



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE FARMACIA



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACIA

PRESENTA
QFB. DIANA GONZÁLEZ MARAÑÓN

DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

Cuernavaca, Morelos Diciembre 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Q.F.B. DIANA GONZÁLEZ MARAÑÓN
ALUMNA DE MAESTRIA EN FARMACIA

PRESENTE

Por este medio le informo que en la sesión extraordinaria del Consejo Interno de Posgrado (CIP) celebrada el día 15 de diciembre de 2021 se analizó su solicitud para asignación de Comisión Revisora y Jurado revisor para la tesis titulada **“Desarrollo y validación de un método bioanalítico para la cuantificación de metotrexato en lisado de eritrocitos”**, y tomando en cuenta su propuesta de posibles sinodales, el CIP designó a los siguientes investigadores como integrantes de la Comisión Revisora:

- | | |
|---|------------|
| 1. Dra. Dea Herrera Ruiz | Presidente |
| 2. Dr. Julio César Rivera Leyva | Secretario |
| 3. M.M.M. Ana Victoria Hernández Torres | Vocal 1 |
| 4. Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia | Suplente 1 |
| 5. Dr. José Luis Montiel Hernández | Suplente 2 |

Se le solicita entregar las tesis y el presente oficio a los integrantes de la Comisión Revisora y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Esperando que esta resolución sea en beneficio de su desempeño académico, y sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe del Posgrado en Farmacia

ccp: archivo:

Dra. Dea Herrera Ruiz; Dr. Julio César Rivera Leyva; MMM Ana Victoria Hernández Torres; Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia; Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha: 2021-12-15 15:53:42 | Firmante

cXIdexSmkF8qPpM9W0mkli9X3uyXoYr0CMSwhY1/aHzRdPoiLUfmuvr08Yz2wRxobRx0DQKAHq0DAcLVmzNA22iixVha5yJ6rB15uo8Zpf+jGyCMytifSv6tAXqeWglluilHo9gxeExK40oT2ZdObxNOqJEpWgV5HEMI98dtOv9Tx6WDhHEdqVHL8YZsBv99U0DWEAWke7M/89aobHL41eCHU42hYYAZjvp0A+TRUIfpUYhC0106YxlMf#pIMSDKYm94hKb9pRPyQJ7zmbLCSpd0oZ9KU8xTsdEVCXdBTPhzT61YHupoh+LEjzkStOKTmCef0mjiTHLK/ecbmuQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9MyRxmbGO

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/wYPPIFmOWZ7c2OQKBZP0jjNbDmuJHOXI>

UA
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023

Este trabajo se realizó en la Facultad de Farmacia
de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Agradecimientos a CONACYT por la beca otorgada, CVU no. 1043127.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. José Luis Montiel Hernández y al Dr. Julio César Rivera Leyva por los recursos materiales, las ideas, los consejos, la paciencia, y el tiempo dedicado al desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Daniel X. Xibillé Friedmann, por formar parte de mi comité tutorial y asesorarme en el planteamiento del proyecto.

A la Dra. Dea Herrera Ruiz, la Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia y la M.M.M Ana Victoria Hernández Torres por las observaciones realizadas al documento, las cuales permitieron la mejora del trabajo.

A mis compañeros de los laboratorios 4 y 13, quienes me enseñaron a través de sus preguntas.

A mis profesores, quienes me enseñaron las diversas aristas del quehacer científico e incrementaron el conocimiento académico.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
GLOSARIO	12
1. RESUMEN.....	13
2. ABSTRACT.....	15
3. INTRODUCCIÓN.....	16
3.1 Artritis Reumatoide	16
3.1.1 Epidemiología	16
3.1.2 Desarrollo de la enfermedad.....	17
3.1.3 Tratamiento.....	18
3.1.4 Monitoreo terapéutico en pacientes con AR.....	27
3.2 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (CLAR)	28
3.2.1 Componentes principales.....	28
3.2.2 Mecanismos de interacción.....	30
3.2.3 Modos de separación de CLAR	30
3.2.4 Análisis cuantitativo por CLAR	31
3.3 Desarrollo y validación de métodos por CLAR.....	33
4. ANTECEDENTES	38
4.1 Métodos de cuantificación de MTX.....	38
4.1.1 Pretratamiento de la muestra	38
4.1.2 Métodos de extracción de MTX.....	42
4.1.3 Condiciones cromatográficas	43
4.1.4 Validación de métodos bioanalíticos	43
5. JUSTIFICACIÓN	45
6. OBJETIVOS	46
7. MATERIALES Y MÉTODOS	47
7.1 Reactivos	47
7.2 Instrumentos.	47
7.3 Selección de estándar interno	47
7.4 Soluciones stock y de trabajo.....	48
7.5 Desarrollo de método bioanalítico y optimización de las condiciones cromatográficas para la detección de MTX.....	48
7.6 Obtención de matriz biológica de MTX en eritrocitos.....	49

7.7 Extracción de MTX del lisado de eritrocitos	49
7.7.1 Extracción líquido-líquido	50
7.7.2 Extracción en fase sólida	50
7.8 Validación de método bioanalítico	51
7.9 Evaluación de la aplicación del método a muestras de pacientes con AR	52
8. RESULTADOS	54
8.1 Desarrollo de método bioanalítico	54
8.1.1 Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas	54
8.1.2 Selección del estándar interno 1	61
8.1.3 Extracción de MTX de lisado de eritrocitos	62
8.1.4 Evaluación de teofilina como estándar interno 2	70
8.2 Validación de método bioanalítico	73
8.3 Evaluación de muestras de pacientes con AR.....	84
9. DISCUSIÓN	90
9.1 Desarrollo de método bioanalítico	90
9.1.1 Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas	90
9.1.2 Selección del estándar interno	92
9.1.3 Extracción de MTX de lisado de eritrocitos	92
9.2 Validación de método bioanalítico	93
9.3 Evaluación de muestras de pacientes con AR.....	96
9.4 Monitoreo de MTX en pacientes con AR	97
9.5 Limitaciones del estudio	98
10. CONCLUSIONES	100
11. PERSPECTIVAS	101
12. BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXO I	108

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura	Título	Página
1	Estructura química y metabolismo de metotrexato.	21
2	Esquema de disociación de metotrexato.....	26
3	Esquema representativo de un cromatógrafo de líquidos.....	28
4	Interacciones moleculares entre columna y soluto en CLAR.....	30
5	Esquema representativo de la separación en fase reversa.....	31
6	Representación esquemática del proceso de desarrollo de un método analítico.....	34
7	Análisis preliminar de MTX: 100 µg/ml en fase móvil Agua: ACN.....	54-55
8	Evaluación de la composición de la fase móvil 90:10 Citrofosfato: ACN	56
9	Evaluación de la composición de la fase móvil 80:20 Citrofosfato: ACN	56
10	Evaluación de la composición de la fase móvil 95:5 Citrofosfato: ACN.....	57
11	Evaluación del efecto de la fuerza iónica.	58
12	Evaluación de la carga de carbono	59
13	Evaluación de la detección de MTX.....	60
14	Cromatogramas de sustancias propuestas como estándar interno.....	61-62
15	Cromatogramas de extracción líquido-líquido en plasma humano.....	63-64
16	Extracción líquido-líquido por el método MCA en lisado de eritrocitos.....	65-66

No. de Figura	Título	Página
17	Extracción de MTX por el método ELL-MCA en lisado de eritrocitos diluidos.....	66-68
18	Extracción de MTX por el método ELL-ACN en lisado de eritrocitos diluidos.....	68-70
19	Detección de teofilina 10 ng/ml y MTX 150 ng/ml en citrofosfato pH 6.....	71
20	Extracción de teofilina (10 ng/ml) y MTX de lisado de eritrocitos.....	71-73
21	Cromatograma de lisado de eritrocitos de donadores aparentemente sanos.....	74-76
22	Evaluación de especificidad.....	77
23	Cromatogramas de pacientes con AR.....	85-89

