



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de un método analítico por UPLC acoplado a espectrometría de masas para la cuantificación de metotrexato en sangre de pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda en el Instituto Nacional de Pediatría.

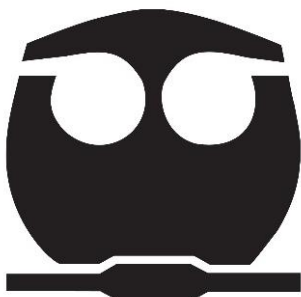
TESIS

Que para obtener el título de:

Química Farmacéutica Bióloga

PRESENTA

Monserrat Salazar Pichardo



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019.



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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: M. en F. RICARDO RODRIGUEZ SAENZ _____

VOCAL: M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ _____

SECRETARIO: Dr. JUAN LUIS CHAVEZ PACHECO _____

1er. SUPLENTE: Q. PATRICIA DÍAZ ARISTA _____

2do. SUPLENTE: Q.B.F. CAROLINA FLORES AVILA _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dr. en C. Juan Luis Chávez Pacheco

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Liliana Rivera Espinosa

SUSTENTANTE:

Montserrat Salazar Pichardo

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesor de Tesis el **Dr. Juan Luis Chávez Pacheco** y a mi Supervisor Técnico la **M. en C. Liliana Rivera Espinosa** por compartir conmigo sus conocimientos y orientarme, los admiro y me siento en deuda por todo lo recibido de su parte.

A **CONACYT**, al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social que financió el proyecto **179406** y me otorgó la beca para que este proyecto se llevara a cabo.

Al **Instituto Nacional de Pediatría**, que me abrió las puertas permitiéndome la realización de la presente tesis, así como a todas las personas que participaron en la misma.

A mis **sinodales**, gracias por darme la oportunidad y por el tiempo que me han dedicado para leer este trabajo.

A mi segunda casa, la H. **Facultad de Química de la UNAM**, por haber recibido de ella mi formación profesional, por los excelentes profesores de los que tuve la oportunidad de aprender, por haberme permitido seguir mi vocación.

DEDICATORIA.

Contenido

Abreviaturas.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. OBJETIVO.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. GENERALIDADES.....	12
4.1 Leucemia linfoblástica aguda.....	12
4.1.1 Epidemiología.....	13
4.1.2 Etiología.....	14
4.1.3 Manifestaciones clínicas.....	15
4.1.4 Diagnóstico.....	16
4.1.5 Tratamiento.....	16
4.2 Metotrexato.....	18
4.2.1 Propiedades fisicoquímicas.....	18
4.2.2 Mecanismo de acción.....	18
4.2.3 Farmacocinética.....	20
4.2.4 Efectos adversos.....	21
4.3 Determinación de metotrexato en sangre.....	22
4.3.1 Técnica de gota de sangre seca (DBS).....	22
4.3.2 Ventajas y desventajas.....	23
4.3.3 Efecto del hematocrito.....	25
4.4 Cromatografía.....	26
4.4.1 Cromatografía líquida.....	26
4.4.2 Cromatografía líquida-espectrometría de masas.....	28
4.5 Validación de métodos analíticos.....	29
4.5.1 Parámetros para validar un método analítico acorde a la NOM-177-SSA1-2013.....	31
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
5.1 Reactivos.....	33
5.2 Desarrollo del método.....	33

5.3 Preparación de soluciones.....	36
5.4 Preparación del hematocrito (HCT).....	37
5.5 Preparación de estándares y controles.....	37
5.6 Obtención de muestras.....	38
5.7 Procesamiento de las muestras (extracción).....	39
5.8 Propuesta final del método analítico.....	41
6. RESULTADOS.....	47
6.1 Condiciones espectrométricas.....	47
6.2 Condiciones cromatográficas.....	48
6.3 Variación del hematocrito.....	48
6.4 Selectividad.....	49
6.5 Efecto de matriz.....	51
6.6 Efecto de acarreo.....	52
6.7 Límite de cuantificación.....	53
6.8 Linealidad del método.....	54
6.9 Precisión y exactitud.....	56
6.10 Estabilidad.....	58
7. APLICABILIDAD DEL MÉTODO.....	62
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	64
9. CONCLUSIONES.....	66
10. REFERENCIAS.....	67

Abreviaturas

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

+/-	Más menos.
%	Por ciento.
µg	Microgramo.
µM	Micromol.
µL	Microlitro.
µm	Micrometro.
µM	Micromol.
°C	Grados Celcius.
ACN	Acetonitrilo.
ADN	Ácido desoxiribonucleico.
CC	Control de calidad.
cGy	Centigray.
Cmáx.	Concentración plasmática máxima.
CV	Coeficiente de Variación.
DBS	Dried Blood Spot (Gota de sangre seca).
EI	Estándar Interno.
ESI(+)	Ionización por electrospray positivo.
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos).
FH4	Tetrahidrofolato.
FMN	Factor de Matriz Nominal.
g	Gramo.
h	Hora.
H ₂ O	Agua.
HCT	Hematocrito.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
INP	Instituto Nacional de Pediatría.
kg	Kilogramos.
KV	Kilovolts.
l	Litros.
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem.
LCR	Líquido cefalorraquídeo.
LIC	Límite Inferior de Cuantificación.
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda.
LLC	Leucemia Linfoblástica Crónica.
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda.
LMC	Leucemia Mielocítica Crónica.
m ²	Metro cuadrado.
MARAM	Esquema de tratamiento con los fármacos: 6-mercaptopurina, MTX, leucovorin, Ara-C, L-Asparaginasa y TIT-MTX+HTC.
MCD	Muestra Control Diluida.
MeOH	Metanol.

min.	Minutos.
mg	Miligramos.
mL	Mililitros.
mm.	Milímetros.
MTX	Metotrexato.
ng	Nanogramo.
NH ₄ OH	Hidróxido de amonio.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PC	Punto control.
pH	Potencial de hidrógeno.
psi.	Libras por pulgada cuadrada.
rpm	Revoluciones por minuto.
SD	Desviación estándar.
SNC	Sistema Nervioso Central.
t _{1/2}	Vida media de eliminación de un fármaco.
Th	Thompson.
T _{máx}	Tiempo transcurrido desde la admón. de un fármaco hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución.
UV	Ultravioleta.
V _d	Volúmen de distribución.
VIMARAM	Esquema de tratamiento con los fármacos: 6-mercaptopurina, MTX, leucovorin, Ara-C, L-Asparaginasa, TIT-MTX+HTC y Vincristina.
V	Volts.
v/v	Volumen/volumen.

1. INTRODUCCIÓN.

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación desordenada de células inmaduras de la línea linfoide que surgen de la célula madre en la médula ósea. Este crecimiento desordenado de las células blancas bloquea el desarrollo normal de los glóbulos rojos y las plaquetas. Es común que la leucemia invada la sangre muy rápidamente y a veces estas células se pueden propagar a otras partes del cuerpo, como a los ganglios linfáticos, el hígado, el bazo, el sistema nervioso central y los testículos.¹ La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más frecuente en los niños representando un 77% de los casos.

El metotrexato es uno de los fármacos mayormente empleados en el esquema quimioterapéutico de niños diagnosticados con LLA. A pesar de su gran efectividad como antineoplásico, se han reportado eventos adversos debido a su elevada toxicidad sistémica. Debido al mecanismo de acción del MTX es necesario monitorear los niveles alcanzados para evitar la citotoxicidad del fármaco. Altos niveles plasmáticos de metotrexato conllevarán a la afectación de tejidos y órganos no blancos. Por el contrario, bajos niveles de MTX en un paciente puede afectar el efecto del fármaco sobre las células cancerosas y promover mecanismos de resistencia.²

En este marco conceptual, se desarrolló y se validó un método analítico empleando la técnica de gota de sangre seca (DBS), la aplicación del método se llevó a cabo para realizar el monitoreo terapéutico de metotrexato en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA, con la finalidad de disminuir los riesgos de toxicidad.

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".

2. OBJETIVO.

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de metotrexato en pacientes pediátricos con LLA, empleando la técnica de gota de sangre seca (DBS) y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).

3. JUSTIFICACIÓN.

El Departamento de Farmacología de la unidad de investigación del Instituto Nacional de Pediatría (INP), ha tomado como tarea desarrollar, validar y proponer la implementación de un método analítico para determinar la concentración de metotrexato en sangre de pacientes pediátricos, con el fin de disminuir el riesgo de citotoxicidad, esto con base en los “Protocolos técnicos de cáncer en niños”⁸ el cual nos indica que el remanente de metotrexato a las 42 h posteriores a su administración debe ser inferior a 1.0 $\mu\text{mol/L}$.

La monitorización terapéutica de MTX es una práctica indicada en el seguimiento del tratamiento de la LLA para ajustar las dosis de rescate y evitar toxicidad. Por ello es sumamente necesario realizar al paciente una rigurosa monitorización de la concentración plasmática de este fármaco durante el tratamiento.

Cabe señalar que existen diferentes métodos analíticos que permiten cuantificar MTX, sin embargo, el más empleado por su costo y eficiencia es la cromatografía de líquidos.

4. GENERALIDADES.

4.1. Leucemia linfoblástica aguda.

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético. Son enfermedades neoplásicas que se deben a mutaciones somáticas de la célula progenitora. Según su estirpe celular afectado, ya sea la línea mieloide o la linfoide (Figura 1), su evolución varía desde las que conducen rápidamente a la muerte hasta las que evolucionan con lentitud.³ Las leucemias de crecimiento rápido son llamadas leucemias agudas y las de crecimiento lento son llamadas leucemias crónicas.

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.⁴

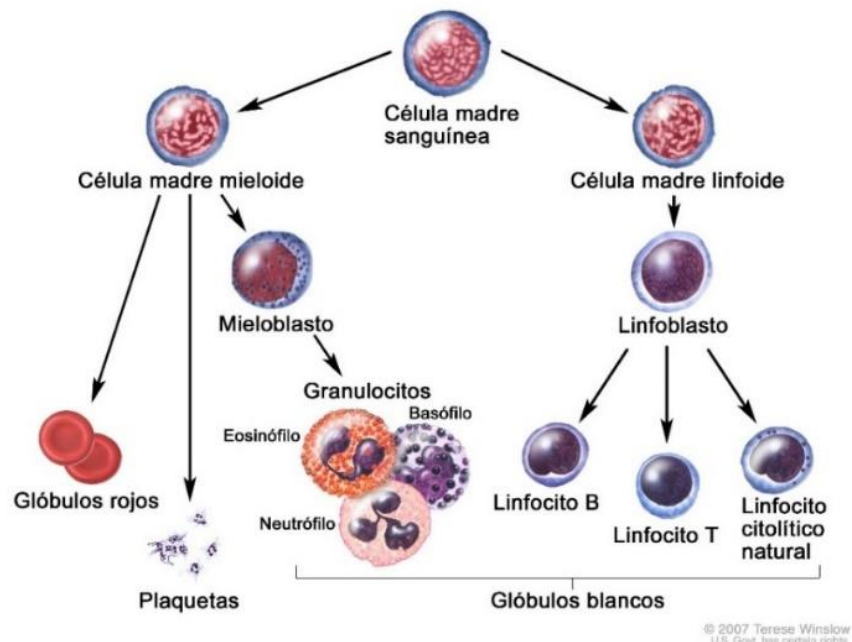


Figura 1. Evolución de una célula madre sanguínea (tomado de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/paciente/tratamiento-lla-infantil-pdq>)

En un niño con LLA, hay demasiadas células madre que se transforman en linfoblastos, linfocitos B o linfocitos T. Estas células son cancerosas. Las células leucémicas no funcionan como los linfocitos normales y no pueden combatir muy bien las infecciones. Además, en la medida que aumenta la cantidad de células de leucemia en la sangre y la médula ósea, hay menos lugar para los glóbulos blancos, los glóbulos rojos y las plaquetas sanas (Figura 2). Esto puede producir infecciones, anemia y sangrados fáciles.⁵

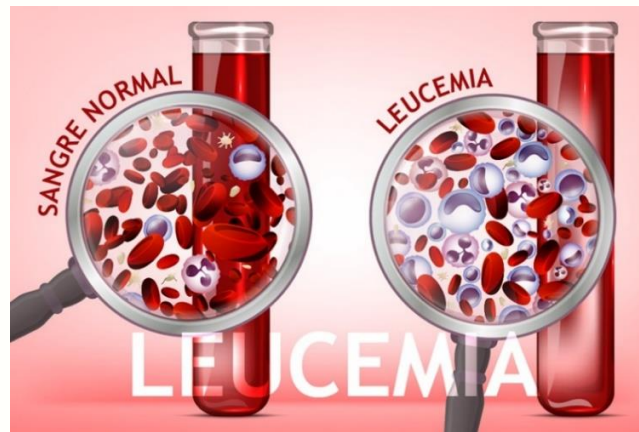


Figura 2. Muestra de sangre de una persona sana (izquierda) y de una persona leucémica (derecha).

