, 10,000ng/mL y 200ng/mL.
- **Lavado fuerte:** H₂O:ACN:MeOH:2-Isopropanol 25:25:25:25 % v/v 500mL.
Medir por separado y mezclar 125mL de MeOH HPLC y 125mL de 2-Isopropanol HPLC; 125mL de ACN, 125mL H₂O milli-Q degasificar en baño ultrasonido por 5min.
- **Lavado débil:** ACN: H₂O 50:50% v/v 500mL.
Medir por separado y mezclar 50mL de agua y 50mL de ACN; degasificar en baño ultrasonido por 5 min.
- **Lavado de sellos:** Acetonitrilo: Agua 10:90 v/v 500mL.
Medir por separado y mezclar 50mL de acetonitrilo y 450mL de agua HPLC; degasificar en baño ultrasonido por 5 min.

5.5. Técnica extractiva: Líquido-Líquido

La técnica de extracción líquido-líquido consiste en la recuperación del metotrexato dentro de la célula por medio de disolventes adecuados, en este caso se utilizó el ACN 100%. Se utilizaron las soluciones de trabajo 20x del metotrexato que se muestran en el apartado 4.6.a.

Una vez que se obtiene la fase orgánica, que es donde se encuentra el fármaco se seca y es reconstituida con ACN 70% para posteriormente inyectar 10µL al equipo.

El procedimiento detallado se encuentra a continuación:



5.6. Curva de calibración y puntos control

a. Soluciones de trabajo 20X

No.	Nivel	Concentración (ng/mL)	Vol. Solución madre (µL)	Aforo final (mL)
1	CC1	10	100	10
2	CC2	25	250	10
3	CC3	50	500	10
4	CC4	100	1000	10
5	CC5	150	1500	10
6	CC6	200	2000	10
7	PC1	30	300	10
8	PC2	60	600	10
9	PC3	120	1200	10

b. Curva de calibración

No.	Nivel	Concentración final (ng/mL)	Vol. Solución de trabajo (µL)	Volumen celular (µL)
1	CC1	0.100	950	50
2	CC2	0.250	950	50
3	CC3	0.500	950	50
4	CC4	1.000	950	50
5	CC5	1.500	950	50
6	CC6	2.000	950	50
7	PC1	0.300	950	50
8	PC2	0.600	950	50
9	PC3	1.200	950	50

5.7. Desempeño del sistema

Punto CC: Ifosfamida Concentración: 100ng/mL MeOH 70% Vol. De inyección: 3mL.

Punto CC: Metotrexato Concentración: 100ng/mL MeOH 70% Vol. De inyección: 3mL.

Punto CC: ACN Concentración: 50:50 v/v Vol. De inyección: 3mL.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se muestra el espectro de masas y cromatograma del ion padre y los iones hijos del metotrexato obtenido por UPLC-MS/MS, figura 21 y 22, respectivamente.

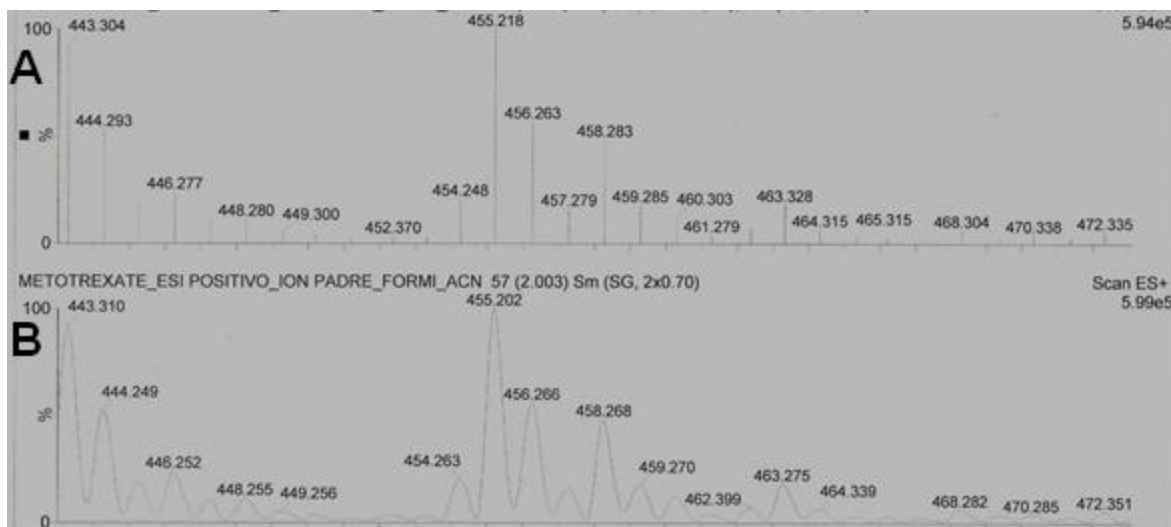


Figura 21. Resultados obtenidos por UPLC-MS/MS (ESI+). Ion padre, metotrexato solución 1000ng/mL en MeOH-Agua (50% v/v). A) Espectro de masas. B) Cromatograma.