ÍNDICE DE TABLAS

No. de Tabla	Título	Página
1	Estudios clínicos con medición de MTX y MTX-PG.	23-24
2	Absortividad molar (ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) de MTX y sus especies ionizadas	26
3	Metodologías para la cuantificación de MTX y MTX-PG en sangre.....	39-41
4	Extracción de MTX de plasma humano.....	64
5	Extracción de MTX de lisado de eritrocitos.....	70
6	Porcentaje de recobro de la extracción de teofilina del lisado de eritrocitos.....	73
7	Evaluación de la correlación entre concentración de MTX y relación respuesta MTX/EI.....	77
8	Evaluación de la correlación entre concentración de MTX y respuesta absoluta de MTX.....	79
9	Evaluación de la respuesta absoluta del EI.....	79
10	Evaluación de exactitud para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos.....	80
11	Evaluación de precisión para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos.....	81
12	Evaluación de recobro para la determinación de MTX en eritrocitos...	82
13	Evaluación de estabilidad para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos almacenados a -20°C por 30 días.....	83
14	Resultados de la validación del método bioanalítico.....	83-84
15	Resultados prueba de adecuabilidad (sistema).....	84
16	Correlación entre concentración y área de MTX.....	84
17	Evaluación de los controles de calidad.....	85

No. de Tabla	Título	Página
18	Evaluación de extracción de MTX en muestras de eritrocitos de pacientes con AR.....	89

GLOSARIO

Artritis reumatoide (AR): enfermedad articular inflamatoria crónica de naturaleza autoinmune (caracterizada por la producción de anticuerpos contra inmunoglobulina G y proteínas citrulinadas), que de no tratarse oportunamente conduce a daño articular y una discapacidad irreversible.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector ultravioleta (CLAR-UV): técnica de separación de componentes de una mezcla, por la diferente distribución entre una fase estacionaria sólida (compuesta por pequeñas partículas, contenidas en una columna) y una fase móvil líquida (la cual es bombeada a alta presión). Para hacer posible una identificación y cuantificación de los componentes de la mezcla, el sistema cromatográfico se acopla a diferentes detectores (de acuerdo con las propiedades del analito de interés), siendo frecuente el uso de la espectroscopia ultravioleta como detector.

Extracción Líquido-Líquido (ELL): tratamiento aplicado a la muestra con la finalidad de extraer el analito de interés, donde se hace uso la solubilidad del analito en diferentes solventes.

Metotrexato (MTX): fármaco análogo y antagonista del ácido fólico; originalmente desarrollado como medicamento contra el cáncer, pero debido a sus actividades antiinflamatorias e inmunomoduladoras se le ha considerado como el fármaco antirreumático modificador de la enfermedad de primera elección para el tratamiento de la AR.

Poliglutamatos de metotrexato (MTX-PG): metabolito activo de metotrexato en el tratamiento de la AR, que se forman tras la adición de 2 a 7 residuos de glutamato por acción de la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS).

1. RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria y autoinmune; que sin un tratamiento adecuado puede derivar en discapacidad y disminución de la esperanza de vida del paciente. El metrotexato (MTX), a dosis $<25\text{mg/semana}$, es el principal medicamento en el tratamiento del paciente con AR, debido a su efectividad, el control de efectos adversos (tras su coadministración con ácido fólico) y su bajo costo. Aunque su mecanismo de acción no es del todo comprendido; se considera que sus metabolitos (especies poliglutaminadas de MTX) son los responsables de su acción antiinflamatoria e inmunosupresora y se ha observado que su acumulación en eritrocitos es diferente entre aquellos pacientes que responden a MTX y aquellos que no lo hacen. Estas observaciones han llevado a considerar que la medición de los niveles de MTX y sus metabolitos en eritrocitos permitiría, eventualmente, proporcionar un método para monitorear la respuesta terapéutica. Sin embargo, hasta ahora los métodos desarrollados para monitorear las concentraciones de MTX y sus metabolitos en eritrocitos son sumamente costosos, lo que ha comprometido su aplicación en el ámbito clínico. Desafortunadamente no se pudo contar con estándar de las formas poliglutaminadas del MTX, por lo cual se propuso como objetivo de este proyecto el desarrollar y validar una metodología bioanalítica para la cuantificación sólo del MTX en eritrocitos de pacientes con AR. En ese sentido, se desarrolló un sistema para la detección de MTX por CLAR-UV empleando como fase móvil citrofosfato pH 6: acetonitrilo, en proporción 95:5 y como fase estacionaria una columna C_{18} con carga de carbono al 18% y un detector UV-longitud de onda variable a $\lambda=302\text{ nm}$. Para la extracción de MTX se propuso una extracción líquido-líquido por el método de precipitación de proteínas metanol-cloroformo-agua. El estudio de validación indicó que la cuantificación de MTX en lisado de eritrocitos no presenta interferencias endógenas para MTX. Así mismo, el método generado permite la identificación y diferenciación inequívoca de MTX y ácido fólico. Se detectó una correlación lineal entre la concentración y el área de MTX, lo que permite el empleo de un modelo de ajuste lineal en un rango de concentración de 25 a 225 ng/ml. Dado que los criterios de aceptación para exactitud se cumplen a concentraciones $>50\text{ ng/ml}$ y para precisión a concentraciones $>125\text{ ng/ml}$; el límite de cuantificación se estableció en 125 ng/ml. De manera teórica, se calculó un límite de detección en 4.61 ng/ml. Respecto al recobro, éste fue superior al 65% y se comprobó una estabilidad a concentración de 200 ng/ml durante almacenamiento a -20°C por 30 días. El análisis de muestras de sangre de pacientes detectó MTX en siete de diez muestras analizadas; sin embargo, los niveles de MTX

observados estuvieron entre 14.41 ng/ml y 87.17 ng/ml y, por lo tanto, por debajo del límite de cuantificación de la metodología desarrollada.

2. ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic and inflammatory and autoimmune disease; without a treatment can derived to disability and a decrease in the patient's life expectancy. Methotrexate (MTX), at doses <25mg/week, is the main drug use for the treatment of patients with RA, due to its effectiveness, adverse effects control (after co-administration with folic acid) and its low cost. Although its mechanism of action is not fully understood, its metabolites (methotrexate polyglutamates) are considered to be responsible for its anti-inflammatory and immunosuppressive action and its accumulation in erythrocytes has been observed to be different between those patients who respond to MTX and those who do not. These observations have led us to consider that the measurement of the levels of MTX and its metabolites in erythrocytes would eventually provide a method to monitor the therapeutic response. However, until today the methods developed to monitor concentrations of MTX and metabolites in erythrocytes are extremely expensive, which has compromised their application in the clinical practice. Unfortunately, it was not possible to have a standard for the polyglutaminated forms of MTX, which is why it was proposed as the objective of this project to develop and validate a bioanalytical methodology for the quantification only of MTX in erythrocytes of patients with RA. For it we to develop a system for the detection of MTX by UV-HPLC using 95:5 citrophosphate pH 6: acetonitrile, as mobile phase and, as stationary phase, a C₁₈ column with 18% carbon load and a UV detector-variable wavelength at $\lambda=302$ nm. For the extraction of MTX, a liquid-liquid extraction was proposed by the methanol-chloroform-water protein precipitation method. The validation study indicated that the quantification of MTX in erythrocyte lysate does not present endogenous interferences for MTX. Likewise, the generated method allows the identification and unequivocal differentiation of MTX and folic acid. A linear correlation was detected between the concentration and the area of MTX, which allows the use of a linear fit model in a concentration range of 25 to 225 ng/ml. Given that the acceptance criteria for accuracy are met at concentrations >50 ng/ml and for precision at concentrations >125 ng/ml; the limit of quantification was established at 125 ng/ml. Theoretically, a detection limit of 4.61 ng/ml was calculated. Regarding recovery, it was higher than 65% and stability at a concentration of 200 ng/ml was verified during storage at -20° C for 30 days. Sample analysis detected MTX in seven of ten blood samples of RA patient tested; however, the MTX levels observed (14.41 ng/ml to 87.17 ng/ml) were below the limit of quantification of the developed methodology.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Artritis Reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica donde se producen cambios tisulares en las articulaciones diartroidales con daño progresivo sobre cartílago y hueso y que a largo plazo ocasionan afectación sobre la movilidad del paciente ^{1,2}.