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

4.1.1 Epidemiología.

En México, el cáncer infantil representa la segunda causa de mortalidad.⁶

El seguimiento que han realizado las unidades médicas a los casos de cáncer en pacientes menores de 20 años revela que, de acuerdo con el tipo histológico del tumor, los tres primeros lugares los ocupan leucemias (30.0%), linfomas y neoplasias (17.1%), y tumores del sistema nervioso central (11.9%)⁷. (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Casos de cáncer en menores de 20 años, según el tipo histológico de tumor. Unidades Médicas Acreditadas. Secretaria 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

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 éstas.

En el caso particular de género, para la LLA es más común en niños que en niñas y con respecto a la edad es frecuente entre los 4 y 7 años.⁸

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 (cerca de \$5,000,000.00 pesos/paciente). El rezago socioeconómico 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.⁷

4.1.2 Etiología.

Se desconocen en su totalidad las causas de la LLA, sin embargo, existen factores de riesgo que aumentan las posibilidades de que un niño desarrolle esta enfermedad.⁹

En la Tabla 2 se muestran los principales factores de riesgo, aunque pueden existir muchos otros aún no identificados.⁵

Tabla 2. Factores que predisponen a la leucemia linfoblástica 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	Exposición a pesticidas
Ataxia telangiectasia	
Inmunodeficiencia combinada grave	
Síndrome de Li-Fraumeni	

4.1.3 Manifestaciones clínicas.

La LLA suele presentarse de forma inespecífica y relativamente rápida. Con frecuencia están presentes los siguientes síntomas¹:

- Cansancio extremo, debilidad.
- Mareo o aturdimiento, dolores de cabeza.
- Dolor de huesos o articulaciones.
- Tos o dificultad para respirar.
- Hinchazón del abdomen.
- Pérdida de apetito y de peso.
- Infecciones.
- Fiebre.

- Palidez.
- Aparición de moretones y sangrado (de la nariz o en encías).
- Ganglios linfáticos hinchados.
- Convulsiones, vómito.

4.1.4 Diagnóstico.

Se realizarán exámenes y pruebas para determinar la causa de los síntomas. Si se descubre la leucemia, se necesitarán pruebas adicionales para determinar el tipo y el subtipo de leucemia, y decidir cómo debe tratarse. Resulta importante diagnosticar la leucemia en niños tan pronto como sea posible y determinar el tipo de leucemia para que el tratamiento se pueda adaptar al niño a fin de que se obtengan las mejores probabilidades de éxito¹.

Las pruebas utilizadas para detectar la leucemia en niños son: análisis de sangre, punción lumbar, aspirado de medula ósea y biopsia. Para clasificar la leucemia se hacen pruebas como: exámenes microscópicos, citometría de flujo e inmunohistoquímica, citogenética, hibridación in situ con fluorescencia (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹

4.1.5 Tratamiento.

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

Cada esquema de tratamiento comprende al menos cuatro segmentos:

- a) inducción a la remisión, b) consolidación, c) mantenimiento de la quimioterapia y d) fase final de cese.

De acuerdo con los “Protocolos técnicos de cáncer en niños”⁸, la LLA puede tratarse con diferentes esquemas dependiendo el grado de riesgo, ver Tabla 3:

Tabla 3. Esquema de tratamiento para LLA de acuerdo con el grado de riesgo.

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

El MTX es un fármaco de amplio uso en la quimioterapia y con predominancia en el éxito terapéutico de ésta; 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 mantenimiento². Ver Tabla 4.

Tabla 4. Dosis administradas de metotrexato dependiendo el tipo de riesgo.

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

4.2 METOTREXATO.

4.2.1 Propiedades fisicoquímicas.

Su nombre químico es (N-[4-[[[(2,4-diamino-6-pteridinil)metil] metilamino] benzoil]-L-ácido glutámico con un peso molecular de 454.447 g/mol. Es un polvo cristalino anaranjado, inodoro e higroscópico. Prácticamente insoluble en agua, etanol, cloruro de metileno, éter, cloroformo y ligeramente soluble en ácido clorhídrico diluido. Se disuelve en ácidos minerales diluidos, así como también es soluble a un pH alcalino como en soluciones diluidas de hidróxidos y carbonatos. Tiene un punto de fusión de 195°C, no es inflamable ni explosivo. Tiene un pKa de 4.7 por lo que se considera un fármaco ácido. Se debe conservar en envases bien cerrados, protegiéndolo de la luz ya que es fotosensible.¹⁰ (Figura 3).

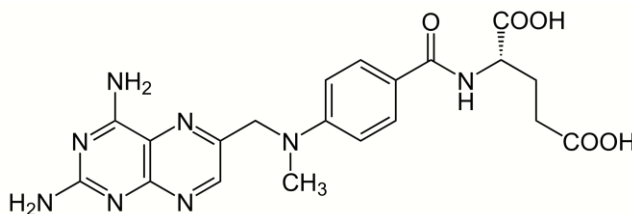


Figura 3. Estructura química del MTX.

4.2.2 Mecanismo de acción.

El MTX es un fármaco citotóxico, al ser el principal antagonista de folato, es uno de los antimetabolitos que se utilizan de manera más generalizada en la quimioterapia antineoplásica. 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 celular¹¹. La estructura química del ácido fólico es muy similar a la del MTX (ver Figura 4), estas modificaciones permiten que el MTX muestre mayor afinidad por la dihidrofolato reductasa que el propio ácido fólico.

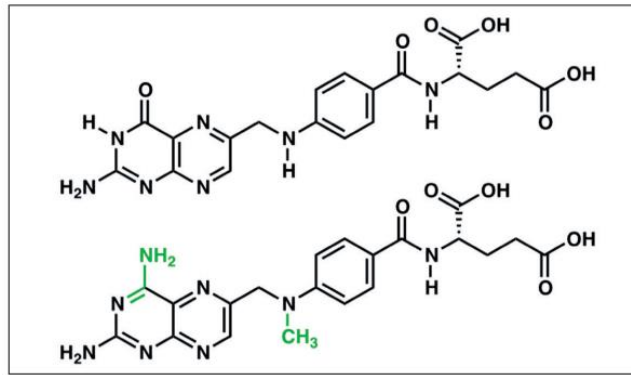


Figura 4. Estructuras químicas del ácido fólico (arriba) y del metotrexato (abajo) donde se resaltan los dos cambios estructurales mencionados.

El mecanismo de acción por el cual el MTX actúa como fármaco antitumoral es el siguiente (ver Figura 5): la dihidrofolato reductasa es la enzima que transforma el ácido dihidrofólico en tetrahidrofólico. El MTX, al mostrar mayor apetencia por la enzima bloquea de forma reversible su actividad, reduciendo así la síntesis de tetrahidrofólico. Además, el MTX intracelular, en forma de poliglutamatos, impide la síntesis de purinas al bloquear la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido transformilasa (ATIC), la enzima terminal de esa ruta metabólica. Igualmente inhibe la síntesis de pirimidinas al bloquear la timidilato sintetasa.¹² Así el MTX actúa como un potente inhibidor de la síntesis de ADN; clasificándose como un agente específico de fase, eliminando células durante la fase S del ciclo celular¹³.

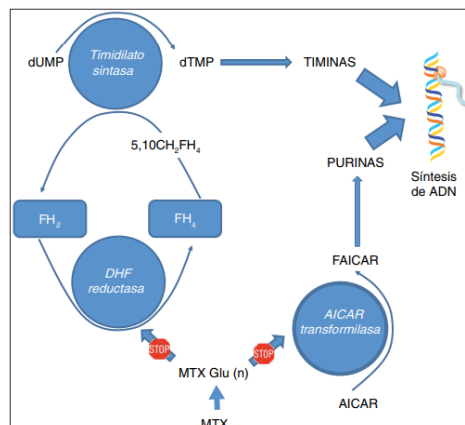


Figura 5. Mecanismo antitumoral del MTX. El MTX bloquea la síntesis de las proteínas necesarias para la síntesis de material genético y la duplicación celular actuando como falso sustrato (antimetabolito) de la DHF reductasa y la AICAR transformilasa.

4.2.3 Farmacocinética.

- **Absorción.**

El MTX se administra por vía oral, intravenosa, intramuscular e intratecal. Cuando se administra por vía oral, el MTX se absorbe en el tracto digestivo. Las dosis orales de 30 mg/m² muestran una biodisponibilidad del 60%, reduciéndose ésta si las dosis son de >50 mg/m².¹⁴ En pacientes con leucemia, la absorción oral del MTX es muy variable. Así, después de una dosis de 20 mg/m², se han visto diferencias de hasta 20 veces entre las concentraciones plasmáticas máximas (C_{max} entre 0.11-2.3 µM). Por otra parte, el MTX oral experimenta un metabolismo de primer paso en el hígado lo que limita su biodisponibilidad. Los alimentos retrasan la absorción y reducen la C_{max}.¹⁴ Las concentraciones plasmáticas máximas, por esta vía, se alcanzan en 1-2 h.¹²

La absorción del MTX es generalmente completa a partir de las rutas parenterales de inyección. Luego de una inyección intramuscular, el pico plasmático se presenta de 30 a 60 minutos.

- **Distribución.**

El volumen de distribución del MTX varía entre 0.7 y 1.4 l/kg, lo que confirma que alcanza el compartimento intracelular de eritrocitos y leucocitos en cantidad suficiente para ejercer su acción.¹²

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 V_d 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.

- **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.¹⁵

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

- **Excreción.**

La excreción renal es la ruta primaria de eliminación (mediante filtración glomerular y secreción activa en el tubo proximal) 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.¹²

4.2.4 Efectos adversos.

Los que se presentan con mayor frecuencia son las úlceras orales (mucositis), náuseas, vómitos y diarrea, que pueden estar acompañadas de cefalea y somnolencia. En ocasiones se observa una elevación de las enzimas hepáticas, por lo que se aconseja su monitorización. Con menor frecuencia se describen mielosupresión, neumonitis por hipersensibilidad, lesión del epitelio del aparato digestivo, fibrosis y cirrosis hepática.¹²

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 fólico, esto sin provocar una disminución en la eficacia clínica.¹⁶

4.3 Determinación de metotrexato en sangre.

4.3.1 Técnica de gota de sangre seca (DBS).

La técnica de gota de sangre seca o DBS por sus siglas en inglés “Dried Blood Spot”, fue propuesta por Roberto Guthrie en 1960.¹⁷ Es un método que consiste en la toma de apenas algunas gotas de sangre, obtenidas mediante la punción de un dedo o en algunos casos del talón; dichas gotas se depositan en tarjetas de papel filtro llamadas tarjetas Guthrie. Ver Figura 6.

La técnica de gota de sangre seca es reciente si se compara con otras formas de análisis sobre diferentes matrices. Es ideal para estudios pediátricos y con el desarrollo más reciente de los espectrómetros de masas sensibles, ha adquirido gran interés como una herramienta potencialmente poderosa para el análisis cuantitativo de pequeñas moléculas para el desarrollo de medicamentos farmacéuticos y toxicología¹⁸.

La técnica DBS ha sido aplicada en diversos tipos de estudios como toxicológicos, clínicos, monitoreos terapéuticos en los que se han cuantificado diversos fármacos como antivirales, antibióticos, oncológicos, inmunosupresores, entre otros. Por lo que resulta en una herramienta muy útil para la cuantificación de fármacos en una población tan vulnerable como lo son los pacientes pediátricos.¹⁸

Las tarjetas Guthrie han sido aprobadas y registradas por la FDA como un dispositivo de clase II de identificación médica, de tal manera que se garantiza la

reproducibilidad de absorción, homogeneidad y el volumen de retención de la muestra.¹⁸

Desde hace mucho tiempo está establecido el uso de papel absorbente para conservar muestras de sangre seca antes de proceder a su análisis. Desde entonces, el uso de este tipo de dispositivos de papel se ha utilizado para recoger, transportar y almacenar sangre para el examen de múltiples analitos, y se ha transformado en rutina diaria.



Figura 6. Tarjeta Guthrie.

4.3.2 Ventajas y desventajas.

Dentro de las principales ventajas que ofrece la técnica se encuentran:

- La utilización de pequeños volúmenes de sangre ($\leq 80 \mu\text{L}$) además de que de una sola muestra se pueden obtener varias réplicas.
- El análisis de las muestras no requiere de una extracción previa, lo cual reduce el costo de análisis.
- El papel filtro con las muestras de interés puede ser almacenado a temperatura ambiente, ya que se ha observado que analitos y metabolitos pueden ser estables por espacio de dos meses bajo esta condición¹⁹ además de que no requiere un gran espacio para almacenar.
- La recolección de muestras con esta técnica es muy importante en áreas remotas y con difícil acceso, ya que las muestras son más fáciles de

transportar porque no requieren de ser congeladas o transportadas en hielo.²⁰

- Los pacientes que requieren de monitoreo de sus concentraciones sanguíneas del o los fármacos que utilizan, pueden incluso tomarse la muestra en casa²¹, realizando la punción y colocando la muestra directamente en el papel filtro por lo que también se reduce la contaminación de la muestra.
- El remanente de las muestras es más barato de destruir y contaminan menos en comparación con las muestras extraídas por venopunción.