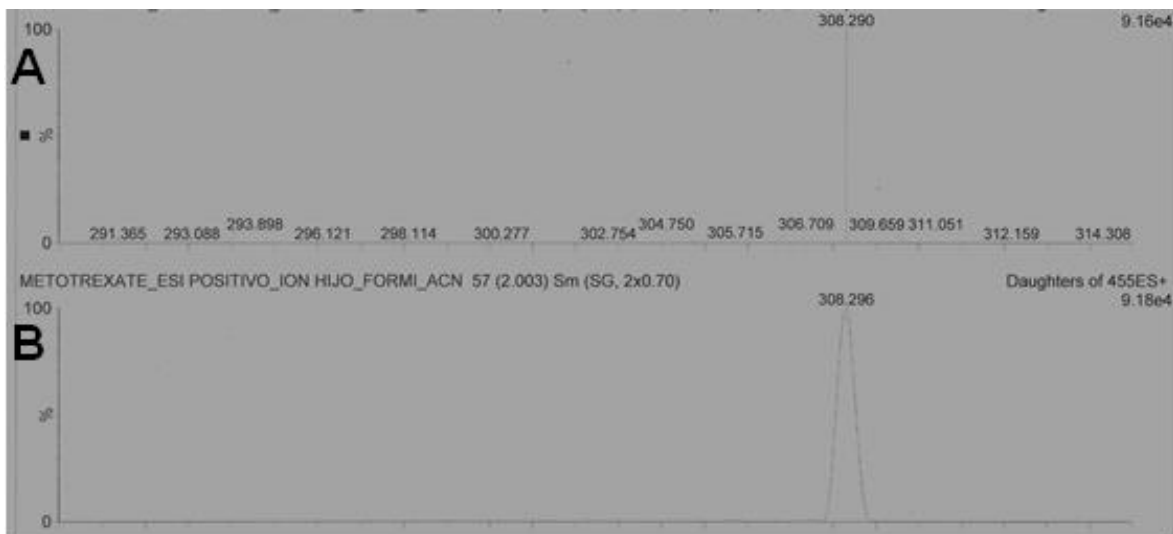


Figura 22. Resultados obtenidos por UPLC-MS/MS (ESI+). Iones hijo, metotrexato solución 1000ng/mL en MeOH-Agua (50% v/v). A) Espectro de masas. B) Cromatograma.

Cada pico representa un fragmento de la molécula donde cada uno de estos fragmentos corresponde a un ión. La información proporcionada incluye la relación m/z y la intensidad relativa de cada señal. Como la mayor parte de los iones formados tiene carga igual a uno, las relaciones m/z corresponden con sus masas. A la señal más intensa, denominada pico base, se le asigna el valor 100, que como se puede observar en el espectro del ión padre corresponde a una masa de 455.218, que sería la del metotrexato protonado. Éste da como producto un ión con una señal intensa que corresponde a una relación de m/z de 308.290.

Los resultados de la validación que se muestran a continuación se encuentran basados en los criterios y requisitos contenidos en el apartado 9.1, que se refiere a la “Validación de métodos analíticos (características de desempeño)”, de la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013.

6.1. Selectividad

Debido a que las células utilizadas no se expusieron a ningún otro fármaco no se realizó el estudio de selectividad.

6.2. Efecto de la matriz para métodos por espectrometría de masas

Se analizaron individualmente 6 unidades de matriz blanco. Se extrajo cada muestra blanco de matriz, posteriormente se adicionó el analito y el estándar interno en solución para obtener la respuesta analítica correspondiente (Tabla 7).

Se compararon las respuestas analíticas obtenidas respecto a las respuestas del analito y el EI en solución. Para cada unidad se obtuvo un FMN por el EI, conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{[Respuesta\ del\ analito\ en\ la\ matriz / Respuesta\ del\ estándar\ interno\ en\ la\ matriz]}{[Respuesta\ del\ analito\ en\ solución / Respuesta\ del\ estándar\ interno\ en\ solución]}$$

Tabla 7. Efecto de la matriz.

Tipo	Concentración nominal (ng/mL)	Respuesta analito (matriz)	Respuesta EI (matriz)	Respuesta analito (solución)	Respuesta EI (solución)	FMN
Estándar CC1	0.100	20.450	190.963	25.170	208.961	0.889
Estándar CC2	0.250	52.163	224.223	56.411	248.159	1.023
Estándar CC3	0.500	104.714	239.862	107.110	214.947	0.876
Estándar CC4	1.000	189.485	256.174	192.291	211.585	0.814
Estándar CC5	1.500	277.141	243.473	287.886	200.207	0.792
Estándar CC6	2.000	385.215	263.622	376.264	213.37	0.829
Promedio						0.870
SD						0.084
%CV						9.6

Para esta prueba se obtuvo un %CV de 9.6% del FMN calculado de las 6 unidades de matriz, el cual al ser menor al 15% indica que no hubo efecto de la matriz para el método.

6.3. Efecto de acarreo o arrastre para métodos por espectrometría de masas

El efecto de acarreo es definido por la NOM-177-SSA1-2013 como; el efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores.

Para determinarlo se realizaron 3 inyecciones de la misma muestra blanco, una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación (2.00ng/mL). Los resultados se muestran en la figura 23.

Como se logra observar no existen interferencias próximas al tiempo de retención del analito ni del estándar interno.