Se conoce que la AR es una enfermedad heterogénea con presentación clínica variable, ya que actualmente se propone la existencia de dos entidades, seropositiva y seronegativa dependiendo de la presencia o ausencia de autoanticuerpos ³. Además, de que las manifestaciones clínicas difieren de acuerdo con la etapa de desarrollo en que se encuentre. De manera temprana el paciente presenta dolor articular, sensibilidad, rigidez matutina y fatiga acompañada de niveles elevados de proteína C reactiva y un incremento en la velocidad de sedimentación glomerular. Sin un tratamiento oportuno y efectivo, el daño a nivel articular evoluciona causando erosión ósea, destrucción del cartílago, mala alineación de las articulaciones y pérdida del rango del movimiento. Así mismo comienzan a aparecer manifestaciones sistémicas, como vasculitis en arterias pequeñas o medianas, queratoconjuntivitis, aterosclerosis o nódulos. Las afectaciones intra y extraarticulares condicionan una disminución en la calidad y esperanza de vida de los paciente reumáticos ^{1,2}.

3.1.1 Epidemiología

En países occidentales, la prevalencia reportada para individuos caucásicos varía de 0.5 al 1%²; sin embargo, en México se considera que la prevalencia promedio se sitúa en 1.6% ⁴. Cabe mencionar que esta prevalencia también se ve modificada por variables como el sexo, siendo las mujeres afectadas de 2 a 3 veces más que los hombres; la edad, siendo detectada mayormente entre la cuarta y sexta década de vida; el lugar de residencia, siendo mayor en zonas urbanas que rurales, y la etnia, donde se ha reportado que los nativos americanos tienen una prevalencia del 5 al 6% ^{1,5}.

3.1.2 Desarrollo de la enfermedad

Aunque la etiología aún no está clara, la hipótesis más aceptada propone la presencia de al menos dos eventos. Por un lado, se reconoce el rol de los factores de riesgo que proporcionan una susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Estos factores se han clasificado en genéticos y ambientales. En materia genética se ha identificado la presencia de aproximadamente 100 loci que albergan variantes de susceptibilidad, siendo las principales variantes, la presencia de polimorfismos en el gen que codifica para el antígeno leucocitario humano tipo II (alelos HLA-DRB1*1 y HLA-DRB1*4) y en el gen que codifica para la proteína tirosina fosfatasa no receptor tipo 22². A nivel ambiental se han encontrado como factores predisponentes el tabaquismo, la exposición a polvos (sílice, cemento pulverizado, asbesto, fibra de vidrio), el desarrollo de infecciones bacterianas o virales y la obesidad^{1,2}.

Por otro lado, se asume que se requiere la presencia de evento desencadenante, que de alguna manera rompe con la tolerancia inmunológica y da inicio un proceso autoinmune¹. Dentro de los eventos más estudiados para modificar la tolerancia, se encuentran los procesos de modificación postraducciona de las proteínas (a través de mecanismos como citrulinación y carbamilación). Estas proteínas modificadas son detectadas por las células presentadoras de antígeno y pueden activar a linfocitos T, iniciando una respuesta inmune adaptativa que podría conducir a desencadenar cambios tisulares en la membrana sinovial. Dicha respuesta está caracterizada por 3 elementos: 1) Hiperproliferación celular, sobre todo el aumento en el número de sinoviocitos tipo fibroblastos (formación de *pannus*) y nuevos vasos sanguíneos. 2) Infiltración de células inmunes activadas y productoras de mediadores de inflamación química, como citocinas (IL-1 β , IL-6 y TNF, entre otras), quimiocinas y factores de crecimiento, generando un microambiente sinovial pro-inflamatorio. 3) Destrucción de cartílago y erosión de hueso (por activación y liberación de metaloproteinasas de matriz, colagenasas y estromelisin), así como activación de osteoclastos, todo lo cual induce cambios irreversibles en los pacientes. También se ha observado la formación de centros germinales de células plasmáticas que maduran y producen autoanticuerpos dentro mismo de la membrana sinovial (factor reumatoide, anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados y anticuerpos anti-carbamilados, entre otros). En conjunto, todos estos cambios condicionan una continua activación del sistema inmune favoreciendo un estado inflamatorio crónico¹⁻³.

3.1.3 Tratamiento

El objetivo está centrado en la disminución de la actividad inflamatoria, con miras en alcanzar una remisión clínica (ausencia de signos y síntomas de la enfermedad), que permita disminuir la progresión del daño a nivel articular y sistémico ^{1,6}. De este modo, por un lado, se han establecido estrategias no farmacológicas, que incluyen sesiones fisioterapéuticas, procedimientos quirúrgicos para reemplazar articulaciones afectadas y asesoramiento sobre estilos de vida. Por otro lado, se encuentran los tratamientos farmacológicos, que engloban tres grupos de medicamentos: antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides y fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). Los AINE son empleados como tratamiento sintomático contra el dolor e inflamación ya que no aportan ningún beneficio para reducir la progresión de la enfermedad. Por su parte, los glucocorticoides presentan efectos rápidos contra la enfermedad ya que suprimen inespecíficamente la actividad del sistema inmune, sin embargo, el uso a largo plazo desencadena efectos adversos graves. Finalmente, los FARME poseen la ventaja de ser útiles como moduladores de la inflamación y, a la vez, disminuir la progresión de la enfermedad ^{1,2}.

3.1.3.1 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad

Actualmente, estos medicamentos se han clasificado en dos tipos: 1) Sintéticos, correspondiente a moléculas pequeñas, a su vez subdivididos en convencionales, cuando su mecanismo de acción no es completamente conocido (como metotrexato, hidroxicloroquina y sulfasalazina) y dirigidos, cuando su blanco son moléculas específicas desarrolladas para inhibir vías de señalización intracelular de células activadas (como pan-JAK y los inhibidores JAK1/2) y 2) Biotecnológicos o biológicos, correspondiente a moléculas diseñadas y producidas por procedimientos biotecnológicos cuyo mecanismo de acción es claramente conocido: la inhibición específica de moléculas inflamatorias (como inhibidores de TNF- α e IL-6) ^{1,5}.

Considerando la gran cantidad de medicamentos existentes para el tratamiento del paciente con AR, MTX sigue siendo considerado como el medicamento de primera elección debido a su efectividad contra el avance de la enfermedad, el control de sus eventos adversos y su bajo costo en comparación con los FARME biológicos^{1,6}.

3.1.3.1.1 Metotrexato

Metotrexato (MTX), (Figura 1a) es un análogo del ácido fólico que fue obtenido en 1947, mediante un diseño racional, por el bioquímico Yellapragada Subbarow, para su uso en el tratamiento contra el cáncer al ser un inhibidor de enzimas dependientes de folato. Sin embargo, se observó que su empleo a bajas dosis (<25 mg/semana) resultaba eficaz en padecimientos inflamatorios como la psoriasis o la AR. En el año 1988 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de AR y desde entonces se ha consolidado como el medicamento de primera elección en este padecimiento debido a su notable efecto para impedir la progresión de la enfermedad (pérdida de cartílago y erosión de hueso), así como su bajo costo ⁷.

3.1.3.1.1 .1 Farmacodinamia

A pesar de que el MTX es el FARME mayormente recomendado en el tratamiento de la AR, su mecanismo de acción continúa siendo debatido. Actualmente la hipótesis más apoyada para explicar su efecto en el paciente con AR sugiere que este medicamento actúa sobre las células inmunes activadas favoreciendo la síntesis de adenosina. Las altas concentraciones de adenosina extracelular ocasionan la activación del receptor para adenosina de tipo A2A, el cual está sobre expresado en células inmunes de pacientes con AR, y ocasiona así la activación de cascadas de señalización intracelular que conducen a una respuesta antiinflamatoria. Dependiendo del tipo celular al que se una la adenosina diferirá el efecto, por ejemplo:

- Neutrófilos: inhibe su adhesión y reclutamiento en sitios de inflamación.
- Macrófagos: promueve la diferenciación de las células tipo M1 (proinflamatorio) hacia el tipo M2 (antiinflamatorio).
- Linfocitos T: inhibe la activación del receptor de células T, además de que su proliferación se encuentra disminuida. También se ha observado una disminución en la producción de IFN γ y TNF α .
- Fibroblastos: aumenta la producción de colágeno tipo I y II.