Como toda técnica también presenta desventajas entre las que podemos mencionar:

- Requiere de entrenamiento para la toma de muestras.
- Los analitos a estudiar requieren estar en concentraciones de orden de los microgramos para ser cuantificados mediante detectores como UV y fluorescencia, por lo que los analitos que no estén en este rango de concentración requieren de una detección más sensible como es la espectrometría de masas.
- Las muestras que no son bien secadas disminuyen su estabilidad.²²
- Puede producirse la contaminación de la muestra por exposición del papel filtro durante el secado en superficies contaminadas.

Así mismo, es importante mencionar que la cuantificación de las concentraciones de el o los analitos de interés presentes en una muestra biológica ya sea sangre, plasma, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc., se lleva a cabo mediante la utilización de calibradores y puntos control con concentraciones conocidas. Lo cual permite hacer una normalización de las concentraciones presentes en una muestra problema; de tal manera que la técnica de gota de sangre seca es equiparable a la técnica convencional, con la ventaja de utilizar volúmenes pequeños y con toma de muestra menos invasiva.

4.3.3 Efecto del hematocrito.

Algunos autores como De Kesel, han descrito acerca del efecto del hematocrito (HCT) en análisis cualitativos en DBS.²³ El hematocrito es el porcentaje en volumen de glóbulos rojos en sangre, el cual tiene un efecto considerable en la viscosidad de la sangre. Esto puede tener una influencia directa en la exactitud y la precisión en el análisis de fármacos. Este efecto es resultado de un complejo fenómeno. Las variaciones en el hematocrito causan diferente difusión de la muestra de sangre en el papel de recolección de muestra (ver Figura 7), lo que puede afectar la validez de los resultados generados por los métodos de DBS al afectar el tamaño de punto de la muestra, el tiempo que tarda en secar la muestra, la homogeneidad y, en última instancia, la robustez y la reproducibilidad de los ensayos.²⁴ Esta prueba, aunque no venía en la norma, se realizó con el fin de saber con qué proporción de HCT nos saldrían mejor los resultados.

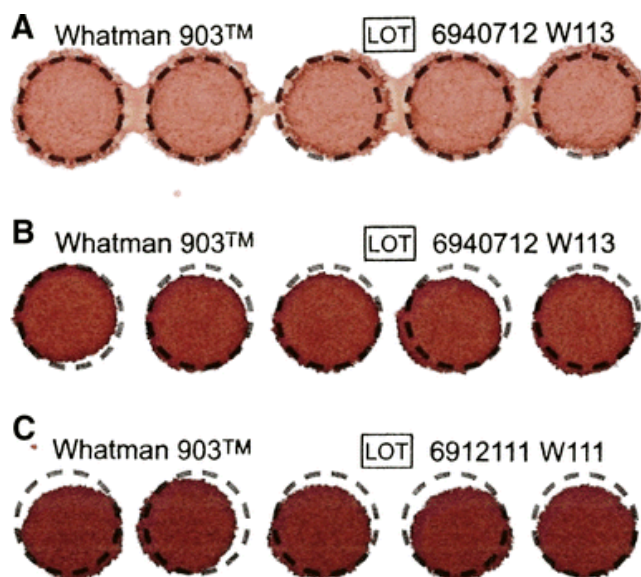


Figura 7. Apariencia de manchas de sangre seca a diferentes porcentajes de hematocrito. A. HCT=18%, B. HCT=35% y C. HCT=50%. Tomado del artículo Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions.

4.4 CROMATOGRAFÍA.

4.4.1 Cromatografía líquida.

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

Los componentes de un equipo de cromatografía líquida incluyen:

- Fase móvil
- Bomba
- Inyector
- Columna
- Detector
- Registrador
- Integrador
- Desechos

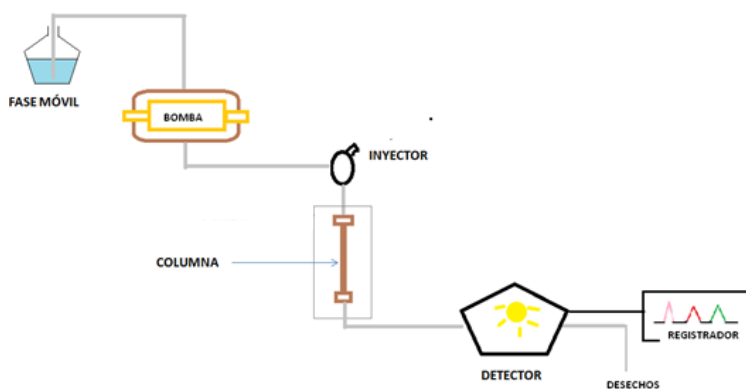


Figura 8. Componentes de cromatografía líquida.

Existen 2 técnicas de cromatografía líquida muy importantes, una de ellas es el HPLC (High Performance Liquid Chromatography) y la otra es el UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) cuyo fundamento es el mismo: un líquido (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria); al introducir una mezcla de sustancias (analitos) en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después de terminado el recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente. (Ver figura 9).

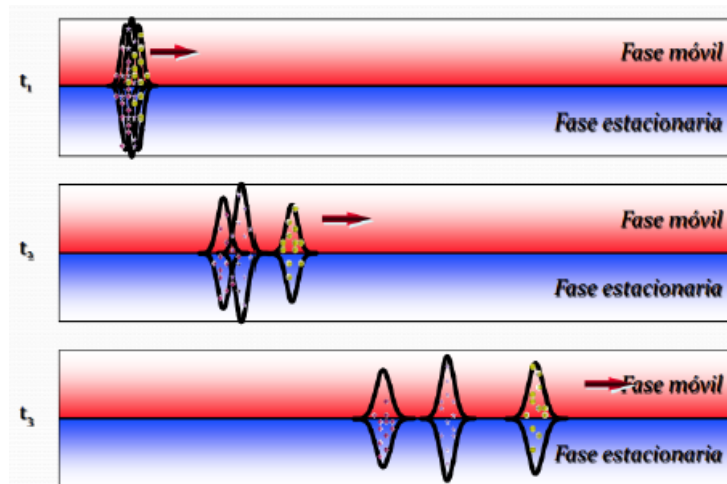


Figura 9. Proceso de separación de una mezcla.

El sistema UPLC presenta varias ventajas sobre el HPLC: la principal es que hay una optimización en los resultados debido a la elevación de la presión a la que se somete la corrida cromatográfica y la fase estacionaria, es decir, mientras que el HPLC trabaja con presiones cercanas a los 6000 psi, el UPLC trabaja con presiones de hasta 15,000 psi. Estas altas presiones son posibles gracias a la química de las partículas en las columnas que para UPLC son de menos de $2\mu\text{m}$ mientras que para HPLC son de $5\mu\text{m}$. Gracias a este cambio de partículas, la longitud de la columna se puede reducir a la tercera parte sin perder eficacia y el rendimiento aumenta 9 veces sin perder resolución.

Otras de las ventajas son que el tiempo de corrida es mucho menor, la cantidad de muestra utilizada es pequeña (volúmenes mínimos), se utiliza una menor cantidad de solventes y ofrece una mejor resolución y sensibilidad, todo esto reduce de manera significativa el tiempo de análisis y el costo por muestra del proceso analítico, a la vez que mejora la calidad de los resultados, es altamente robusta, fiable y reproducible.

4.4.2. Cromatografía líquida-espectrometría de masas.

En los últimos años el aumento de publicaciones de aplicaciones de la LC-MS/MS en numerosos campos analíticos ha sido verdaderamente espectacular. La combinación cromatografía líquida y espectrometría de masas fue imposible durante muchos años debido a la dificultad que representaba la eliminación del disolvente antes de que el analito de interés entrara en el alto vacío del espectrómetro de masas. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de ionización a presión atmosférica, la combinación de ambos instrumentos ha dado lugar a una técnica relativamente nueva. Ver Figura 10.

El eluyente proveniente del equipo de cromatografía líquida pasa a una fuente de iones que se encuentra a presión atmosférica, donde se generan los iones del analito y la mayor parte del disolvente se evapora rápidamente. A continuación, la nube de iones generada pasa a través de una pequeña abertura al vacío del espectrómetro de masas, lugar donde se elimina totalmente el disolvente, y finalmente los iones pueden concentrarse y sus masas moleculares pueden ser analizadas.²⁵



Figura 10. UPLC-MS/MS utilizado en el laboratorio de Farmacología, INP.

Se han desarrollado numerosos métodos para la determinación de MTX en plasma humano. Por un lado, están los basados en técnicas analíticas que utilizan anticuerpos, tales como radioinmunoanálisis e inmunoanálisis de polarización fluorescente. Estas técnicas son simples y rápidas; sin embargo, poseen una baja especificidad debido a reacciones cruzadas de los anticuerpos, generando a veces una sobreestimación de la concentración de MTX.

Por otro lado, dentro de las técnicas separativas, la cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV) ha sido de las más utilizadas para la determinación de MTX con propósitos clínicos, ya que es simple, rápida, de bajo costo y altamente específica, cualidades que son imprescindibles en un método analítico aplicado a la monitorización terapéutica de fármacos; sin embargo, la separación que ofrece el sistema UPLC-MS/MS produce espectros de la más alta calidad y sensibilidad.

4.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

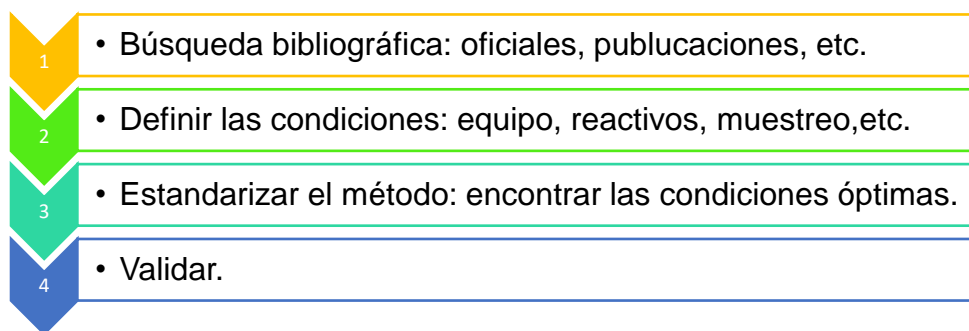
Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.²⁶ “La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas” USP/FEUM, Capítulo General Validación de métodos farmacopeicos.

Para la FDA, Draft Guidance – Analytical Procedures and Methods Validation, la definición de validación de métodos es: “El proceso por el cual se demuestra que los procedimientos analíticos son aptos para el uso indicado”. Según la ICH Guideline Q2A – Text on Validation of Analytical; Procedures. ICH Q2/R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology: “El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado”.

El objetivo fundamental de validar un método analítico es desarrollar un procedimiento que, de manera confiable y sistemática, nos permita obtener resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para así generar confiabilidad.²⁷

Durante el diseño y la ejecución del método se deben establecer las condiciones necesarias del proceso analítico, en donde se conozcan todas las variables que intervienen en el análisis, de tal forma que el método analítico este normalizado antes de iniciar el proceso de validación.²⁶

Por lo anteriormente expuesto, las etapas para desarrollar un método analítico son:



Para llevar a cabo el proceso de validación del método de análisis en cuestión, se requiere:

- Instrumentos calificados y calibrados.
- Métodos documentados.
- Patrones de referencia confiables.
- Analista calificados.
- Integridad de la muestra.

Una parte muy importante previo al trabajo de validación, es contar con un protocolo que deberá incluir la descripción de pruebas específicas que demuestren que el proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

4.5.1 Parámetros para validar un método analítico acorde a la NOM-177-SSA1-2013.

Los 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.

El INP al ser un hospital de salud pública, y perteneciente a la Secretaría de Salud (gobierno federal), debe apegarse a los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013²⁸ “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”²⁷, este es un documento oficial mexicano en el que se encuentra el apartado 9.1 “Validación de métodos analíticos”, el cual es seguido en las instituciones de salud pública como lo mínimo necesario para validar un método analítico y para que pueda considerarse que se emiten resultados exactos, precisos, reproducibles y por lo tanto confiables.

Los parámetros son los siguientes:

- **Selectividad:** es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos en la muestra. Evalúa el método contra posibles interferencias (metabolitos, productos de degradación, del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado concomitantemente). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.
- **Efecto de acarreo:** efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores.

- 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. Se considera que el punto tiene validez si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.
- 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.
- 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: es la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.
- Exactitud: se trata del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, los cuales deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.
- Estabilidad: son las condiciones de temperatura y tiempo en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. En este parámetro, la norma oficial vigente establece que debe evaluarse la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

5.1 Reactivos.

Se emplearon las siguientes sustancias de referencia: metotrexato, ifosfamida, ácido fólico, acetaminofén, amoxicilina, ciclofosfamida, ketorolaco, naproxeno, sulfametoxazol y trimetoprima.

Se ocuparon los siguientes reactivos: acetonitrilo grado HPLC, agua desionizada (milli-Q), ácido fórmico grado HPLC, metanol grado HPLC, isopropanol grado HPLC e hidróxido de amonio.

Filtros de papel Whatman 903® (tarjetas de Guthrie), Agua grado Milli-Q tipo 1 (Millipore, Molsheim, France), la cual fue utilizada para preparar todas las soluciones y diluciones.

Como material biológico se usó plasma humano A Rh positivo y concentrado de eritrocitos humanos A Rh positivo, ambos obtenidos del Banco de Sangre del INP.