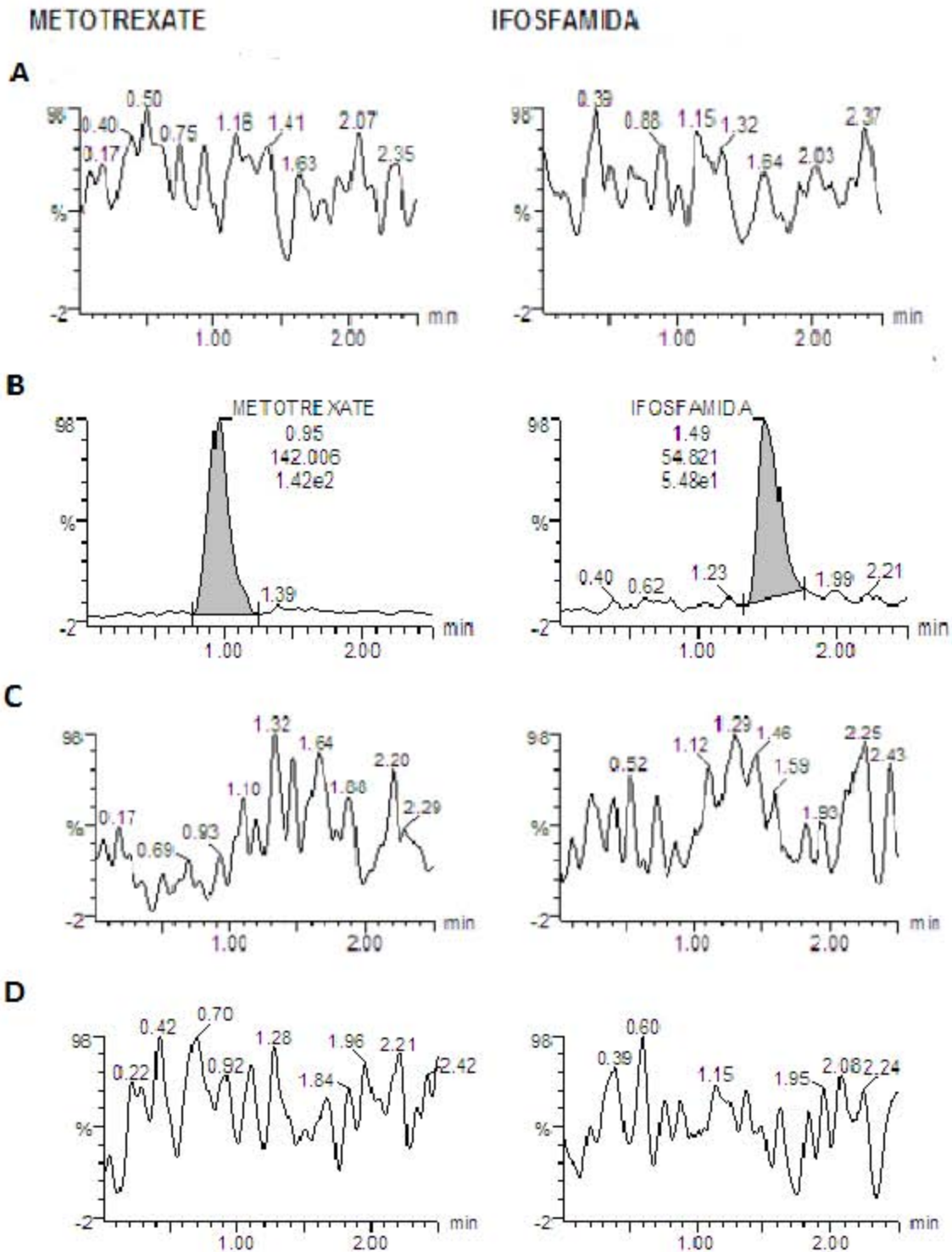


Figura 23. Cromatogramas obtenidos para determinación de efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas. A) Muestra blanco, inyección 1. B) Inyección límite superior de cuantificación. C) Muestra blanco, inyección 2. D) Muestra blanco, inyección 3.

6.4. Límite inferior de cuantificación

El límite inferior de cuantificación se determina con base en el 5% de la concentración máxima, la cual es de 2.000ng/mL, por lo que el límite inferior de cuantificación correspondería a 0.100ng/mL. Por lo que se inyectaron por quintuplicado controles a dicha concentración, posteriormente se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el %CV.

Tabla 9. Datos obtenidos límite inferior de cuantificación.

Punto	Tipo	Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	%Desviación
LC1	QC	0.100	0.108	8.0
LC2	QC	0.100	0.106	6.0
LC3	QC	0.100	0.114	14.0
LC4	QC	0.100	0.110	10.0
LC5	QC	0.100	0.097	3.0
LC6	QC	0.100	0.095	5.0
		Promedio	0.105	7.7
		SD	0.007	
		%CV	7.13	

Se obtuvo un promedio de 0.105ng/mL y un %CV de 7.13%, por lo que se encuentra dentro de los parámetros establecidos.

6.5. Curva de calibración

Se realizaron 6 curvas de calibración, las cuales se muestran en la tabla 10, con seis concentraciones distintas; 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 ng/mL además de los puntos control MCB, MCM y MCA que se evaluaron por duplicado y corresponden a concentraciones de 0.30, 0.60 y 1.20 respectivamente.

La linealidad del método en el intervalo de concentración estudiado se evaluó obteniendo un modelo matemático que describiera adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta, la cual debe ser continua y reproducible. Además de que los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%.

La respuesta del método se obtuvo mediante la relación:

$$\text{Concentración}_{\text{analito}} = \text{Área}_{\text{analito}} * (\text{Concentración}_{\text{EI}} / \text{Área}_{\text{EI}}).$$

Tabla 10. Respuesta del método [Área bajo el pico en Unidades arbitrarias (UA)].

Punto de la curva	Concentración nominal (ng/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Promedio	SD
CC1	0.10	2.328	1.341	0.771	0.995	1.730	1.577	1.457	0.556
CC2	0.25	5.219	3.821	2.988	2.971	3.947	2.702	3.608	0.935
CC3	0.50	9.913	9.432	6.773	7.257	8.858	6.871	8.184	1.384
CC4	1.00	17.788	18.060	14.749	13.966	16.029	14.716	15.885	1.715
CC5	1.50	24.781	27.577	20.65	20.985	23.444	21.717	23.192	2.658
CC6	2.00	34.807	34.889	26.986	26.544	32.609	26.546	30.397	4.143
MCB	0.30	5.120	5.710	4.304	2.337	4.412	3.959	4.307	1.153
MCM	0.60	11.907	11.459	8.371	8.451	8.988	8.660	9.639	1.604
MCA	1.20	21.896	20.358	16.717	17.599	19.785	16.763	18.853	2.140
MCB	0.30	5.524	4.590	4.341	4.218	5.226	3.959	4.643	0.610
MCM	0.60	11.088	11.049	7.994	7.102	10.786	8.743	9.460	1.741
MCA	1.20	20.580	20.468	16.753	16.395	20.815	19.455	19.078	1.998