Otra hipótesis del mecanismo de acción del MTX sugiere su papel antagónico sobre dihidrofolato reductasa (enzima clave en síntesis de purinas) y timidilato sintetasa (enzima implicada en síntesis de pirimidinas). De esta manera, se postula que la inhibición de la síntesis de purinas y pirimidinas repercute en la proliferación celular y, por tanto, el proceso

inflamatorio articular. Sin embargo, al suplementar ácido fólico (tratamiento indicado para contrarrestar los efectos secundarios en terapia con MTX), no se ha visto reducido el efecto de MTX; lo que sugiere que la acción sobre estas enzimas parece no ser su mecanismo de acción principal ^{7,8}.

3.1.3.1.1 .2 Farmacocinética

Tras su ingesta oral (a dosis <25 mg/semana, consideradas como bajas), el MTX es absorbido, por transporte activo, en el yeyuno proximal. Las proteínas transportadoras son saturables, por lo que el aumento de dosis disminuye la velocidad y cantidad de absorción. Alcanza una concentración plasmática máxima entre 1 y 2 horas posteriores a su administración. Su biodisponibilidad tiene una variación interindividual del 60 al 90%. Se sabe que los alimentos pueden prolongar el tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima, aunque no interfieren con el grado de absorción. Así mismo, en niños, se ha observado una mayor biodisponibilidad cuando se administra en ayunas. Se une en un 50% a proteínas plasmáticas, su volumen de distribución es de 0.7 a 1.4 L/kg, por lo que alcanza el compartimiento intracelular de eritrocitos, leucocitos, hepatocitos y células sinoviales ^{9,10}.

El MTX principalmente ingresa a la célula a través de la proteína transportadora de folatos reducida 1 (RFC1); aunque también se ha reportado su ingreso a través de los receptores α y β -folato, con una contribución limitada. Una vez dentro, la enzima folilglutamato sintasa (FPGS) une de 2 a 7 residuos de ácido glutámico, formando los metabolitos conocidos como poliglutamatos de metotrexato (MTX-PG, Figura 1b); siendo éstas las especies químicas responsable de la actividad como FARME. Para que MTX pueda salir de la célula, el MTX-PG₂₋₇ debe ser convertido por la enzima γ -glutamyl hidrolasa a MTX ^{7,9} (Figura 1c).

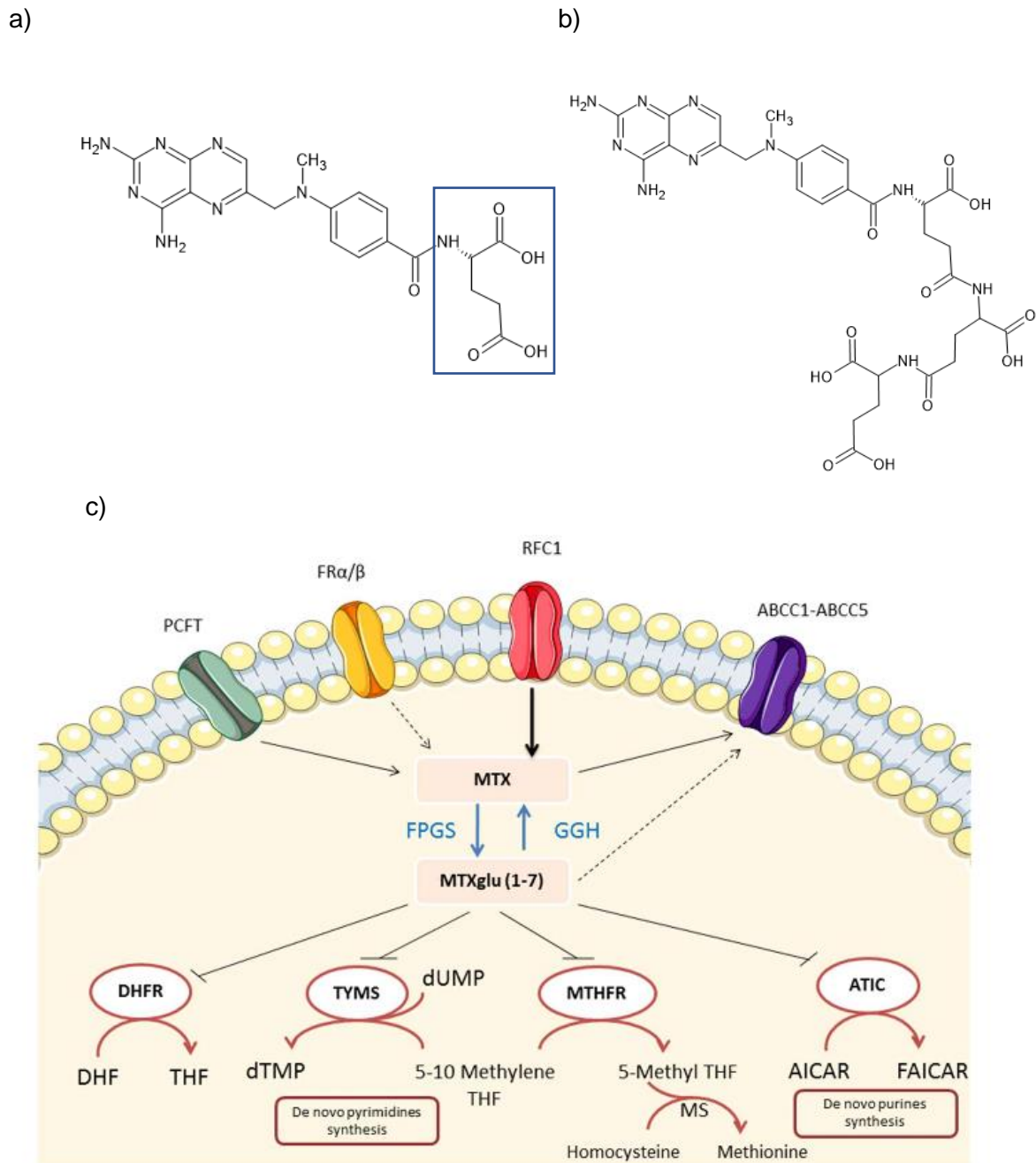


Figura 1. Estructura química y metabolismo de MTX. a) Estructura química de MTX, con residuo de ácido glutámico indicado por recuadro azul. b) Estructura química de poliglutamato de MTX con 3 residuos de ácido glutámico (MTX-PG3). c) Esquema del metabolismo de MTX.

En un estudio en población neozelandesa, se observó que el tiempo en que MTX-PG₁₋₅ alcanza el estado estacionario en eritrocitos, varía de 6 a 140 semanas conforme incrementa el número de residuos de poliglutamatos; mientras que la vida media de eliminación varía de 1 a 4 semanas. Así mismo reportan una amplia variación interindividual en la acumulación y eliminación de estas especies ¹¹.

Respecto a la concentración eritrocitaria de MTX y sus metabolitos (MTX-PG), existe gran variación en los valores reportados en estudios clínicos (Tabla 1). Dicha variación está influenciada por las diferencias en la población de estudio, los protocolos de administración de MTX y los métodos empleados para cuantificar el fármaco y sus metabolitos; lo que dificulta la comparación de resultados. Para poder establecer una conclusión respecto al rango de concentraciones observadas, se optó por unificar las unidades de concentración de los niveles de MTX y MTX-PG detectadas, transformando los datos reportados a ng/ml, de tal modo que el rango de concentraciones observadas se encontró entre los 0 y los 50 ng/ml para MTX y de 0-100 ng/ml para los metabolitos.

Tabla 1. Estudios clínicos con medición de MTX y MTX-PG.