5.2 Desarrollo del método.

En primera instancia, se realizó la consulta bibliográfica acerca de las condiciones cromatográficas ya probadas en estudios previos de cuantificación de MTX, buscando así las condiciones óptimas para el desarrollo de nuestro método.

En la Tabla 5 se pueden observar los artículos revisados y que utilizan la cromatografía líquida (tanto HPLC como UPLC) para la cuantificación de MTX, como ya se mencionó, la técnica más utilizada ha sido el HPLC ya que el UPLC es una técnica relativamente nueva.

Autor(es)	Año	Método	Volumen de muestra	Columna	Fase móvil	Instrumento
Thierry Dervieux, Diana Orentas Lein, John Marcellotti, Ken Pischel, Katie Smith, Michael Walsh, Russell Richerson.	2003	HPLC-UV	100 µL de plasma o sangre. 80 µL para inyección.	C18 (25cm x 4.6mm), XTerra MS, Waters.	Acetato de amonio 10mM, pH 6.5 con 2mL/L de H ₂ O ₂ .	HPLC Agilent 1100. Detector fluorométrico.
Gong Chen, J. Paul Fawcett, Momir Mikov, Ian G. Tucker.	2009	HPLC-MS/MS	200 µL de células. 30 µL para inyección.	C8 (5µm, 3.9 x 150mm), SymmetryShield, RP8, Waters.	Gradiente de ácido fórmico al 0.1% y ACN	HPLC Agilent 1200. Espectrómetro de masas API 3200.
Lucia Torregiani, Yamile Soledad Cara, María Mercedes de Zan.	2017	HPLC-UV	250 mL de plasma. 150 µL para inyección.	C18 (5µm, 4.6 x 150mm), Zorbax Eclipse XDB, Agilent.	Gradiente de ACN y acetato de sodio 0.05 mol a pH 3.5.	HPLC Agilent 1260. Detector UV-VIS.
Shenghui Mei, Leting Zhu, Xingang Li, Jiaqing Wang, Xueyun Jiang, Haiyan Chen, Jiping Huo, Ci Yang, Song Lin, Zhigang Zhao.	2017	UPLC-MS/MS	20 µL de plasma. 2 µL para inyección.	C18 (1.7mm, 2.1 x 50mm) Acquity BEH, Waters.	Gradiente metanol y ácido fórmico al 0.05% en agua.	UPLC Acquity Clase H Waters. Espectrómetro de masas QTRAP 5500.

Tabla 5. Métodos para la cuantificación de MTX.

Teniendo como antecedente los artículos anteriores, empezamos con las pruebas para desarrollar nuestro método. Lo primero que se hizo fue la optimización de la ionización o “tunning”, que tiene como principales funciones ajustar las masas del espectrómetro, conseguir la máxima sensibilidad y comprobar el estado del espectrómetro, para lo cual se probaron diferentes soluciones contemplando al acetonitrilo-agua y metano-agua en diferentes proporciones. Se utilizó un espectrómetro de masas Micromass Quattro Micro en tándem de triple cuadrupolo marca Waters, el cual operó en modo de ionización positiva por electrospray (ESI+). Se investigaron las transiciones en trabajos previos del metotrexato (455>308) y de la ifosfamida (261>91) para poder lograr su optimización. Los datos obtenidos fueron tratados por el software MassLynx v.4.1 de Waters. Las condiciones espectrométricas finales se muestran en la sección de resultados **6.1**.

La separación de los compuestos se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) modelo Acquity marca Waters, para la optimización se probaron diferentes fases móviles y diferentes proporciones de las mismas, contemplando al ácido fórmico 0.1% v/v y 1.0% v/v en solución acuosa, cada uno en combinación con acetonitrilo y metanol de manera individual y en diferentes proporciones, se probaron dos columnas cromatográficas (Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 50 mm x 2.1 mm, # de parte 186002350 marca Waters y Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 100 mm x 2.1 mm, # de parte 186002352 marca Waters), dos temperaturas de columna (35 y 40 °C), así como volúmenes de inyección (10 y 15 μL) y diferentes flujos (80, 100 y 200 $\mu\text{L}/\text{min}$). Las condiciones finales se muestran en la sección de resultados **6.2**.

Para realizar la extracción se probó la precipitación directa con metanol y ACN, también probamos la extracción líquido-líquido con metanol e hidróxido de amonio 0.1% (80 : 20 v/v), ACN e hidróxido de amonio 0.1% (80 : 20 v/v), ACN y metanol al 70% por separado y como únicos agentes de extracción. La combinación de solventes que nos diera la extracción más eficiente y limpia sería la elegida.

5.3 Preparación de soluciones.

- Solución A: Metotrexato [1 mg/mL].

Pesar 0.01 g de MTX, disolver con ACN 70% y aforar a 10 mL con ACN 70%, almacenar a 4°C. Nota: Se adicionó 10 µL NH₄OH al 28% para favorecer la disolución.

- Solución I de: Ifosfamida [1 mg/mL].

Pesar 0.01 g de Ifosfamida, disolver y aforar a 10 mL con ACN 70%, almacenar a 4°C.

- Solución II de Ifosfamida [100 ng/mL].

Tomar una alícuota de 50 µL de la solución I de Ifosfamida y aforar a un volumen de 50 mL con ACN 70%, almacenar a 4 °C.

- Lavado fuerte: H₂O:ACN:MeOH:Isopropanol, 25:25:25:25 % v/v 500mL.

Medir por separado y mezclar 125 mL de MeOH y 125 mL de Isopropanol, 125 mL de ACN, 125 mL H₂O desgasificar en baño ultrasonido por 5min.

- Lavado débil: ACN: H₂O 50:50% v/v 500 mL.

Medir por separado y mezclar: 250 mL de ACN y 250 mL de H₂O, desgasificar en baño ultrasonido por 5 min.

- Lavado de sellos: ACN:Agua 10:90 v/v, 500 mL.

Medir por separado y mezclar 50 mL de ACN y 450 mL de agua; desgasificar en baño ultrasonido por 5 min.

- NH₄OH en agua al 0.1%.

Tomar 100 mL de NH₄OH al 28% y aforar a 100 mL con agua.

- Fase de extracción: ACN:[NH₄OH en agua al 0.1%], 80:20 v/v.

Tomar 160 mL de ACN y adicionar 40 mL de NH₄OH 0.1%.

- Fase de reconstitución: ACN al 70%.

Tomar 70 mL de ACN y adicionar 30 mL de agua.

- Ácido fórmico al 0.1%.

Tomar 500 mL de ácido fórmico y aforar a 500 mL con agua.

5.4 Preparación del hematocrito (HCT).

Se nos proporcionó plasma A Rh positivo del banco de sangre del INP, el cual se filtró con un embudo y después con un acrodisco de 0.45 μm y se nos proporcionó también un concentrado de eritrocitos ya filtrado A Rh positivo.

Se realizó por triplicado la determinación del efecto de la densidad de hematíes mediante la cuantificación de una misma concentración de MTX (600 ng/mL), preparada en diferentes porcentajes de HCT: 25, 30, 35, 40 y 45% utilizando la curva de 35%. De antemano sabíamos que un hematocrito al 35% es el más frecuente en población pediátrica, por eso nuestra curva se realizó con este porcentaje. Los datos se pueden observar en la sección de resultados **6.3**.

5.5 Preparación de estándares y controles.

Inicialmente, se preparó de forma individual una solución stock de metotrexato con una concentración de 1 mg/mL y de ésta se prepararon las disoluciones de trabajo 20X en ACN, para obtener los 7 puntos de la curva de calibración y los cuatro controles de calidad. Ver Tabla 6.

Tabla 6. Soluciones de trabajo 20X

No.	Nivel	Concentración (ng/mL)	Vol. stock (μL)	Aforo final ACN 70% (mL)
1	CC1	1000	10	10
2	CC2	4000	40	10
3	CC3	8000	80	10
4	CC4	12000	120	10
5	CC5	16000	160	10
6	CC6	20000	200	10
7	CC7	30000	300	10
8	PC1	3000	30	10
9	PC2	10000	100	10
10	PC3	18000	180	10
11	PC4	24000	240	10

A continuación, se prepararon las disoluciones correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración (CC1-CC7), empleando la matriz biológica sangre con una concentración de 35% de HTC, colocando 950 μL de sangre total (HTC al 35%), y 50 μL de la disolución de trabajo 20X de MTX correspondiente, de modo que se obtuvieran las siguientes concentraciones. Ver Tabla 7.

Tabla 7. Curva de calibración.

No.	Nivel	Conc. final (ng/mL)	Vol. soln. De trabajo (μL)	Vol. HTC 35% (μL)	Aforo final (mL)
1	CC1	50	50	950	1
2	CC2	200	50	950	1
3	CC3	400	50	950	1
4	CC4	600	50	950	1
5	CC5	800	50	950	1
6	CC6	1000	50	950	1
7	CC7	1500	50	950	1
8	PC1	150	50	950	1
9	PC2	500	50	950	1
10	PC3	900	50	950	1
11	PC4	1200	50	950	1

Posteriormente, 40 μL de disolución de cada punto de las curvas de calibración se depositaron por separado en tarjetas Whatman (tarjetas Guthrie). Las tarjetas se dejaron secar en posición horizontal por 4 horas a temperatura ambiente. Una vez secas, se almacenaron debidamente etiquetadas en bolsas de plástico de baja permeabilidad, acompañadas de material secante, a temperatura ambiente, a 4°C, hasta el momento de analizarse. Los puntos control PC1, PC2, PC3 y PC4 se prepararon de la misma forma que la curva de calibración, empleando las respectivas soluciones iniciales 20X.

5.6 Obtención de las muestras.

Nos fueron proporcionadas las muestras en las tarjetas Whatman de 5 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA, las cuales se dejaron secar, se protegieron de la humedad cubiertas en una capa de papel y se guardaron en bolsas para su refrigeración. Ver Figura 11.

De las tarjetas se obtuvieron los discos o confetis mediante una perforadora manual, a partir de los cuales se realizó la extracción del analito mediante la adición de agentes de extracción.

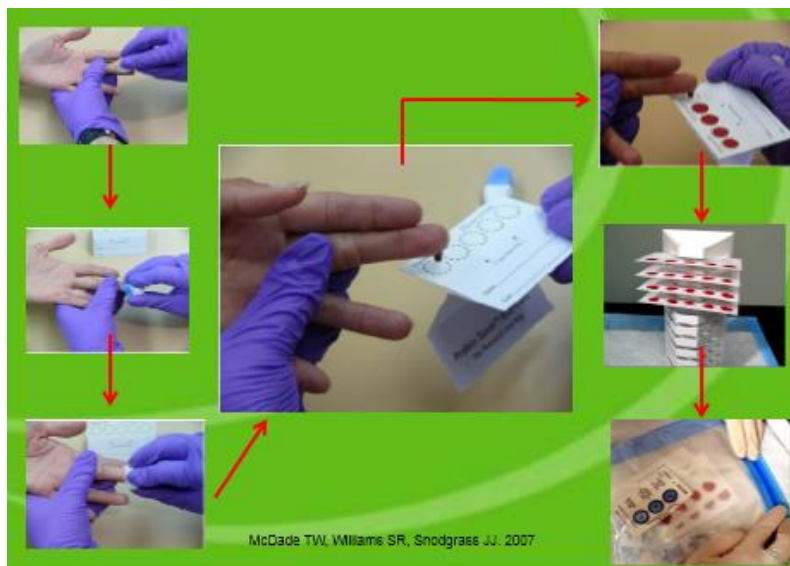


Figura 11. Obtención de la muestra.

5.7 Procesamiento de las muestras (extracción).

Como ya se mencionó, de las tarjetas Whatman (tarjetas Guthrie) anteriormente mencionadas, se cortaron 6 discos o confetis (3 mm de diámetro aprox.) de cada círculo de la tarjeta impregnado con la muestra de sangre seca, empleando una perforadora manual. Los discos se colocaron en un microtubo con capacidad de un volumen de 1.5 mL y posteriormente se agregaron 10 μ L de solución de ifosfamida de concentración 100 ng/mL en ACN al 70% v/v como estándar interno. En seguida se agregó 400 μ L de ACN:[NH₄OH 0.1% en agua] 80:20 v/v. El contenido del microtubo se agitó por 1 minuto en vórtex a máxima velocidad y posteriormente se sometió a sonicación por 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a centrifugaron a 12 500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica (que es en donde se encuentra el fármaco) se decantó y el remanente se evaporó a 50°C bajo corriente de oxígeno en otro tubo. La muestra extraída y seca se reconstituyó con 150 μ L de una solución de ACN al 70%. Finalmente, se

tomaron 100 μL para depositarlos en vial y se inyectaron 10 μL de la muestra anterior al sistema cromatográfico. Ver figuras 12 y 13.