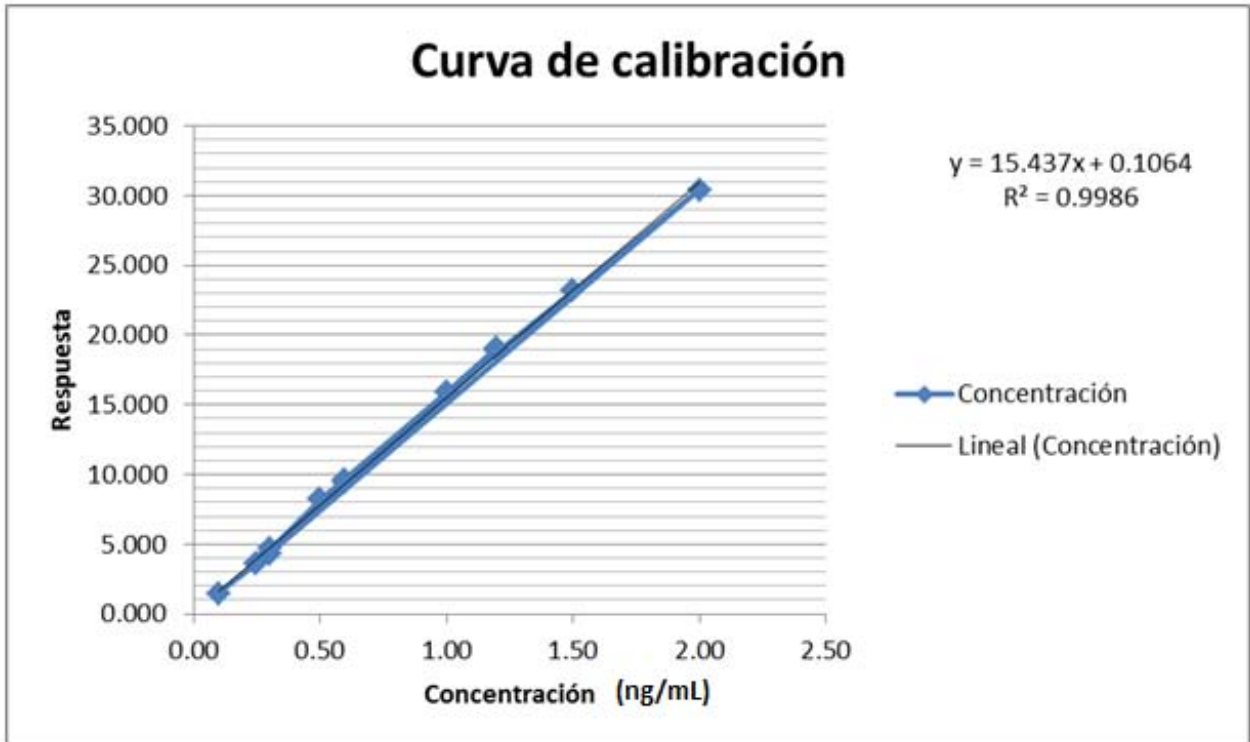


Figura 24. Curva de calibración del método.

La concentración del metotrexato se determina mediante la ecuación de la recta:

$$y=15.437x+0.1064$$

Donde:

y=Respuesta del método

x=Concentración del metotrexato

Tabla 11. Concentración en ng/mL obtenida de cada punto de las curvas y porcentaje de desviación.

Punto de la curva	CC1	CC2	CC3	CC4	CC5	CC6	MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA
Concentración nominal (ng/mL)	0.100	0.250	0.500	1.000	1.500	2.000	0.300	0.600	1.200	0.300	0.600	1.200
Curva 1	0.105	0.224	0.528	0.984	1.574	1.937	0.277	0.603	1.164	0.292	0.582	1.084
Curva 2	0.085	0.225	0.568	1.054	1.533	1.875	0.303	0.676	1.102	0.266	0.603	1.254
Curva 3	0.082	0.252	0.513	1.105	1.465	1.922	0.343	0.634	1.258	0.344	0.608	1.295
Curva 4	0.09	0.249	0.557	1.049	1.423	1.981	0.305	0.602	1.235	0.328	0.558	1.262
Curva 5	0.089	0.263	0.546	0.966	1.518	1.966	0.28	0.522	1.036	0.277	0.534	1.045
Curva 6	0.114	0.231	0.439	1.013	1.619	1.935	0.288	0.597	1.158	0.297	0.582	1.221
Promedio	0.094	0.241	0.525	1.029	1.522	1.936	0.299	0.606	1.159	0.301	0.578	1.194
SD	0.013	0.016	0.047	0.051	0.071	0.037	0.024	0.051	0.082	0.030	0.028	0.103
CV (%)	13.32	6.73	8.88	4.97	4.67	1.91	8.12	8.37	7.11	9.95	4.83	8.66
%Desviación	5.8	3.7	5.0	2.9	1.5	3.2	0.2	0.9	3.4	0.2	3.7	0.5

La curva de calibración obtenida con las concentraciones distintas y los controles evaluados resultó ser lineal con una ecuación de la recta $y=15.437x+0.1064$ y un coeficiente de correlación de **0.9986**.

Por lo que la relación entre la concentración y la respuesta es continua y reproducible. Además de que los datos de concentración recuperada de la curva de calibración se encontraron dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel.

6.6. Precisión

La precisión de un método se evalúa con la repetibilidad y la reproducibilidad, las cuales se muestran a continuación.

6.6.1. Repetibilidad

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado las muestras control MCB, MCM y MCA y se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

Los resultados se presentan en la tabla 12, en donde se muestra también el %CV del valor promedio el cual no debe ser mayor del 15%.

Tabla 12. Datos obtenidos de repetibilidad del método.