Referencia	Objetivo	Población de estudio (País/Género/No. de participantes/Criterios de clasificación)	Protocolo de administración de MTX	Método de cuantificación de MTX	Niveles de MTX y MTX-PG detectados (media, rango)		
					Especie química	Unidades originales	Normalización a ng/ml
Huerta-García, 2021 ¹²	Farmacocinética MTX-PG ₃	México Mujeres 89 pacientes ACR	7.5-17.5 mg/semana	PM: PP AP UPLC-EM	MTX-PG ₃ :	0-60 ng/ml	0-60
Goss, 2018 ^{13*}	Farmacocinética concomitante con Adalimumab	Multicéntrico (EUA, Europa, Argentina, Puerto Rico) Mixta/395 pacientes ACR-EULAR 2010	Grupos con dosis estable de 2.5, 5, 10 y 20 mg/semana	PM: PP AP HPLC-EM	MTX-PG _{1y2}	20-40 nM	9-18
					MTX-PG ₃	0-50 nM	0-23
					MTX-PG _{4y5}	0-50 nM	0-23
Shandu, 2017 ¹⁴	Evaluar MTX-PG ₃ como predictor de efectos adversos	India Mixta 117 pacientes ACR 87	15 mg/sem (4 sem), incremento 5 mg hasta llegar a 25 mg/sem	PM: PP AP CLAR-FD	MTX-PG ₃	Media: 50 nM/L Rango: 0-100 nM/L	0-45.5
Murosaki, 2016 ^{15*}	Farmaconinética y predicción de respuesta terapéutica	Japón Mixta 42 pacientes ACR-EULAR 2010	Inicio 4-6 mg con incremento de 2 mg hasta 16 mg/semana	PM: NR CLAR-FD	MTX-PG ₁	26.2 (9.8-109.3) nM	12 (4.5-50)
					MTX-PG ₂	18.9 (6.3-49.4) nM	8.6 (2.8-22.4)
					MTX-PG ₃	24.7 (0.0-88.9) nM	5 (0-40.4)
					MTX-PG ₄	0 (0.0-27.5) nM	0(0-12.5)
					MTX-PG ₅	0 (0-11.9) nM	0 (0-5.4)
Dalrymple, 2008 ^{11*}	Farmacocinética (Comparación dosis fija vs incremento de dosis)	Nueva Zelanda Mixta 10 pacientes ACR 87	Media: 10 mg/semana Rango: 5-10 mg/semana	PM: NR CLAR-FD	MTX-PG ₁	20-80nM/8*10 ¹² GR	9-36
					MTX-PG ₂	0-60 nM/8*10 ¹² GR	0-27
					MTX-PG ₃	0-70 nM/8*10 ¹² GR	0-32
					MTX-PG ₄	0-30 nM/8*10 ¹² GR	0-13.6
					MTX-PG ₅	0-20 nM/8*10 ¹² GR	0-9

Tabla 1. Estudios clínicos con medición de MTX y MTX-PG (Continuación).							
Referencia	Objetivo	Población de estudio (País/Género/No. de participantes/Criterios de clasificación)	Protocolo de administración de MTX	Método de cuantificación de MTX	Niveles de MTX y MTX-PG detectados (media, rango)		
					Especie química	Referencia	Objetivo
Angelis-Stoforidis, 1999¹⁶	Medir MTX-PG intracelular y estudiar relación con eficacia y efectos secundarios	Australia Mixta 65 pacientes ACR	2.5-37.5 mg/semana	Análisis enzimático	MTX-PG ₁	9.76-27.69 mcg/L	9.76-27.69

ACR: Colegio Americano de Reumatología, AP: Ácido perclórico, EULAR: Alianza Europea de Reumatología, NR: No reportado, PM: Preparación de la muestra, HPLC-EM: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector por espectrometría de masas, HPLC-FD: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de fluorescencia.

*Se muestran resultados a la dosis de 10 mg MTX/semana.

*Se muestran resultados de la cohorte para evaluación de farmacocinética.

^Se muestran resultados de protocolo de incremento de dosis

3.1.3.1.1.3 Efectos adversos

Entre los efectos adversos observados durante el tratamiento con MTX se encuentran la alopecia, estomatitis y náusea. Así mismo se puede presentar leucopenia e inmunosupresión, que desaparece con la suspensión en su administración y disminuye tras la administración concomitante de ácido fólico. También se ha observado daño hepático e incremento de neumonitis. Debido a lo anterior, se recomienda el control de parámetros hematológicos, hepáticos, renales y pulmonares durante su uso ⁵.

3.1.3.1.1.4 Adherencia terapéutica

La adherencia terapéutica está definida como el grado en que el comportamiento de una persona (tomar medicamento, seguir un régimen alimentario y ejecutar cambios en el modo de vida), se corresponde con las recomendaciones acordadas de un prestador de asistencia sanitaria. Una deficiencia de este comportamiento conlleva al empeoramiento en la salud del paciente, así como a la subutilización de recursos de tratamiento¹⁷. Respecto al uso de FARME en AR se ha evaluado la adherencia terapéutica fundamentalmente a través de métodos indirectos como la entrevista clínica ^{18,19} o el uso de dispositivos electrónicos ²⁰. Entre las limitaciones de estas técnicas se ha reportado un sesgo, al ser el propio paciente quien informa sobre su apego al tratamiento, lo que podría implicar una sobreestimación de la adherencia terapéutica. En estas evaluaciones, se ha observado que las estimaciones de la adherencia varían entre diferentes estudios y en diferentes regiones del mundo, oscilando entre un 60 y 75% de adherencia ¹⁸⁻²⁰.

Por otra parte, en la evaluación de la adherencia a través de métodos directos, se han cuantificado concentraciones de MTX y 7-OH-MTX en plasma ²¹. Sin embargo, esto presenta como inconvenientes que MTX sólo está presente en plasma por 24 h, por lo que el método no permite evaluar consumos a largo plazo y que 7-OH-MTX no es un metabolito generado en tratamientos inmunosupresores (cuando MTX es administrado a bajas dosis, <25 mg/semana).

3.1.3.1.1.5 Propiedades fisicoquímicas

El MTX es un polvo cristalino inodoro de color amarillo a marrón-anaranjado. Es insoluble en agua, alcohol, cloroformo y éter; ligeramente soluble en ácido clorhídrico diluido y soluble en disoluciones de hidróxidos alcalinos y carbonatos. Su peso molecular es de

454.4 g/mol²². Se ha propuesto que la disociación de MTX en solución acuosa ocurre en tres pasos: pérdida del protón del grupo α -carboxilato (pK_{a1} 2.91), pérdida del protón del grupo γ -carboxilato (pK_{a2} 4.64) y pérdida del protón del átomo N1 del anillo de pteridina (pK_{a3} 6.57), la cual se encuentra esquematizada en la Figura 2 (los valores de pK_a reportados fueron obtenidos mediante el método de titulación potenciométrica)²³. Cabe mencionar que existe una variación entre los valores de pK_a existentes en la literatura, sobre todo para los reportados en el anillo de pteridina donde existen publicaciones que refieren valores de pK_a de 5.5²⁴ y de 8.8-9.2²². Hasta ahora, la causa de estas variaciones ha sido explicada por los procedimientos empleados para la determinación de estos valores (se ha utilizado cromatografía líquida, titulaciones potenciométricas o programas computacionales)²³, así como la temperatura en la que fueron determinadas²⁴.