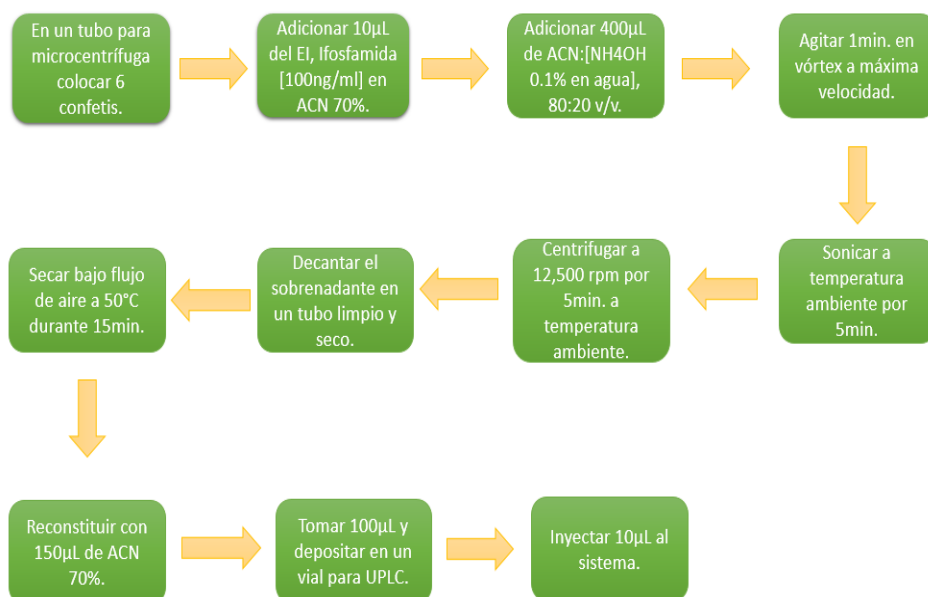


Figura 12. Condiciones de extracción.

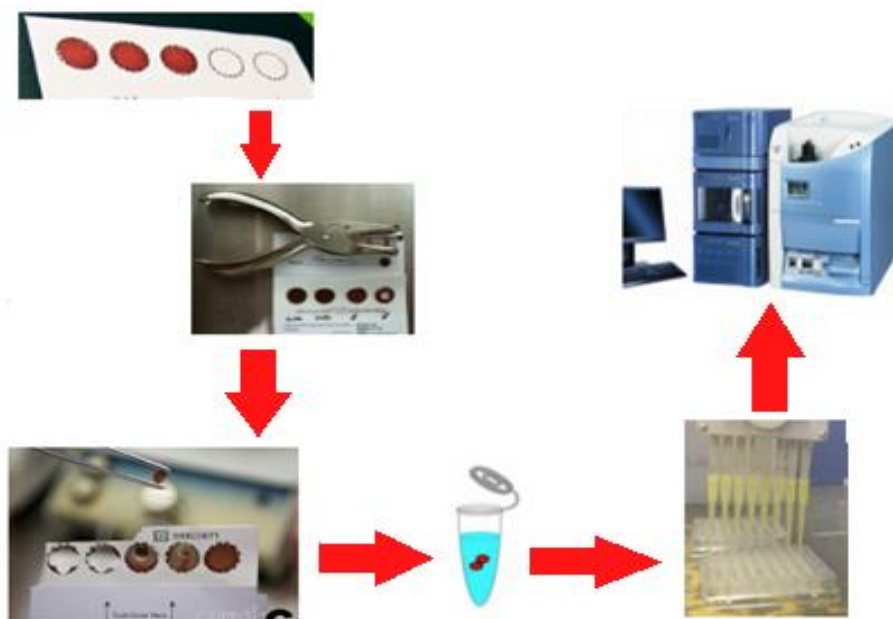


Figura 13. Procesamiento de muestras.

5.8 Propuesta final del método analítico.

Página 1:

PROPUESTA FINAL DEL MÉTODO ANALÍTICO **INP**

FECHA (DD/MM/AA)	ANALITO (S)	MATRIZ BIOLÓGICA	RESPONSABLE
19/FEB/2016	Metotrexate	OBS	Monseñor Salazar Pichardo

NOMBRE DEL PROYECTO:
Determinación de metotrexate en OBS.

1. CONDICIONES DE "TUNING"

- Tipo de Ionización: ESI (+)
- Solución p/tuning ANALITO: 1000 ng/mL (DILUYENTE: ACN: H₂O, 50:50)
- Transición optimizada: 475.21 > 308.26 Th
- Solución p/tuning STD. INT.: 1000 ng/mL (DILUYENTE: ACN: H₂O, 50:50)
- Transición optimizada: 261.08 > 91.57 Th
- Velocidad de infusión: 10 µL/min
- Fase móvil UPLC: ACN con Ac. Fórmico 0.1% en agua, 50:50 v/v
- Flujo UPLC: 10 µL/min
- Transiciones IP: _____ IH: _____ E.I.: _____ OTRO: _____

2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:

a. Fase Móvil

No	COMPONENTES	PROPORCIÓN	pH
1	Acetonitrilo	55%	
2	Ácido Fórmico 0.1%	45%	
Observaciones:			

b. Fase de Lavado débil

No	COMPONENTES	PROPORCIÓN	pH
1	Acetonitrilo	50%	
2	Agua	50%	
Observaciones:			

c. Fase de Lavado Fuerte

No	COMPONENTES	PROPORCIÓN	pH
1	Acetonitrilo	25%	
2	Metanol	25%	
3	Agua	25%	
4	Isopropanol	25%	
Observaciones:			

Página 2:

d. Fase de lavado de Sellos

No	COMPONENTES	PROPORCIÓN	pH
1	Agua	90 %	
2	Acetonitrilo	10 %	
Observaciones:			

e. Velocidad de Flujo UPLC: 100 $\mu\text{L}/\text{min}$

f. Volumen de inyección: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$

g. Modo de inyección: Full loop

h. Split ratio: N.A.

i. Temperatura del automuestreador: 70 $^{\circ}\text{C}$

j. Temperatura de la Columna cromatográfica: 40 $^{\circ}\text{C}$

k. Volumen del Loop empleado: 70 μL

l. Tiempo de inyección: 2.5 min.

m. Columna cromatográfica utilizada: ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 x 50 mm

Tipo de Soporte	Diámetro Interno (mm)	Longitud (mm)	Tamaño de Partícula (μm)	Código
BEH C18	2.1	50	1.7	

3. ESPECIFICACIONES ESPECTROMÉTRICAS

A) Parámetros de Ionización	ANALITO <i>Metotrexate</i>	ESTANDAR INTERNO
Capilar (kV)	3.5	3.5
Cono (V)	25	20
Extractor (V)	1	1
RF lens (V)	0	0
Temperatura del "Source" ($^{\circ}\text{C}$)	120	120
Temperatura de Desolvatación ($^{\circ}\text{C}$)	350	350
Flujo de gas - Cono - (L/h)	60	60
Flujo de gas - Desolvatación- (L/h)	700	700
Presión del gas de colisión -Ar- (psi)	1×10^4	1×10^4
Flujo del gas de colisión (mL/min)	0.20	0.20

B) Parámetros del Analizador	ANALITO	ESTANDAR INTERNO
LM 1 Resolution	15	15
HM 1 Resolution	15	15
Ion Energy 1	0.2	0.2

Entrance	10	10
Collision	20	25
Exit	10	10
LM 2 Resolution	15	15
HM 2 Resolution	14	14
Ion Energy 2	2.5	2.5
Multiplier (V)	650	650
Dwell (mseg)	0.2 seg.	0.2 seg.

Posición Probe: 6/35

4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solución A Metotrexate [1mg/mL] mL

Pesar 0.01 g de metotrexate, disolver con ACN 70% y aforar a 10

mL con ACN 70%, almacenar a 4 °C.

NOTA: Adicionar 70µL de NH₄OH al 20% para favorecer la disolución.

Solución B de _____ [g/mL] mL

Tomar una alícuota de _____ µL de la solución A de _____ y aforar a un volumen

de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Solución C de _____ [g/mL] mL

Tomar una alícuota de _____ µL de la solución B de _____ y aforar a un volumen

de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Solución I de Ifosfamida [1mg/mL] mL

Pesar 0.01 g de Ifosfamida, disolver y aforar a 10 mL con

ACN 70%, almacenar a 4°C.

Solución II de Ifosfamida [100 ng/mL] mL

Tomar una alícuota de 50 µL de la solución I de Ifosfamida y aforar a un

volumen de 50 mL con ACN 70%, almacenar 4°C.

Solución II de _____ [g/mL] mL

Tomar una alícuota de _____ µL de la solución I de _____ y aforar a un

volumen de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Página 4:

Solución de _____ [g/mL] _____ mL.
Tomar una alícuota de _____ μ L de la solución I de _____ y aforar a un
volumen de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Solución de _____ [g/mL] _____ mL.
Tomar una alícuota de _____ μ L de la solución I de _____ y aforar a un
volumen de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Solución de _____ [g/mL] _____ mL.
Tomar una alícuota de _____ μ L de la solución I de _____ y aforar a un
volumen de _____ mL con _____, almacenar 4°C.

Lavado fuerte: ACN: MeOH: H₂O: Isopropilol 25:25:25:25 v/v 500 mL.
Medir por separado y mezclar 125 mL de ACN HPLC y 125 mL de MeOH HPLC; + 125 mL de H₂O +
degasificar en baño ultrasonido por 5 min. 125 mL de Isopropilol HPLC.

Lavado débil: ACN:H₂O, 50:50 v/v 500 mL.
Medir por separado y mezclar 250 mL de agua HPLC y 250 mL de ACN;
degasificar en baño ultrasonido por 5 min.

Lavado de sellos: Acetonitrilo : Agua 10:90 v/v 500 mL.
Medir por separado y mezclar 50 mL de acetonitrilo y 450 mL de agua HPLC; degasificar
en baño ultrasonido por 5 min.

Otras soluciones:

Fase de extracción: ACN: [NH₄OH en agua al 0.1%] 80:20 v/v

Tomar 160 mL de ACN y adicionar 40 mL de NH₄OH 0.1%.

NH₄OH 0.1%: Tomar 100 mL de NH₄OH al 28% y llevar
a 100 mL con agua MQ.

Fase de reconstitución: ACN 70%.

Ácido fórmico 0.1%: tomar 500 mL de ácido fórmico
y aforar con 500 mL con agua MQ.

Página 5:

5. TÉCNICA EXTRACTIVA: PRECIPITACION (), LIQUIDO-LIQUIDO ()

No	
1	En un tubo para microcentrifuga colocar 10 conetlis.
2	Adicionar 10µl de Ifosfomida 100ng/mL en ACN 70%.
3	Adicionar 400µl de ACN: [NH ₄ OH ^{ET} en H ₂ O] 80:20 v/v.
4	Agitar 1 min. en vórtex a máxima velocidad.
5	Someter a temperatura ambiente por 5 min.
6	Centrifugar a 12,500 rpm por 5 min. a temp. ambiente.
7	Decantar el sobrenadante en un tubo limpio y seco.
8	Secar bajo O ₂ a 50°C ≈ 15 min.
9	Reconstituir con 150µl de ACN:70%, tomar 100µl y depositar al vial.
10	Injectar 10 µl al sistema.
11	
12	
13	
Consideraciones especiales:	

6. - REGRESION LINEAL:

Sin ponderación () 1/X (X) 1/X² (----)

Inclusión del Origen () Exclusión del Origen (X)

7. CURVA DE CALIBRACIÓN Y PUNTOS CONTROL

a. SOLUCIONES DE TRABAJO 20X

No.	NIVEL	CONCENTRACION	VOLUMEN SOL. MADRE	AFORO FINAL
1	CC1	1000 ng/mL	10 µl de A	10ml con ACN 70%
2	CC2	4000	40 µl de A	10ml
3	CC3	8000	80 µl de A	10ml
4	CC4	12,000	120 µl de A	10ml
5	CC5	16,000	160 µl de A	10ml
6	CC6	20,000	200 µl de A	10ml
7	CC7	30,000	300 µl de A	10ml
8	CC8			
9	PC1	3,000	30 µl de A	10ml
10	PC2	10,000	100 µl de A	10ml

11	PC3	18,000	180 µl de A	10ml
12	PC4	24,000	240 µl de A	10ml

b. CURVA DE CALIBRACIÓN

No.	NIVEL	CONC. FINAL	VOLUMEN SOLUCION DE TRABAJO	VOL. <small>WATER TO PLASMA 35%</small>	AFORO FINAL
1	CC1	50 ng/ml	50 µl	950 µl	1 ml
2	CC2	200	50 µl	950	1 ml
3	CC3	400	50 µl	950	1 ml
4	CC4	600	50 µl	950	1 ml
5	CC5	800	50 µl	950	1 ml
6	CC6	1,000	50 µl	950	1 ml
7	CC7	1,500	50 µl	950	1 ml
8	CC8				
9	PC1	150	50 µl	950	1 ml
10	PC2	500	50 µl	950	1 ml
11	PC3	900	50 µl	950	1 ml
12	PC4	1,200	50 µl	950	1 ml

8. DESEMPEÑO DEL SISTEMA

Punto CC: CC1 Concentración 1,000 ng/ml Vol. Inyección: 2 µl
 Ifosfamida Concentración: 1,000 ng/ml

PAGINA DE TUNNING ABIERTA ANEXO 1:

Nombre del MS tuning utilizado: MRM - MET - IFM - 26ENE16.
 Nombre del inlet method utilizado: UPLC - MTX - IFOS - 06MAY15.