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)
MCB = 0.300	0.287
	0.26
	0.209
	0.289
	0.315
Promedio	0.272
SD	0.040
%CV	14.79
MCM = 0.600	0.648
	0.521
	0.554
	0.532
	0.61
Promedio	0.573
SD	0.054
%CV	9.45
MCA = 1.200	1.036
	1.086
	1.062
	1.192
	1.046
Promedio	1.0844
SD	0.063
%CV	5.81

6.6.2. Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en tres días diferentes, las muestras control MCB, MCM y MCA. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

El criterio de aceptación es el %CV del valor promedio, el cual no debe ser mayor al 15%.

Tabla 13. Datos obtenidos de reproducibilidad del método.

Día	MCB [0.300ng/mL]	MCM [0.600ng/mL]	MCA [1.2ng/mL]
19-Mayo-2015	0.287	0.648	1.036
	0.26	0.521	1.086
	0.209	0.554	1.062
	0.289	0.532	1.192
	0.315	0.61	1.046
20-Mayo-2015	0.337	0.681	1.308
	0.291	0.577	1.329
	0.307	0.607	1.301
	0.299	0.646	1.245
	0.307	0.657	1.317
21-Mayo-2015	0.328	0.56	1.161
	0.312	0.518	1.227
	0.307	0.631	1.102
	0.317	0.633	1.199
	0.284	0.618	1.256
Promedio	0.297	0.600	1.191
S.D.	0.031	0.052	0.100
%CV	10.39	8.76	8.42

El método resultó ser preciso ya que el promedio de los cinco controles de cada nivel, tanto de repetibilidad como de reproducibilidad, se encontró dentro del 15% de variación respecto al valor nominal.

6.7. Exactitud

Para determinar que un método es exacto se debe calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) de los datos de repetibilidad y reproducibilidad.

El porcentaje de desviación se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{Desviación} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{concentración obtenida}}{\text{Concentración nominal}} * 100 \right|$$

Como criterio de aceptación se tiene que el valor promedio del % de desviación debe ser menor o igual a 15%.

Tabla 14. Datos obtenidos exactitud (repetibilidad).

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.287	4.3
	0.260	13.3
	0.209	30.3
	0.289	3.7
	0.315	5.0
	Promedio	11.3
MCM = 0.600	0.648	8.0
	0.521	13.2
	0.554	7.7
	0.532	11.3
	0.610	1.7
	Promedio	8.4
MCA = 1.2	1.036	13.7
	1.086	9.5
	1.062	11.5
	1.192	0.7
	1.046	12.8
	Promedio	9.6

Tabla 15. Datos obtenidos exactitud (reproducibilidad).

Día	MCB [0.300ng/mL]	% Desviación	MCM [0.600ng/mL]	% Desviación	MCA [1.2ng/mL]	% Desviación
19-may-15	0.287	4.3	0.648	8.0	1.036	13.7
	0.260	13.3	0.521	13.2	1.086	9.5
	0.209	30.3	0.554	7.7	1.062	11.5
	0.289	3.7	0.532	11.3	1.192	0.7
	0.315	5.0	0.610	1.7	1.046	12.8
20-may-15	0.337	12.3	0.681	13.5	1.308	9.0
	0.291	3.0	0.577	3.8	1.329	10.8
	0.307	2.3	0.607	1.2	1.301	8.4
	0.299	0.3	0.646	7.7	1.245	3.8
	0.307	2.3	0.657	9.5	1.317	9.8
21-may-15	0.328	9.3	0.560	6.7	1.161	3.2
	0.312	4.0	0.518	13.7	1.227	2.3
	0.317	5.7	0.631	5.2	1.102	8.2
	0.284	5.3	0.633	5.5	1.199	0.1
	0.217	2.3	0.618	3.0	1.256	4.7
Promedio desviación		6.9		7.4		7.2

Se calculó el porcentaje de desviación, obteniendo para el promedio de cada nivel un porcentaje de desviación menor al 15%, por lo que cumple con el criterio de aceptación para los datos de repetibilidad y reproducibilidad.

6.8. Recobro absoluto

Se analizaron por quintuplicado los controles MCB, MCM y MCA en la matriz biológica. Se comparó la concentración obtenida del metotrexato después de haber realizado la extracción, dividiéndola entre la concentración del metotrexato en solución y multiplicando por 100, obteniendo así el porcentaje de recobro para cada muestra.

Posteriormente se obtuvo el promedio del recobro de cada nivel y el global (tabla 16).

Tabla 16. Recobro absoluto obtenido.

Muestra (MTX en solución)	MTX en Extracción.	%Recobro
MCB 0.300ng/mL	0.267	89.0
	0.260	86.7
	0.255	85.0
	0.294	98.0
	0.241	80.3
	0.251	83.7
Promedio.	0.261	87.1
S.D.	0.02	6.08
%CV.	6.98	6.98
Recobro.		87.1
MCM 0.600ng/mL	0.496	82.7
	0.488	81.3
	0.488	81.3
	0.456	76.0
	0.472	78.7
	0.466	77.7
Promedio.	0.48	79.61
S.D.	0.02	2.57
%CV.	3.23	3.23
Recobro.		79.6
MCA 1.200ng/mL	1.017	84.8
	1.038	86.5
	1.006	83.8
	1.012	84.3
	1.035	86.3
	0.997	83.1
Promedio.	1.018	84.8
S.D.	0.02	1.35
%CV	1.59	1.59
Recobro.		84.8
Recuperación global		
Promedio global.		83.83%

Ya que el recobro absoluto no es un parámetro que se encuentre definido en la NOM-177-SSA1-2013, no existe un criterio de aceptación, el recobro absoluto obtenido fue de 83.83%.