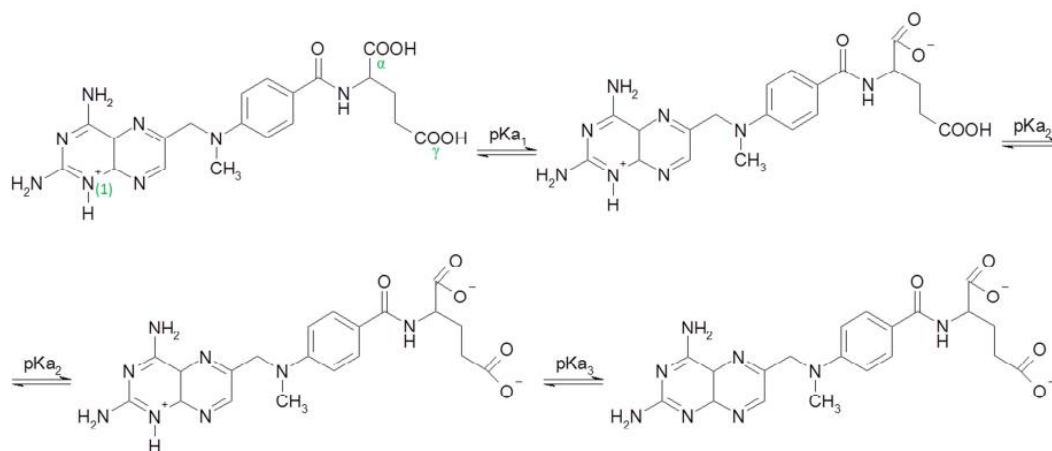


Figura 2. Esquema de disociación de metotrexato (Tomado de ²³).

Meloun y colaboradores, reportaron la absorptividad molar obtenida a diferentes longitudes de onda (260, 313, 325, 340 y 375 nm) para los diferentes estados de disociación de la molécula de MTX, los cuales se muestran en la tabla 2; sin embargo, no especifican la concentración ni temperatura a la cual realizan su análisis.

Tabla 2. Absorptividad molar (ϵ , $M^{-1} cm^{-1}$) de MTX y sus especies ionizadas

λ (nm)	260	313	325	340	375
ϵ_L	0.738	0.649	0.351	0.164	0.238
ϵ_{LH}	0.320	0.685	0.470	0.336	0.065
ϵ_{LH_2}	0.255	0.705	0.501	0.364	0.040
ϵ_{LH_3}	0.236	0.742	0.546	0.379	0.040

3.1.4 Monitoreo terapéutico en pacientes con AR

A pesar del gran número de medicamentos existentes para el tratamiento de pacientes con AR, existe una proporción de pacientes que no responden adecuadamente al tratamiento, lo que los lleva a cambiar el medicamento. Dentro de las estrategias empleadas en la toma de decisiones se ha discutido el uso de la monitorización terapéutica de fármacos, donde la mayoría de los estudios se han enfocado en los FARME biológicos, a pesar de ello tampoco se ha logrado su implementación en la práctica clínica²⁵.

En el caso de MTX durante la década pasada existió una controversia respecto a la asociación de las concentraciones de MTX y sus metabolitos poliglutaminados con la actividad de la enfermedad^{26,27}, sin embargo actualmente se acepta que son los metabolitos los responsables de la actividad farmacológica en la AR⁷. Es por ello por lo que la investigación se ha centrado en la generación de métodos bioanalíticos para la cuantificación de las concentraciones intracelulares de MTX-PG₁₋₇ en eritrocitos, caracterizar su farmacocinética y evaluar su posible utilización como un predictor de la respuesta terapéutica¹⁵ o de la presencia de efectos adversos¹⁴ (Tabla 1).

3.2 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (CLAR)

La CLAR es una técnica analítica de separación física utilizada en el análisis de productos farmacéuticos, biomoléculas, polímeros y compuestos orgánicos e iónicos. En esta técnica una muestra se separa en sus constituyentes (analitos), distribuyéndolos (mediante partición, adsorción u otras interacciones) entre la fase móvil (un solvente o mezcla de solventes líquidos que fluyen impulsado por una bomba) y una fase estacionaria sólida (adsorbentes empaquetados dentro de una columna). Una vez separados los compuestos son detectados emitiendo una señal electrónica correspondiente a la cantidad de analito presente, la cual se registra como pico en un gráfico llamado cromatograma (Figura 3)²⁸.

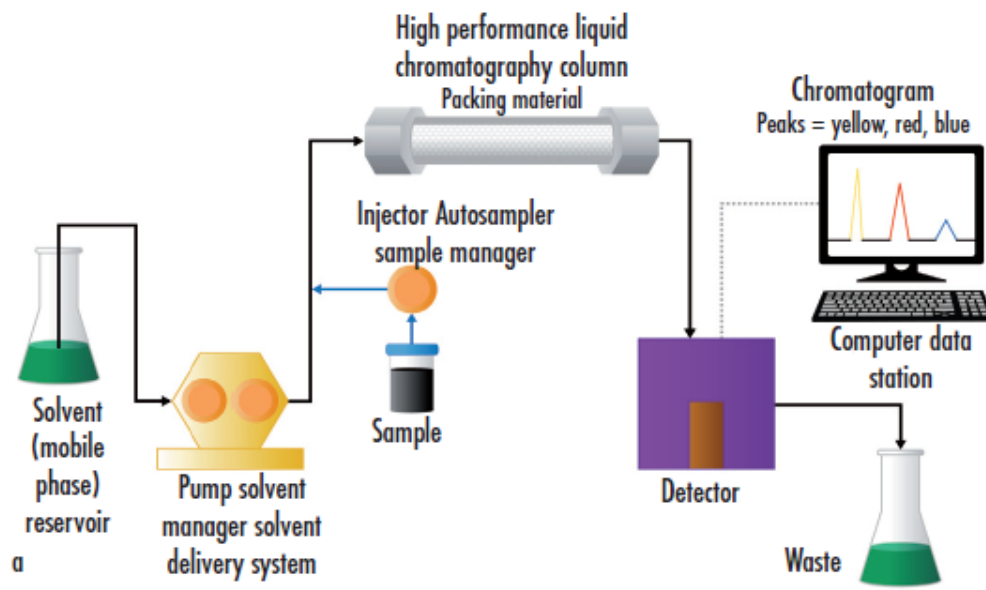


Figura 3. Esquema representativo de un cromatógrafo de líquidos (Tomado de ²⁸).

3.2.1 Componentes principales

Fase estacionaria

Representada por una columna cromatográfica, de la cual existe una gran variedad de opciones, debido a las modificaciones que cada fabricante realiza a los materiales del empaque. Las propiedades de las distintas columnas cromatográficas se ven afectadas por las diferencias en su estructura química y sus propiedades fisicoquímicas, como el tipo de medio (monolítico, poroso o no poroso), la geometría (área del lecho, diámetro y volumen de poro, tamaño de partícula y forma), propiedades químicas del lecho (tipo de ligandos

unidos y su densidad) y composición del portador de la fase estacionaria (sílice, polímeros o carbono). El material de relleno de la columna cromatográfica suele ser un portador de la fase estacionaria inmovilizada real²⁹. Otra de las características que varía entre columnas es la carga de carbono, la cual mide la cantidad de material orgánico que se ha adherido químicamente a la superficie de la sílice en la columna³⁰.

Fase móvil

La naturaleza de la fase móvil dependerá del mecanismo de separación (aunque generalmente consta de disolventes orgánicos solos o en combinación con agua o soluciones amortiguadoras en concentraciones de 10- 50 mM) y su composición afectará la resolución, selectividad y eficiencia de la separación. Otro factor a considerar es el tipo de separación: isocrática (cuando la composición de la fase móvil se mantiene constante) o en gradiente (la composición de la fase cambia a lo largo del tiempo)³¹.

Detector

Es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo la posición de cada componente de una muestra a su salida de la columna cromatográfica. De manera general, deben cumplir con las siguientes características:

- Tener amplio rango dinámico de respuesta (rango de concentraciones de una sustancia, en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal).
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar (pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna, sino a la construcción del equipo cromatográfico).
- Responder a todos los solutos analizados.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer buena relación señal/ruido.

Entre la diversidad de detectores, el ultravioleta presenta como ventajas la detección de analitos en el orden de los nanogramos, además de no ser destructivo con las muestras y ser poco sensible a los cambios de temperatura. Entre las variantes de este tipo de detector se encuentran: de onda fija (opera a una longitud de onda predeterminada, generalmente 254 nm), de onda variable (al tener una red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo) y arreglo de fotodiodos (el sistema óptico permite la lectura de absorción de todo el espectro UV en tiempo real)³².