6. RESULTADOS.

6.1 Condiciones espectrométricas.

La solución elegida para el tuning del analito fue acetonitrilo y agua en una proporción 50:50 v/v. Las condiciones espectrométricas fueron:

- Voltaje del cono: 25.00 V para MTX y 20.00 V para ifosfamida.
- Energía de colisión: 20 V para MTX y 25 V para ifosfamida.

La transición de iones optimizada de metotrexato fue de: 455.21 >308.26 y para la ifosfamida (EI) fue de: 261.08 > 91.68. Ver Figuras 14 y 15.

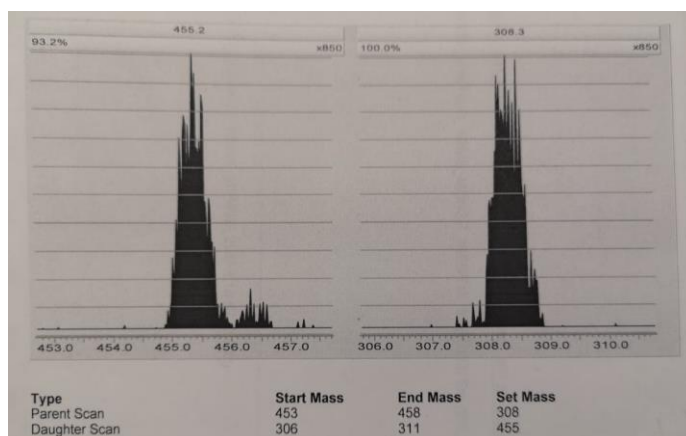


Figura 14. Espectrograma del “tuning” de MTX.

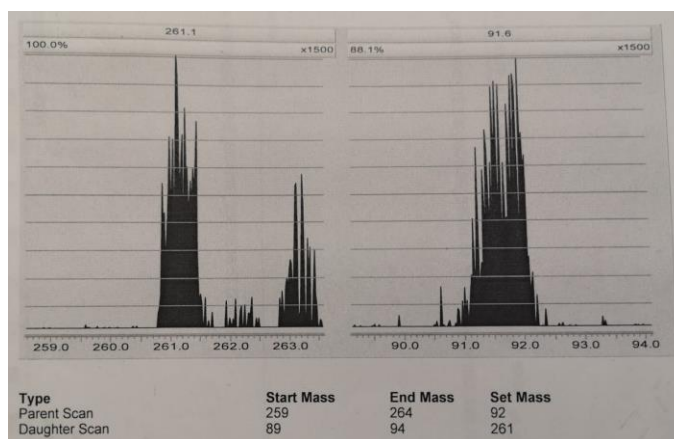


Figura 15. Espectrograma del “tuning” de ifosfamida.

6.2 Condiciones cromatográficas.

Las optimización se llevó a cabo con la columna Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μm , 50 mm x 2.1 mm, # de parte 186002350, marca Waters; cuyas condiciones cromatográficas finales fueron:

- Temperatura de la columna: 40 °C.
- Temperatura del inyector automático: 10 °C.
- Flujo: 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Volumen de inyección: 10 $\mu\text{L}/\text{min}$.
- Tiempo de corrida analítica: 2.5 min.
- Tiempo de retención de ifosfamida: 1.63 min.
- Tiempo de retención de MTX: 1.36 min.
- Fase móvil: conformada por una fracción A): ácido fórmico al 0.1% y una fracción B): acetonitrilo. Las fracciones A:B guardan una relación 45:55 v/v.

6.3 Variación de hematocrito (HCT).

En la Tabla 8 se puede observar que el HCT al 35% es óptimo para cuantificar cualquier muestra de paciente ya sea de 25, 30, 35, 40 o 45% porque los %CV y el % de desviación no son mayores al 10% como lo indica el protocolo técnico de cáncer en niños.

Este ensayo fue relevante dado que demostró que para cuantificar MTX no es necesario conocer el valor del porcentaje de hematocrito de la muestra de un paciente, pues la variación de la densidad de los hematíes no afecta la determinación de la concentración de MTX presente en la muestra.

Tabla 8. Determinación de MTX a diferentes porcentajes de hematocrito respecto a un hematocrito de 35%.

Ensayo	Porcentaje de hematocrito en muestra (%)				
	25	30	35	40	45
Concentración de MTX (ng/mL)					
1	550.8	573.2	645.8	578.5	642.0
2	626.2	678.4	564.8	606.4	552.9
3	588.5	625.8	580.7	592.4	622.5
Promedio	588.5	625.8	597.1	592.4	605.8
± DS	37.7	52.6	42.9	14.0	46.8
% CV	6.4	8.4	7.2	2.4	7.7
% Desviación	1.9	-4.3	0.5	1.3	-1.0

DS: Desviación estándar, % CV: Coeficiente de variación = (Desviación estándar/Promedio) (100), % Desviación = ((Concentración nominal – Concentración obtenida) / Concentración nominal) (100)

6.4 Selectividad.

El método fue selectivo a fármacos administrados en concomitancia durante los ciclos de tratamiento con metotrexato en pacientes pediátricos. Los fármacos probados fueron: acetaminofén, ácido fólico, amoxicilina, ketorolaco, naproxeno, sulfametoxazol y trimetoprima (Ver tabla 9). La prueba se llevó a cabo preparando muestras con la concentración del calibrador más alto (1500ng/mL con porcentaje de HCT de 35%) a las cuales se le adicionaron 20µL de las soluciones descritas en la segunda columna de la Tabla 9.

Tabla 9. Fármacos evaluados para la selectividad.

Fármaco	Concentración*	Concentración 20x (ng/mL)	Transición Ion Padre	Transición Ion Hijo
Acetaminofén	6,33 µg/mL	126,600	326.2	150.1
Ácido fólico	538 ng/mL	10,760	442.2	295.2
Amoxicilina	3,5 µg/mL	70,000	366.2	208.1
Ifosfamida	100ng/ml	NA	261.08	91.57
Ketorolaco	3,61 µg/mL	722,000	256.2	105.3
Metotrexato	1500 ng/mL	30,000	455.21	306.26
Naproxeno	60,98 µg/mL	1,219,600	185.2	170
Sulfametoxazol	53,9 µg/mL	1,078,000	254	188
Trimetoprima	2,1 µg/mL	42,000	291	230

*Concentraciones reportadas como las concentraciones máximas a dosis terapéuticas.

Se obtuvieron los cromatogramas de cada fármaco contando con sus respectivas transiciones:

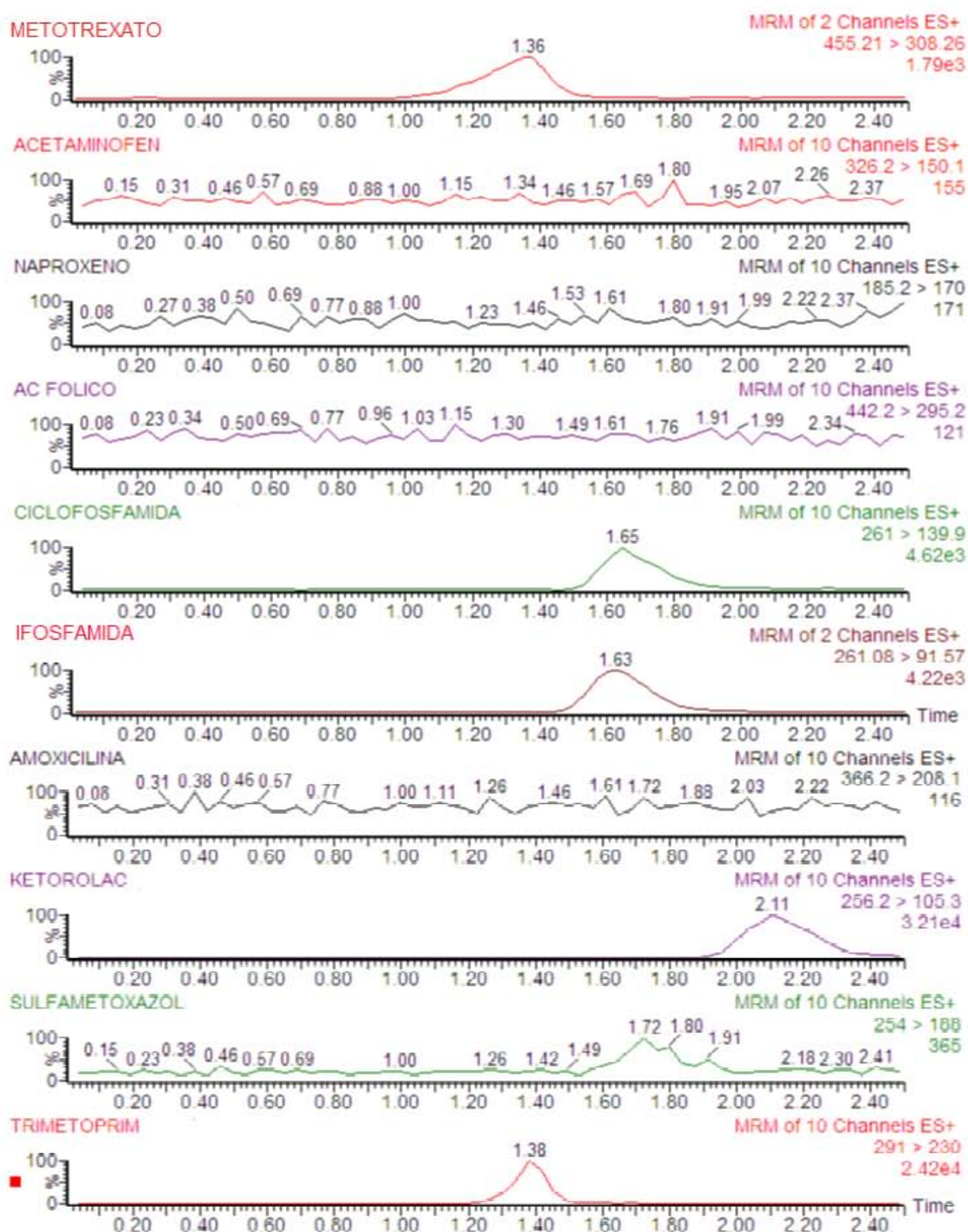


Figura 16. Cromatogramas de los fármacos utilizados para la prueba de selectividad.

Al ver los cromatogramas nos dimos cuenta de que el fármaco trimetoprima es la que se ionizó con la extracción y por lo tanto salió en un tiempo muy similar al del MTX (1.62 min.), sin embargo, esto no nos interfiere en la cuantificación del MTX ya que cada fármaco tiene una transición específica y en el equipo, que es sumamente sensible, se puede detectar con mucha precisión cada transición. Por lo tanto, podemos decir que el método es selectivo y que sólo realizamos esta prueba para cumplir con la norma.

6.5 Efecto de matriz.

Al término del ensayo, no se observó efecto de matriz, determinación que se efectuó mediante el análisis de muestras blanco, a las cuales se adicionaron metotrexato/ifosfamida en solución (concentración baja y alta de los puntos control), obteniendo la respuesta analítica correspondiente. Esto se comparó con las respuestas analíticas del cociente metotrexato/ifosfamida en solución. Se obtuvo el factor matriz normalizado (FMN) aplicando la siguiente fórmula:

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

Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Resultados del efecto de matriz.

Muestra		Respuesta del analito en la matriz	Respuesta del EI en la matriz	Respuesta del analito en solución	Respuesta del EI en solución	FMN
Control bajo	Promedio	242.42 ng/mL	1077.8 ng/mL	591.19 ng/mL	1726.66 ng/mL	0.66
	DE	22.68	27.72	21.9	18.27	
	%CV	9.4	2.6	3.7	1.1	
Control alto	Promedio	2261.86 ng/mL	1159.4 ng/mL	4995.18 ng/mL	1785.08 ng/mL	0.69
	DE	63.82	27.83	107.51	30.49	
	%CV	2.8	2.4	2.2	1.7	

La norma nos indica que los %CV del FMN de las unidades evaluadas no debe ser mayor que el 15% y como se observa en la Tabla 9 todos los %CV caen dentro del valor marcado en la norma, por lo tanto, podemos concluir que no hay efecto de matriz.

6.6 Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas.

Al analizar tres muestras blanco, una antes y dos después del análisis de la muestra correspondiente al límite superior de cuantificación (1500 ng/mL). Como se logra observar no existen interferencias próximas al tiempo de retención del analito ni del estándar interno, por lo cual se concluye que no existe efecto de acarreo.