6.9. Estabilidad de la muestra

En el apartado 9.1.9.8 se establecen los parámetros para evaluar la estabilidad de la muestra y demostrar que el fármaco es estable durante su manejo, almacenamiento y procesamiento analítico.

Se evaluó por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de MCB y MCA, analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo.

Las muestras control se interpolaron en una curva de calibración recién preparada (el día del ensayo) y las concentraciones obtenidas se comparan contra la concentración nominal.

El criterio de aceptación para demostrar que la muestra es estable es que el porcentaje de desviación de la concentración promedio sea menor o igual al 15%.

6.9.1 Estabilidad a corto plazo

Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra, en este caso se evaluó después de 3 horas.

**Tabla 17. Estabilidad a corto plazo (3horas).
Concentración recuperada y % de desviación.**

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.331	10.3
	0.299	0.3
	0.342	14.0
	0.310	3.3
	0.316	5.3
Promedio	0.3196	6.6
SD	0.017	
%CV	5.33	
MCA = 1.200	1.196	0.3
	1.131	5.8
	1.376	14.7
	1.195	0.4
	1.156	3.7
Promedio	1.211	4.98
SD	0.096	
%CV	7.96	

6.9.2. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la estabilidad del analito en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las muestras después de 10 días.

**Tabla 18. Estabilidad a largo plazo (10días).
Concentración recuperada y % de desviación.**

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.319	6.3
	0.292	2.7
	0.341	13.7
	0.325	8.3
	0.332	10.7
Promedio	0.322	8.3
SD	0.019	
%CV	5.77	
MCA = 1.200	1.212	1.0
	1.285	7.1
	1.162	3.2
	1.353	12.8
	1.275	6.3
Promedio	1.257	6.05
SD	0.073	
%CV	5.81	

6.9.3. Estabilidad de la muestra procesada

Se evaluó la estabilidad del analito de la muestra procesada a temperatura ambiente, los resultados se muestran a continuación.

**Tabla 19. Estabilidad de la muestra procesada.
Concentración recuperada y % de desviación.**

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.261	13.0
	0.264	12.0
	0.288	4.0
	0.282	6.0
	0.269	10.3
Promedio	0.273	9.1
SD	0.012	
%CV	4.29	
MCA = 1.200	1.102	8.2
	1.300	8.3
	1.375	14.6
	1.108	7.7
	1.204	0.3
Promedio	1.218	7.8
SD	0.120	
%CV	9.81	

6.9.4. Estabilidad en el automuestrador

Se evaluó la estabilidad de analito en la muestra a la temperatura del automuestrador.

**Tabla 20. Estabilidad en el automuestrador (8hrs).
Concentración recuperada y % de desviación.**

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.305	26.3
	0.340	1.7
	0.328	13.3
	0.298	9.3
	Promedio	0.318
SD	0.020	10.3
%CV	6.17	
MCA = 1.200	1.128	
	1.245	8.2
	1.275	8.3
	1.236	14.6
	1.151	7.7
	Promedio	1.207
SD	0.064	7.8
%CV	5.29	

6.9.5. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación

Se determinó la estabilidad del analito en la matriz biológica, almacenado a temperatura de -80°C por 12 horas, posteriormente se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por 12 horas. Se realizaron 3 ciclos de congelación-descongelación y posteriormente se analizaron las muestras.

**Tabla 21. Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.
Concentración recuperada y % de desviación.**

Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
MCB = 0.300	0.326	8.7
	0.272	9.3
	0.334	11.3
	0.290	3.3
	0.337	12.3
Promedio	0.312	9.0
SD	0.029	
%CV	9.34	
MCA = 1.200	1.298	8.2
	1.536	28.0
	1.338	11.5
	1.233	2.8
	1.233	2.8
Promedio	1.328	10.6
SD	0.125	
%CV	9.40	

Se evaluó la estabilidad a corto plazo en un tiempo de 3 horas, la estabilidad a largo plazo por un tiempo de 10 días manteniendo la muestra almacenada a temperatura de -80°C , la estabilidad de la muestra procesada a temperatura ambiente, la estabilidad en el automuestrador durante 8 horas y la estabilidad tras realizar 3 ciclos de congelación-descongelación.

Posteriormente se obtuvo el %CV y el porcentaje de desviación. En todas las pruebas de estabilidad se cumplió con el criterio de aceptación, es decir las muestras tuvieron un %CV menor al 15%. Por lo tanto se puede concluir que la muestra es estable a las condiciones a las cuales fue tratada.

6.10. Resultados cinética del metotrexato en leucocitos.

A continuación se muestran los resultados de la cinética de tiempo que se realizó para la cuantificación de metotrexato dentro de leucocitos obtenidos a partir de voluntarios sanos.

Tabla 22. Cinética del metotrexato en leucocitos.

Nombre	Tiempo (h)	Concentración (ng/mL)
Muestra 1	2	24.002
	4	13.306
	6	9.009
	24	12.3
Muestra 2	2	45.264
	4	14.69
	6	9.518
	24	14.34