3.2.2 Mecanismos de interacción

Existen diversas interacciones que se dan entre la columna y la muestra (Figura 4) que pueden afectar la selectividad del análisis, como son interacciones intermoleculares electrostáticas (enlace de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, ion-dipolo e ion-ion), interacciones π - π , e interacción hidrofóbica²⁹.

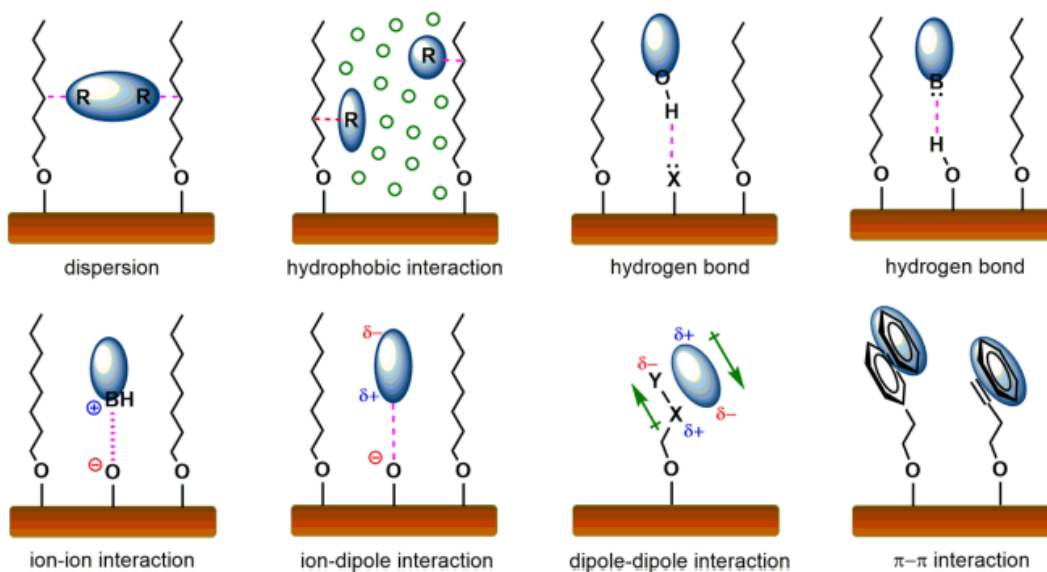


Figura 4. Interacciones moleculares entre columna y soluto en CLAR. B: grupo aceptor de enlace de hidrógeno en soluto; BH⁺: grupo de soluto protonado; X: grupo aceptor de enlace de hidrógeno en la fase estacionaria; R: grupo alquilo; figuras de color: moléculas de soluto; círculos verdes: moléculas de agua). Tomado de ²⁹.

3.2.3 Modos de separación de CLAR

Una de las características que permite la separación de una diversidad de componentes en las mezclas, es la variedad de mecanismos de separación existentes, siendo los cuatro principales: cromatografía en fase normal, cromatografía en fase reversa (FR), cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño (Dong, 2019). Dado que para el proyecto se propuso una cromatografía en FR, sólo se desarrollará un apartado dedicado a este mecanismo de separación.

Fase reversa

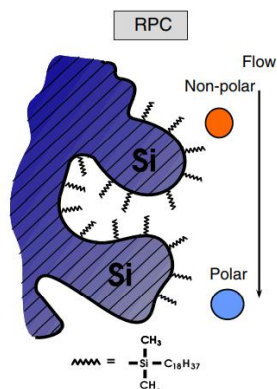


Figura 5. Esquema representativo de la separación en fase reversa.

La separación se basa en los coeficientes de distribución de un analito entre una fase estacionaria no polar (como los grupos enlazados octadecilo, C18, en un soporte de sílice) y una fase móvil polar (generalmente de metanol, acetonitrilo y sus respectivas mezclas con agua). Dadas estas propiedades, los analitos con mayor polaridad eluyen primero; mientras que los analitos no polares eluyen más tarde, al interactuar más fuertemente con los grupos hidrofóbicos C18 que forman una capa "similar a un líquido" alrededor del soporte sólido de sílice ²⁸ (Figura 5).

Aunque dentro de la columna cromatográfica pueden darse diferentes mecanismos de interacción entre la muestra y las fases, el mecanismo de separación principal en la CLAR-FR, se atribuye principalmente a la interacción hidrofóbica, que se refiere a las fuerzas cohesivas relativamente fuertes entre las propias moléculas polares del solvente y los analitos hidratados y su interacción con la fase estacionaria no polar. CLAR-FR es adecuada para el análisis de analitos polares (solubles en agua), de polaridad media y algunos no polares, así como de analitos ionizables e iónicos, incluso simultáneamente^{28,29}.

3.2.4 Análisis cuantitativo por CLAR

Existen cuatro métodos para determinar la concentración de un analito en la muestra:

- Normalización interna. Se reporta la concentración de un analito como porcentaje respecto a la suma total de las áreas de todos los picos del cromatograma.
- Estándar adicionado. Se analizan dos muestras, la real y otra preparada con un estándar de referencia a concentración conocida. Para calcular el porcentaje de muestra presente se aplica la ecuación.

- c) Estándar externo. Consiste en la preparación de estándares de referencia en concentración semejante al analito en la muestra y el análisis bajo las mismas condiciones operativas de estándares y muestras. La concentración del analito se determina por la comparación del pico en cuestión con el área correspondiente al estándar de referencia.
- d) Estándar Interno (EI). Se aplican cantidades iguales de una sustancia denominada estándar interno, tanto a la muestra de estudio como a una muestra simulada (matriz con estándar de referencia del analito de interés). La concentración del analito en la muestra se calcula con base en la relación de áreas de analito y EI entre la muestra de estudio y la muestra simulada.

Método del estándar interno

Este método requiere el uso de sustancias de referencia, por lo que su exactitud dependerá de la pureza de estos. En el caso del EI, la pureza no debe estar tan controlada, pero debe cumplir con los siguientes requisitos:

- No debe estar presente en la muestra
- Debe ser estable y químicamente inerte
- Debe resolverse completamente ($R < 1.5$)
- Responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado.

Dentro de sus ventajas se encuentran la compensación a los errores de inyección, dilución, extracción y derivatización; dado que utilizan relación de áreas para calcular la concentración de los analitos. A pesar de ello su utilización sigue siendo controversial y requiere analizarse dependiendo de las particularidades del análisis³².

3.3 Desarrollo y validación de métodos por CLAR

En el área de la industria farmacéutica, el objetivo de desarrollar un método por CLAR es cuantificar por separado el fármaco activo principal, las impurezas o intermediarios sintéticos de la reacción para su obtención, así como sus productos de degradación. Por lo que se conocen, como pasos involucrados en el desarrollo del método:

1. Comprender las propiedades fisicoquímicas de la molécula de fármaco, tales como polaridad, solubilidad, pH, pKa, LogP, PM. Esto permite seleccionar los diluyentes del analito, así como decidir el solvente y la composición de la fase móvil, con la intención de modular las interacciones entre el analito y las fases.
2. Configurar las condiciones de CLAR. Como son la selección de características de la fase móvil (empleo de solución amortiguadora y su concentración, separación isocrática o en gradiente), de la columna (matriz de soporte, tamaño de partícula), el detector.
3. Preparar la solución de muestra para el método desarrollo. El principio activo analizado debe estar en solución, la cual debe ser estable. Así mismo se evalúa la filtración empleando filtros de jeringa con tamaños de poro entre 0,22 o 0,45 μm .
4. Optimizar el método analítico. Se analizan las condiciones experimentales adecuadas para obtener separaciones y sensibilidad deseadas. Esto se logra mediante un examen planificado/sistémico de parámetros que incluyen el pH, los componentes y la relación de la fase móvil, el gradiente, el caudal, la temperatura, las cantidades de muestra, el volumen de inyección y el tipo de solvente de los diluyentes.
5. Validar el método. De acuerdo con las guías de validación previamente establecidas³¹.