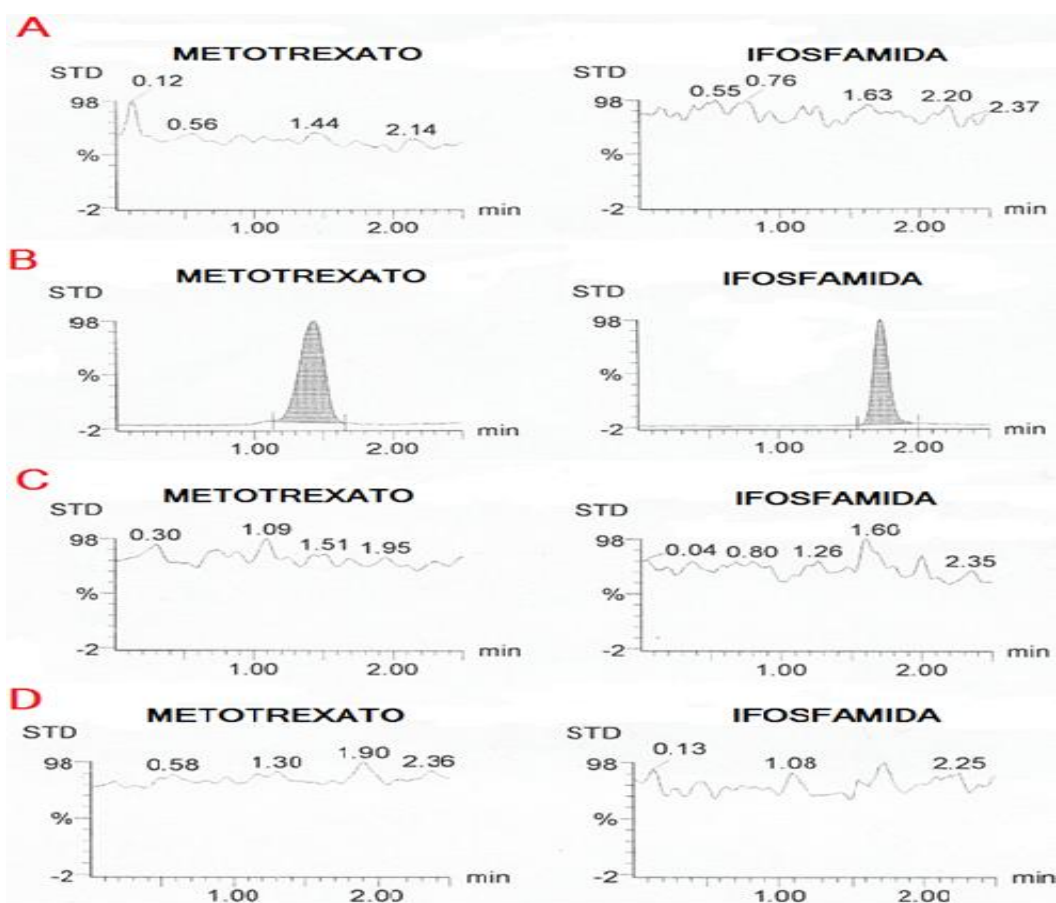


Figura 17. Cromatogramas obtenidos para determinación de efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas. **A)** Muestra blanco, inyección 1. **B)** Inyección límite superior de cuantificación. **C)** Muestra blanco, inyección 2. **D)** Muestra blanco, inyección 3.

6.7 Límite de cuantificación.

Para establecer nuestro límite de cuantificación tomamos en cuenta que para poder dar de alta a un niño con LLA al que se le ha administrado MTX, la concentración mínima de este fármaco debe ser menor a 1.0 $\mu\text{mol/L}$ a las 42 h (a esto se le llama límite de seguridad del paciente), que equivale a 0.454 $\mu\text{g/mL}$ (≈ 50 ng/mL), concentración que quedo establecida como nuestro límite de cuantificación. Este valor se tomó del libro “Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia”, el cual es una referencia utilizada en el INP para tratamiento de pacientes con LLA. La exactitud del límite de cuantificación fue determinada analizando la concentración más baja de la curva CC1 (50 ng/mL), para esta prueba se inyectaron por quintuplicado controles a dicha concentración por tres días consecutivos, posteriormente se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el %CV.

Tabla 11. Datos obtenidos límite de cuantificación.

	CC1 (ng/mL)
Día 1	50.0
	50.6
	48.9
	50.6
	49.4
Día 2	50.8
	48.0
	51.7
	49.4
	51.4
Día 3	51.5
	50.5
	49.1
	47.7
	49.5
Promedio	49.9
DE	1.2
%CV	2.4
%Desviación	0.12

Como ya se mencionó, se considera que el punto tiene validez si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%. Los resultados nos arrojaron un promedio de 49.94 ng/mL y un %CV de 2.44, por lo que se encuentra dentro de los parámetros establecidos. Ver tabla 10.

6.8 Linealidad del método.

Con base en los resultados obtenidos, se logró determinar que el método tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones de 50 ng/mL a 1500 ng/mL, valores que se determinaron construyendo tres curvas de calibración por tres días consecutivos. Ver Tabla 12.

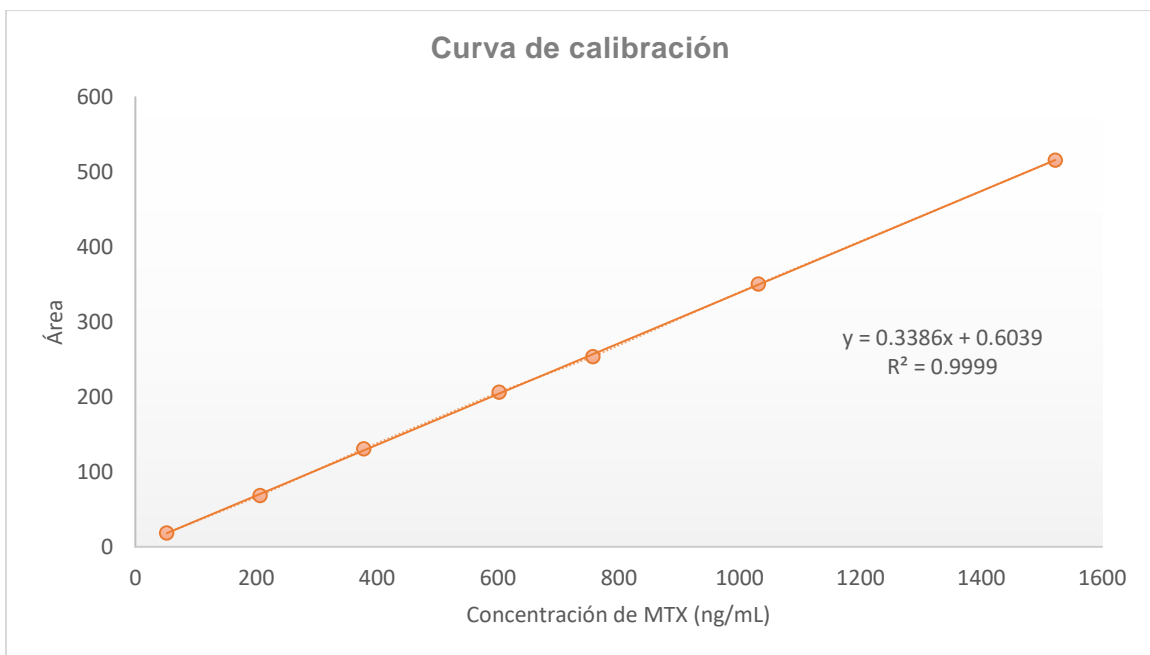
Tabla 12. Linealidad del método.

		Concentración nominal de MTX (ng/mL)						
		50	200	400	600	800	1000	1500
Día	Ensayo	Concentración recuperada de MTX (ng/mL)						
1	1	48.3	219.5	360.5	664.4	716.2	1014.8	1526.3
	2	50.5	229.7	412.1	523.0	815.5	1106.8	1442.0
	3	49.7	216.9	352.3	644.6	812.9	903.9	1569.7
2	4	52.3	215.7	348.3	604.0	726.5	1065.5	1537.7
	5	55.1	191.4	369.4	621.0	728.9	1042.9	1541.3
	6	53.1	190.3	387.9	614.0	763.1	1032.3	1509.1
3	7	54.5	180.0	404.3	626.8	739.8	1003.0	1541.7
	8	56.5	198.8	378.1	543.5	733.9	1042.9	1596.3
	9	48.2	214.9	390.5	578.5	779.3	1064.7	1437.9
	Promedio	52.0	206.4	378.2	602.2	757.3	1030.8	1522.4
	DE	3.0	16.7	22.4	46.2	37.6	56.5	53.0
	%CV	5.8	8.1	5.9	7.7	5.0	5.5	3.5
	%Desviación	-4.0	-3.2	5.5	-0.4	5.3	-3.1	-1.5

Al graficar la concentración recuperada promedio vs el área promedio (Tabla 13) obtenemos la siguiente ecuación de la recta: $y = 0.3386x + 0.6039$ y un coeficiente de correlación de 0.9999, lo que nos permite aseverar que el método tiene un buen comportamiento lineal y que la relación entre la concentración y la respuesta es continua y reproducible (Ver Gráfica 1). Así mismo, todos los datos de concentración recuperada en cada nivel de la curva de calibración se encuentran dentro del 15% de su concentración nominal, dicha especificación está marcada en la norma.

Tabla 13. Linealidad del método.

Concentración nominal de MTX (ng/mL)	Concentración recuperada de MTX (ng/mL)	ÁREA
50	52.0	18.302
200	206.4	68.665
400	378.2	130.906
600	602.2	206.174
800	757.3	253.893
1000	1030.8	350.872
1500	1522.4	515.888



Grafica 1. Curva de calibración del método.

6.9 Precisión y exactitud.

Los resultados que se exponen en las Tablas 14 y 15, muestran que el método desarrollado cumple con los criterios de precisión. La precisión del método se determinó mediante el análisis por quintuplicado de las concentraciones de los puntos control PC1, PC2, PC3 y PC4 (150, 500, 900 y 1200 ng/mL, respectivamente) en un solo día (repetibilidad del método). Las mismas concentraciones fueron determinadas por quintuplicado durante dos días más (una corrida analítica por día), de manera que, finalmente, se cuentan con 3 corridas analíticas diferentes determinadas durante tres días consecutivos (reproducibilidad).

Los ensayos realizados cumplen con los criterios que establece la norma oficial vigente, ya que el valor promedio de las determinaciones de cada concentración en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad (% Desviación), están dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

Tabla 14. Repetibilidad del método.

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	162.8	548.9	943.8	1218.2
	166.2	509.3	903.2	1209.6
	153.4	486.6	864.8	1280.2
	146.5	498.7	1055.8	1257.3
	160.6	502.1	851.1	1224.8
Promedio	157.9	509.1	923.7	1238.0
DE	7.9	23.7	82.2	29.7
%CV	5.0	4.7	8.9	2.4
%Desviación	-5.3	-1.8	-2.6	-3.2

Tabla 15. Reproducibilidad del método.

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
Día 1	162.8	548.9	943.8	1218.2
	166.2	509.3	903.2	1209.6
	153.4	486.6	864.8	1280.2
	146.5	498.7	1055.8	1257.3
	160.6	502.1	851.1	1224.8
Día 2	172.3	573.0	936.3	1247.4
	158.3	506.8	1024.2	1330.3
	168.2	536.6	962.0	1314.0
	149.2	493.5	1047.3	1267.7
	158.3	465.6	891.6	1163.4
Día 3	171.2	500.5	962.3	1327.1
	149.7	503.6	888.1	1230.3
	155.4	491.4	928.5	1268.2
	149.0	508.1	935.3	1318.1
	172.0	516.3	1039.3	1219.1
Promedio	159.5	509.4	948.9	1258.4
DE	9.0	26.3	66.4	49.1
%CV	5.6	5.2	7.0	3.9
%Desviación	-6.4	-1.9	-5.4	-4.9

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

$$\% \text{ desv} = 100 \times \frac{\text{concentración adicionada} - \text{concentración recuperada}}{\text{concentración adicionada}}$$

Según la norma este valor no debe ser mayor al 15% por lo que concluimos que nuestro método resulto ser exacto en los controles de cada nivel.

6.10 Estabilidad.

Los ensayos de estabilidad se realizaron determinando las concentraciones de los puntos control baja (PC1) y alta (PC4) (150 y 1200 ng/mL, respectivamente).

Las muestras fueron estables al menos 5 horas (tiempo de procesamiento) a una temperatura de 25°C (Tabla 16), también durante 60 días conservadas a -80°C (Tabla 17), como muestra procesada (muestra extraída, pero no resuspendida) al menos 24 horas a 4°C (Tabla 18) y al menos 8 horas a 15°C en automuestreador (Tabla 19). También fue estable a los ciclos de congelación y descongelación (Tabla 20).

Tabla 16. Estabilidad a corto plazo (5 horas / 25°C).

	PC1 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	162.0	1192.2
	163.7	1147.1
	148.6	1215.4
Promedio	158.1	1184.9
DE	8.3	34.7
%CV	5.2	2.9
%Desviación	-5.4	1.3

Tabla 17. Estabilidad a largo plazo (60 días / -80°C).

	PC1 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	143.4	1205.2
	150.7	1198.1
	149.3	1205.7
Promedio	147.8	1203.0
DE	3.9	4.3
%CV	2.6	0.4
%Desviación	1.5	-0.3

Tabla 18. Estabilidad de la muestra procesada, 24 horas.

	PC1 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	168.1	1254.1
	163.9	1281.8
	157.8	1226.5
Promedio	163.3	1254.1
DE	5.2	27.7
%CV	3.2	2.2
%Desviación	-8.8	-4.5

Tabla 19. Estabilidad en automuestreador 8 horas.