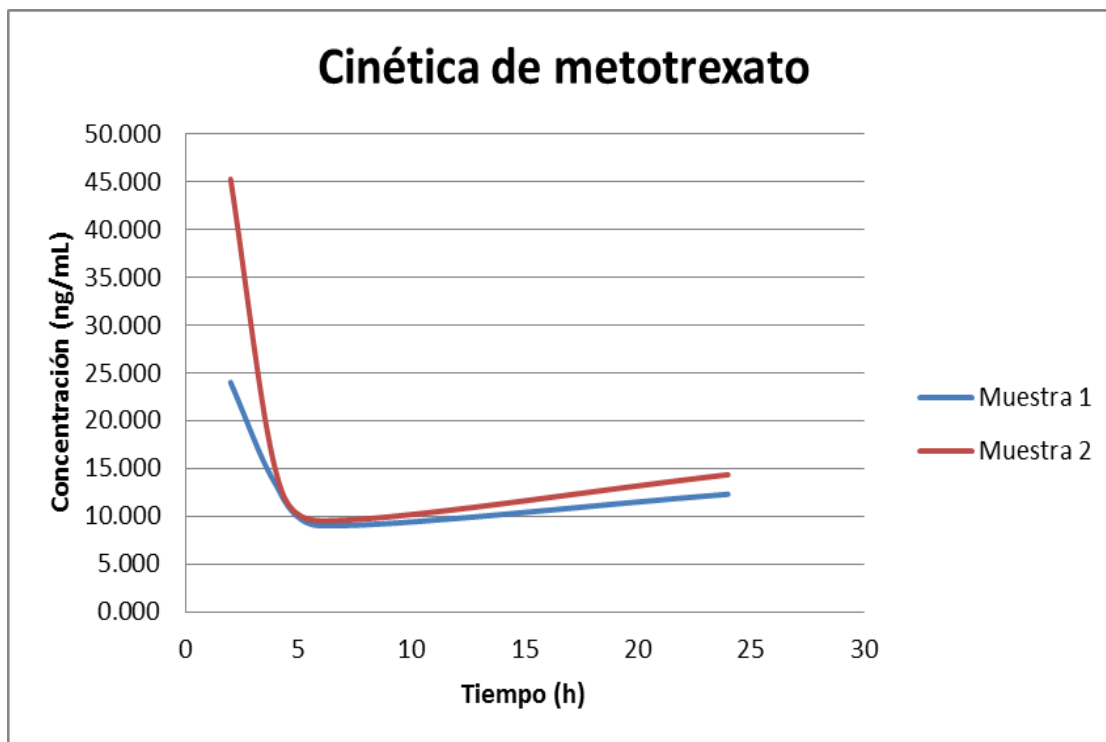


Figura 25. Cinética metotrexato

Después de haber expuesto a los leucocitos a una concentración de $10\mu\text{g/mL}$ por 2, 4, 6 y 24 horas incubando a 37°C a una atmósfera de 5% de CO_2 se realizó la extracción líquido-líquido del metotrexato y posteriormente se cuantificó.

Como se logra observar en la tabla 22 así como en la figura 25, a medida que pasa el tiempo existe una disminución en la concentración de metotrexato, sin embargo, pasadas 6 horas se observa un ligero aumento de la concentración de éste. Esto puede deberse a la conversión de los metabolitos poliglutamados a metotrexato por medio de la enzima γ -glutamil hidrolasa lisosomal, lo que incrementa la eficiencia del metotrexato.

Los niveles de metotrexato dentro de los leucocitos muestran niveles muy bajos comparado con la solución a la que fueron expuestos, tan sólo la muestra 2 a las 2 horas contiene cerca del 0.45% del metotrexato contenido en el medio. Esto indica que ingresa una mínima parte del metotrexato total a la célula blanco.

A las dos horas se muestra la mayor concentración, lo cual se encuentra reportado en la literatura como el t_{max} en sangre.

6.11. Resultados cuantificación de metotrexato en leucocitos.

En cuanto a la cuantificación del metotrexato en leucocitos expuestos a diferentes concentraciones del fármaco se resume a continuación en la tabla 23, en la cual se muestra la concentración adicionada a los leucocitos y la que se obtuvo en su cuantificación (concentración obtenida).

Tabla 23. Cuantificación de metotrexato en leucocitos.

Nombre	Tipo	Concentración adicionada (µg/mL)	Concentración obtenida (ng/mL)
C1	Voluntario 1	2.000	1.748
C2		5.000	1.271
C3		10.000	4.713
C4		20.000	8.940
C5		40.000	25.327
C1	Voluntario 1 (Repetición)	2.000	1.807
C2		5.000	3.597
C3		10.000	7.029
C4		20.000	20.533
C5		40.000	30.900
C1	Voluntario 2	2.000	2.181
C2		5.000	3.033
C3		10.000	3.875
C4		20.000	8.940
C5		40.000	11.137
C1	Voluntario 2 (Repetición)	2.000	1.751
C2		5.000	4.579
C3		10.000	6.329
C4		20.000	7.629
C5		40.000	30.900

Se expusieron a los leucocitos a grandes cantidades de metotrexato teniendo en cuenta que se está utilizando espectrometría de masas, esto se debió a que anteriormente se probó la cuantificación del metotrexato con HPLC-UV sin embargo no se logró realizar, ya que a pesar de que los leucocitos fueron expuestos a grandes concentraciones no se observaba señal alguna, es por ello que se optó por colocar las concentración que se muestran en la tablas 22 y 23.

Ya que se obtuvieron concentraciones más altas a la curva de calibración realizada, se elaboró otra que se encuentra en un intervalo de 1.000-20.000ng/mL, la cual se muestra a continuación.

Tabla 24. Datos curva de calibración 2.

Nombre	Concentración nominal (ng/mL)	Concentración recuperada (ng/mL)	% Desviación
CC1	1.000	1.1	14.0
CC2	2.500	2.4	5.4
CC3	5.000	4.6	8.6
CC4	10.000	9.9	0.9
CC5	15.000	14.0	6.9
CC6	20.000	21.5	7.7
MCB	3.000	3.3	10.4
MCM	6.000	5.6	5.9
MCA	12.000	12.0	0.0

Se obtuvo un coeficiente de relación de 0.996235 y $r^2=0.992484$, lo cual indica que la curva es lineal.

6.12. Resultados cuantificación de Metotrexato en muestra de paciente por UPLC-MS/MS.

A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de la cuantificación del metotrexato en la muestra de un paciente ingresado en el INP después de 2 horas de haber recibido tratamiento con metotrexato. Los resultados que se obtuvieron con respecto a sangre y plasma corresponden a un método desarrollado en el INP que corresponde a otros proyectos, sin embargo se colocaron para realizar la comparación de los datos.