	PC1 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	151.8	1225.8
	144.5	1282.9
	153.2	1202.8
Promedio	149.8	1237.2
DE	4.7	41.2
%CV	3.1	3.3
%Desviación	0.1	-3.1

Tabla 20. Estabilidad ciclos congelación-descongelación (3 ciclos).

	PC1 (ng/mL)	PC4 (ng/mL)
	150.6	1227.7
	157.4	1218.9
	149.6	1185.6
Promedio	152.5	1210.7
DE	4.2	22.2
%CV	2.8	1.8
%Desviación	-1.7	-0.9

Se considera un ciclo de congelación-descongelación cuando las muestras se almacenan en congelación por 12 horas, y después se descongelan completamente a temperatura ambiente y se vuelven a congelar por lo menos 12 horas bajo las mismas condiciones.

Para la estabilidad de la solución se prepararon muestras por triplicado de una solución de referencia fresca y de trabajo fresca (recién preparadas) y de una solución de referencia y de trabajo que teníamos en uso (almacenada a -80°C y que se ha estado empleando continuamente). El valor promedio de la respuesta analítica

de las soluciones en uso debe ser comparado con respecto al valor promedio obtenido de la solución fresca, las soluciones serán consideradas estables si la degradación de las soluciones en uso con respecto a las soluciones frescas no es mayor que el 10%.

Tabla 21. Estabilidad de la solución de referencia fresca.

Muestra	#	[Recuperada] ng/mL
Referencia fresca	1	5126.7
	2	5008.1
	3	4962.6
	Promedio	5032.5
	DE	69.2
	%CV	1.4
	% Desviación	-0.6

Tabla 22. Estabilidad de la solución de referencia en uso.

Muestra	#	[Recuperada] ng/mL
Referencia en uso	1	4824.5
	2	4582.2
	3	4592.9
	Promedio	4666.5
	DE	111.8
	%CV	2.4
	% Desviación	6.7

Ejemplo de cálculo:

$$\begin{aligned}
 5032.5 &= 100\% \\
 4666.5 &= x \\
 x &= 92.73 \\
 100 - 92.73 &= 7.27\%
 \end{aligned}$$

Por lo tanto, la solución en uso se ha degradado un 7.27% y cumple con nuestra especificación.

Tabla 23. Estabilidad de la solución de trabajo fresca.

Muestra	#	[Recuperada] ng/mL
Trabajo fresca	1	5138.6
	2	5188.6
	3	5036.8
	Promedio	5121.3
	DE	63.2
	%CV	1.2
	% Desviación	-2.4

Tabla 24. Estabilidad de la solución de trabajo en uso.

Muestra	#	[Recuperada] ng/mL
Trabajo en uso	1	5051.3
	2	4982.5
	3	4902
	Promedio	4978.6
	DE	61.0
	%CV	1.2
	% Desviación	0.4

La solución en uso se degrado un 2.79% con respecto a la fresca y cumple con nuestra especificación.

7. APLICABILIDAD DEL MÉTODO.

Se realizó el monitoreo de las concentraciones sanguíneas de MTX en 5 pacientes pediátricos (4 niños y 1 niña) con diagnóstico de LLA, deben medirse a las 24 h para evaluar el nivel del fármaco alcanzado con la dosis administrada y a las 42 h para estimar la eliminación del fármaco.

Como ya se mencionó, el remanente de MTX a las 42 h posteriores a su administración debe ser inferior a 1.0 $\mu\text{mol/L}$.

Tabla 25. Determinación de MTX por DBS en pacientes pediátricos.

Paciente	Género	Muestra (h)	Conc. ng/mL	Conc. $\mu\text{mol/L}$
1	M	1	---	---
		4	---	---
		24	586.6	1.29
		42	---	---
2	M	1	10791.0	23.77
		4	5992.2	13.20
		24	1832.1	4.03
		42	---	---
3	F	1	1132.3	2.49
		4	1451.0	3.20
		24	1166.9	2.57
		42	---	---
4	M	1	4353.7	9.60
		4	3945.9	8.69
		24	3780.1	8.33
		42	67.6	0.15
5	M	1	23613.0	52.01
		4	11962.4	26.35
		24	1401	3.09
		42	---	---

---- No hay muestra.

Como se puede observar en la tabla anterior solo pudimos obtener la muestra de un paciente a las 42 h, esto debido principalmente a que en el hospital en lugar de dar de alta a las 42 h como está establecido, se les da de alta a las 24 h debido a

la alta demanda de lugares, cabe mencionar que los médicos hacen una revisión del infante y si no presenta mucositis (que es un efecto secundario en pacientes administrados con antineoplásicos) y tiene buen semblante es cuando se les da la alta. Otro factor para considerar es el hecho de que es muy difícil que los padres accedan a dar su consentimiento de la toma de muestras de sus hijos para investigación, ya que piensan que no va a ser de utilidad para ellos.

Dicho lo anterior se tomaron como horas clave las 24 y 42 h donde la mínima concentración obtenida fue de 67.6 ng/mL y la máxima de 3780.1 ng/mL por lo que muchos de nuestros valores quedan fuera de nuestra curva propuesta (50-1500 ng/mL) y por lo que se tendría que considerar ampliar el rango de la curva de 50 a 5000 ng/mL para poder abarcar mayor número de pacientes, cabe mencionar que al iniciar el proyecto no teníamos datos suficientes sobre las concentraciones así que empezamos con un screening para ver si la curva era adecuada o había que modificarla (bajarla o subirla de concentración) los únicos datos que teníamos eran de HPLC y fueron los que consideramos para hacer nuestra curva.

Del único paciente que se tiene la muestra de las 42 h (Paciente 4) obtuvimos una concentración de 0.15 $\mu\text{mol/L}$ por lo que se le daría de alta con certeza y sin riesgo de toxicidad, demostrando que la validación del método es una sólida herramienta para dictaminar el alta de un paciente.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

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

Para validar un método analítico hay muchas posibles opciones para poder hacerlo, sin embargo, en farmacología clínica la norma vigente es la NOM-177-SSA1-2013, la cual en su apartado 9.1 se hace mención la validación de métodos analíticos para el análisis de muestras biológicas, y que el INP tiene que cumplir como una institución de salud pública.

Los métodos consultados en la literatura cumplen con ser métodos sensibles y selectivos; sin embargo, el tratamiento de la muestra no es tan simple, o los volúmenes de muestra que dichos métodos necesitan son relativamente grandes.

El desarrollo y validación de este método para cuantificar metotrexato por UPLC ofrece varias ventajas sobre los ya existentes en HPLC ya que al estar acoplado a un espectrómetro de masas la sensibilidad es mucho mayor que por UV, también la columna al ser más pequeña disminuye el tiempo de las corridas analíticas que van de 3 a 8 min y en un HPLC pueden llegar a ser de entre 10 y hasta 45 min, por lo que la cantidad de disolventes empleados es menor y al mismo tiempo la rapidez de análisis se reduce significativamente y con ello el costo del estudio. Otro punto importante es que el volumen de inyección también disminuye, para un UPLC se

inyectan menos de 10 μL mientras que para HPLC los volúmenes van de 100-200 μL .

Otras ventajas son que se requieren volúmenes muy pequeños de muestra (apenas unas gotas), la facilidad con la que se obtienen las muestras sanguíneas, ya que la técnica de DBS al ser muy poco invasiva tiene mayor aceptación por parte de los pacientes y sus tutores, que una muestra obtenida por venoclisis. Otra virtud del método desarrollado es referida a la técnica de extracción de MTX de la matriz biológica, pues su procesamiento es sencillo comparada con HPLC y otras técnicas.

La importancia de este método analítico validado reside en que podrá darse un seguimiento más detallado a los pacientes pediátricos diagnosticados con LLA, puesto que, al determinar las concentraciones sanguíneas de metotrexato, puede determinarse si al paciente se le puede dar de alta o no y evitar efectos adversos y tóxicos que se le asocian.

Sin duda hay muchas áreas de oportunidad para mejorar el método, pero con este trabajo ya se tiene un antecedente para continuar la investigación y que se ponga en marcha la aplicabilidad para mejorar la calidad de la estancia de los pacientes en el INP.

9. CONCLUSIONES.

Se desarrolló y validó con éxito un método analítico por UPLC-MS/MS empleando la técnica de DBS, método que resulta ser lineal, reproducible, exacto, y lo suficientemente sensible y selectivo para realizar la cuantificación de metotrexato en pacientes pediátricos cumpliendo con los criterios establecidos en el apartado 9.1 de la NOM-177-SSA1-2013.

El método desarrollado en esta tesis resultó eficiente y accesible para la monitorización terapéutica de MTX y puede aplicarse de manera rutinaria para fungir como una útil herramienta que permita de manera rápida saber si un paciente puede darse de alta o no para evitar posibles intoxicaciones en infantes que reciben el tratamiento y permitiendo la toma de decisiones médicas pertinentes en un corto tiempo de análisis.

10. REFERENCIAS.

1. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-aguda.html>
2. 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.
3. Manuel Alfredo Ortega Sánchez, María Luisa Osnaya Ortega y José Vicente Rosas Barrientos. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México.* 23(1), 26-33.
4. Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento. Seguro Popular. México. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/dgpfs/micsitio/ptcia/recursos/LEUCEMIA.pdf>
5. Instituto Nacional del Cáncer. Consultado el 9 de julio de 2019 y disponible en <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/paciente/tratamiento-lla-infantil-pdq>
6. Rivera-Luna, R., Correa-González, C., Altamirano-Alvarez, E., Sánchez-Zubieta, F., Cárdenas-Cardós, R., Escamilla-Asian, G., Olaya-Vargas, A., Bautista-Marquez, A., Aguilar-Romo, M., 2012. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International Journal of Cancer*, pp.1646-1650.
7. Fernández, S. B., Zimbrón, E. A., León, G., Murguía, P., Torres, M., 2011. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes. Fecha de consulta: 10/07/19. Disponible en: https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_del_cancer_en_nic3b1osyadolescentes_mexico.pdf

8. Rivera Luna R. 2010. Editor. Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y el tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia. 374 pp. Impreso en México ISBN 978-607-7817-10-9.
9. Asselin B, Shuster J, Amylon M, et al. Improved event-free survival (EFS) with high dose methotrexate (HDM) in T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL) and advanced lymphoblastic lymphoma (T-NHL): a Pediatric Oncology Group (POG) study. Proceedings of the American Society of Clinical Oncology A-1464, 2001.
10. O'Neil, Maryadele J. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Whitehouse Station, N. J., 2013, Fifteenth Edition.
11. Rang H. *et al.* (2008). Farmacología. (6° ed.). Barcelona, España: Elsevier. Pp. 10, 102, 109, 240, 241, 718, 719.
12. Goicoechea García, C. (2016). Farmacología del metotrexato. Reumatología clínica;11(1), 1-2. Recuperado de: <https://www.reumatologiaclinica.org/es-linkresolver-farmacologia-del-metotrexato-X1699258X16545643>
13. Kalan H., Walter HE. 2001. Principios de farmacología médica. Editorial Oxford University Press. México D.F. 2002; 757-763.
14. Vandecum.
Disponible en: <https://www.igb.es/cbasicas/farma/farma04/m035.htm>
15. Sparreboom A, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Verweij J, Liquid chromatographic analysis and preliminary pharmacokinetics of methotrexate in cancer patients co-treated with docetaxel, Journal of Chromatography B, 735 (1999) 111–119.

16. Chan E, Cronstein B. Molecular action of Methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Research* 2002; 4 (4):266-73.
17. Güthrie R. and Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large population of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32:338-343.
18. Wenkui Li and Francis L.S. Tse. (2010). Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography*. 24:49-65.
19. Baudette P and Bateman K. Discovery stage pharmacokinetics using dried blood spot. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* . 2004 Sep 25; 809(1):153-8.
20. Ronn A, Lemnge M, Angelo H, Bygbjerg I. High-performance liquid chromatography determination of dapsone, monoacetyldapsone, and pyrimethamine in filter paper blood spots. *The Drug Monit*. 1995 Feb; 17(1):79-83.
21. Emmons G and Rowland M. Pharmacokinetic considerations as to when to use dried blood spot sampling. *Bioanalysis*. 2010. 2(11): 1791-1796.
22. McDade TW, Williams S and Snodgrass J. J. (2007). What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 44 (4). Recuperado de: <http://www.pinniped.net/McDadebiomarkers.pdf>
23. De Kesel, P. M., Sadones, N., Capiou, S., Lambert, W.E., Stove, C.P., 2013 Hematocritical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis*, Vol. 5, pp. 2023–2041.

24. Wilhelm, A. J., den Burger, J. C. G., Swart, E. L., 2014. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clinical pharmacokinetics*, Vol. 53, pp. 961-973.

25. Shraed, S., 2014. Introductory mass spectrometry (4, 6, 146-147,153-154), Second edition ed. USA: Taylor and Francis Group.

26. Guía de validación de métodos analíticos, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. Disponible en:

https://www.academia.edu/4513278/Guia_de_Validacion_de_metodos_analiticos_editada_por_QFB_de_Mexico

27. Arjona, Luis. (2018). Conceptos básicos del proceso de validación de métodos analíticos. *enFarma*, 19(4), 14-16.

28. NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad. México, 2013.