A los leucocitos se les realizó la extracción líquido-líquido y posteriormente se cuantificó el fármaco.

Tabla 25. Resultados muestra de paciente.

Muestra	Tiempo (h)	Concentración recuperada (ng/mL)
Plasma	2	35.4
Sangre	2	14.3
Leucocitos	2	0.1

Se encontró la mayor concentración en plasma, posteriormente en sangre y por último en leucocitos. Se observa de igual manera que en los leucocitos existe una mínima cantidad de metotrexato.

7. CONCLUSIONES

Se realizó el desarrollo de la técnica para la cuantificación de metotrexato dentro de leucocitos. Se había planteado realizar la cuantificación por medio de HPLC-UV, sin embargo al obtener niveles no detectables se tuvo que recurrir a un método más sensible como es la espectrometría de masas.

La validación del método garantiza que los resultados que se obtendrán serán confiables y reproducibles dentro de las condiciones especificadas. Ya que los resultados obtenidos se encontraron dentro de los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013, se puede afirmar que se obtuvo un método lineal, sensible, preciso y exacto que se encuentra validado dentro del laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Pediatría.

8. PERSPECTIVAS

El desarrollo de un método analítico que permita cuantificar metotrexato dentro de los leucocitos por medio de una técnica altamente sensible como es el UPLC-MS/MS es relevante para el tratamiento de LLA en niños, ya que conociendo los niveles de éste fármaco dentro de la célula blanco y relacionándolos con los polimorfismos de un solo nucleótido se puede obtener una terapia para cada paciente, en la cual se disminuya el número de efectos tóxicos y aumente la eficiencia del fármaco.

Otra de las perspectivas es la cuantificación de los metabolitos poliglutamados del metotrexato, el MTX-Glu₂ y MTX-Glu₃, dentro de los leucocitos, para así conocer la concentración de cada uno de ellos y la cinética de éstos con respecto al tiempo.

9. REFERENCIAS

1. Chong C., Fawcett P., Mikov M., Tucker I. 2009. *Simultaneous determination of methotrexate and its polyglutamate metabolites in Caco-2 cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **50**: 262-266.
2. Kliegman R., Behrman R., Jenson H., Stanton B. (2009). *Nelson, Tratado de pediatría. Volumen II* (18ª ed.). Barcelona, España: Elsevier. Pp. 2116-2200
3. Ruíz G. (2009) *Fundamentos de hematología*. (4ª ed.). México: Editorial Médica Panamericana. P. 143.
4. Chávez, J. et al. *Farmacogenética del transporte de metotrexato y su relación con las concentraciones del fármaco en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda*. Instituto Nacional de Pediatría.
5. *Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México*. Secretaria de salud. Subsecretaria de prevención y promoción de la salud. Dirección General de epidemiología. 2011.
6. *Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento*. Instituto Nacional de Salud Pública.
7. Guyton A., Hall J. (2011) *Tratado de fisiología médica*. (12º ed.). España: Elsevier. Pp. 429-431.
8. Cheok M., Evans W. 2006. *Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy*. Nature Rev. Cancer. **6**:117–129.
9. Rang H. et al.(2008). *Farmacología*. (6º ed.). Barcelona, España: Elsevier. Pp. 10, 102, 109, 240, 241, 718, 719.
10. Metotrexato filaxis.
http://www.filaxis.com/pdf/metotrexato_prosp_12-01.pdf.
Consultado el 10 de Junio de 2015.

11. Sogorb M., Vilanova E. (2004) *Técnicas analíticas de contaminantes químicos. Aplicaciones toxicológicas medioambientales y alimentarias*. Díaz de Santos. P. 271, 272.
12. McLafferty F. *Interpretación de los espectros de masas*. Barcelona, España: Reverté.
13. Rodin I., Braun A., Stavrianidi A., Shpigun O. *A validated LC-MS/MS method for rapid determination of methotrexate in human saliva and its application to an excretion evaluation study*. 2013. *Journal of chromatography B*. **937**:1-6.
14. Heras A. *Separación de micotoxinas mediante UPLC acoplado a espectrometría de masas en tándem*.
15. Gil-Loyzaga. *Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en la medicina regenerativa*. Pp. 36-47, 58.
16. <http://www.mcf7.com/> consultado el 01 de Julio de 2015.
17. <http://www.celeromics.com/es/Soporte/cell-lines/mcf-7.php> consultado el 01 de Julio de 2015.
18. *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An introduction*. (2005). (www.chromatographyonline.com) Consultado el 06 de Julio de 2015.
19. http://www.cancer.gov/espanol/tipos/mieloproliferativas/paciente/tratamiento-mielodisplasicos-pdq#section/_1 Consultado el 20 de Mayo de 2015.
20. <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf> Consultado el 27 de Junio de 2015.
21. Sierra I., Pérez D., Gómez S., Morante S. (2010). *Análisis instrumental*. España. Netbiblo. P. 3-16.

22. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
23. Mo X., Wen Y., Ren B., Chen J., Xu C., Wang X., Huang M., Chen X. 2012. *Determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after low-dose methotrexate therapy in Chinese patients with rheumatoid arthritis*. Journal of Chromatography. **907**: 41-48.
24. Koufopantelis P., Georgakakou S., Kazanis M., Giaginis C., Mareli A., Papaniri S., Panderi I. 2009. *Direct injection liquid chromatography/positive ion electrospray ionization mass spectrometric quantification of methotrexate, folinic acid, folic acid and ondansetron in human serum*. Journal of chromatography B. **877**: 3850-3856.
25. Plascencia G. *Espectrometría de masas*. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2003.
26. Fernández-Lainez C., Vela-Amieva M., Ibarra-González I. *Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría*. Instituto Nacional de Pediatría. Acta Pediátrica México. 2009; 30(5): 258-253.