Sin embargo, el desarrollo de métodos bioanalíticos presenta algunas diferencias. Para comenzar los métodos bioanalíticos son ensayos que permiten identificar y cuantificar fármacos, metabolitos, proteínas terapéuticas y biomarcadores en matrices biológicas como sangre, suero, plasma, saliva, orina, cabello y tejidos como la piel. A diferencia de los métodos analíticos, en los métodos bioanalíticos, también se busca evaluar la influencia de los pasos de recolección, manipulación, envío, almacenamiento y preparación de la muestra ^{33,34}. Es por ello, por lo que el problema principal en el desarrollo de métodos bioanalíticos es la matriz altamente compleja en la que residen los analitos; siendo de suma

importancia considerar el proceso de preparación de la muestra, que implica la extracción del analito de la matriz biológica³⁵.

Así mismo, en 2016, Hendricks opinó que “El desarrollo de un método bioanalítico a menudo se basa en métodos no estructurales de prueba y error. La calidad y el rendimiento de dicho método dependen en gran medida de las habilidades teóricas, las experiencias y las preferencias del desarrollador, mientras que no hay duda de que un enfoque estructural conduce a una forma más eficiente y rastreada de desarrollo de métodos”. En un intento por secuenciar el procedimiento para optimizar el desarrollo de métodos bioanalíticos propone “comenzar con el ajuste de la configuración del detector, seguido del desarrollo de un sistema cromatográfico que sea capaz de separar los analitos en un tiempo de ejecución lo más breve posible. Los primeros intentos de preparación de muestras pueden conducir a extractos que contienen muchas interferencias. El ajuste secuencial de la cromatografía y el método de preparación de la muestra finalmente conducen a un método satisfactorio (Figura 6)³⁵.



Figura 6. Representación esquemática del proceso de desarrollo de un método analítico.

En adición, Hooshfar y Barlett (2016) mencionan que la naturaleza compleja de las matrices biológicas genera peligros biológicos, químicos y físicos potenciales que pueden influir en la calidad de los datos producidos por estos métodos; por lo que recomiendan realizar un análisis que permita la identificación de peligros potenciales, como un paso en el desarrollo del método. Dicho análisis debe considerar:

1. Fuentes de error humano. Para generar datos confiables es indispensable la capacitación y entrenamiento en manejo de equipo y software, conocimiento en mantenimiento y solución de problemas, así como uso de procedimientos operativos estandarizados.
2. Error instrumental. Es importante el uso de instrumentos y equipos calificados, así como de evaluar la idoneidad del sistema.
3. Contaminación. Definida como picos adicionales que aparecen en blancos, estándares de calibración, controles de calidad y muestras reales. La contaminación puede ocurrir en diferentes pasos del procesamiento de muestras: dosificación, recolección, almacenamiento y preparación de la fase móvil, tales como: dilución, elución, evaporación, mezcla de solventes orgánicos y transferencia de sobrenadante. Las salpicaduras, la mezcla, los derrames, los aerosoles y los goteos durante los pasos de transferencia de líquidos han sido reportados como las principales fuentes de contaminación.
4. Resultados inesperados durante la validación del método debido a acarreamiento, pérdida de rendimiento de la columna, inestabilidad durante la preparación de la muestra, variabilidad del recobro del estándar interno.
5. Fallos durante análisis de muestras clínicas y preclínicas debido a inestabilidad fisicoquímica del analito y sus metabolitos durante la recolección y el almacenamiento, falta de homogeneidad de la muestra, variabilidad en las matrices biológicas y falta de optimización y reproducibilidad en el método validado.

El objetivo de desarrollar un método bioanalítico es definir el diseño, condiciones operativas, limitaciones y conveniencia del método para su propósito previsto; es por ello por lo que en esta etapa se busca optimizar procedimientos y condiciones involucradas con la extracción y detección del analito. Mientras que, en la etapa de validación, se busca demostrar que el método optimizado es adecuado para el análisis de las muestras de estudio ³³.

Los principales campos de aplicación de los métodos bioanalíticos se dan en la industria farmacéutica, al desarrollar nuevos fármacos o en estudios comparativos de biodisponibilidad/bioequivalencia, y en los hospitales, con la finalidad de optimizar los tratamientos farmacológicos³⁴. El campo de la industria farmacéutica ha tenido un mayor desarrollo, impulsado principalmente por la FDA, siendo esta agencia la primera en emitir una guía para la validación bioanalítica en 2001³⁶. En la actualidad únicamente organizaciones de cuatro países han publicado recomendaciones en materia de validación de métodos bioanalíticos: la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA), en Brasil durante el año 2003, con enmiendas en 2012³⁷; la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), con propuestas desde el 2008 y publicación de una guía oficial en 2011³⁸; el Ministerio de Salud y Bienestar Laboral de Japón, en 2013³⁹ y la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), con su versión actualizada en el año 2018^{33,40}. Así mismo se conoce que la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) trabajó en un borrador que fue distribuido a las autoridades reguladoras de las regiones ICH para su consulta con fecha límite para el envío de comentarios al 1 de septiembre de 2019⁴¹.

Cabe mencionar que en el ámbito nacional no se cuenta con ninguna guía de validación de métodos bioanalíticos, siendo la *NOM-177-SSA1-2013, "Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad"*, el documento regulatorio más cercano con el que se cuenta para la validación de métodos analíticos que serán empleados en el análisis de muestras biológicas. En lo que respecta a la validación de métodos bioanalíticos en el campo hospitalario, no se han encontrado documentos que regulen esta actividad⁴².

Por otra parte, Hopfgartner³⁴ refiere que los métodos bioanalíticos desarrollados en los laboratorios de investigación académica, pueden variar respecto a los propuestos para análisis a nivel industrial; y también menciona casos donde a pesar de contar con un método bioanalítico completamente validado, su aplicación en muestras reales puede fallar. Como ejemplo de ello se menciona el estudio de Matuszewski y colaboradores, quienes, en 1998, desarrollaron una metodología para la cuantificación en orina de una nueva molécula antagonista del receptor de oxitocina. En su estudio de validación analizaron blancos de

orina de 300 individuos sin detectar interferencias para el estándar interno; sin embargo cuando analizaron las muestras de personas que habían tenido la administración de una dosis de medicamento observaron la interferencia de siete metabolitos en el tiempo de retención del estándar interno⁴³.

Aunque en la actualidad se trabaja para lograr un mayor consenso entre los parámetros de desempeño con la finalidad de obtener resultados más confiables, aún se requiere una mayor uniformidad en la validación de métodos bioanalíticos tanto en la industria como en el ámbito clínico.

4. ANTECEDENTES

4.1 Métodos de cuantificación de MTX

Aunque se espera que los MTX-PG₂₋₇ ejerzan sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores sobre leucocitos y sinoviocitos tipo fibroblastos, se considera que la determinación de los niveles del fármaco en eritrocitos representa la alternativa más adecuada para el monitoreo terapéutico^{27,44}. Esto se debe, por un lado, a la abundancia y facilidad para obtener una muestra de eritrocitos^{16,45}. Por otro lado, a pesar de que se ha demostrado la acumulación intracelular de MTX-PG₂₋₇ en eritrocitos, células polimorfonucleares (PMN) y células mononucleares (CMN); sólo se han detectado diferencias significativas en la concentración intracelular de estos metabolitos para eritrocitos y células PMN entre pacientes con AR que responden a la terapia con MTX y aquellos que no lo hacen, siendo la concentración detectada en eritrocitos la que presenta valores más elevados.

En ese sentido se han desarrollado diversas metodologías para la cuantificación de MTX en eritrocitos de pacientes con enfermedades inflamatorias, las cuales se muestran en la Tabla 3. Como se aprecia en ella, existe una variación en los analitos medidos, el pretratamiento de la muestra, las condiciones cromatográficas y los parámetros empleados para demostrar que el método desarrollado es adecuado para el análisis de muestras biológicas. Es por ello, que a continuación se destina un apartado para describir brevemente los principales hallazgos.

4.1.1 Pretratamiento de la muestra

Como se aprecia en la Tabla 3 para la obtención de los eritrocitos a partir de la muestra de sangre venosa se emplea un tubo con anticoagulante (EDTA o heparina) y mediante un proceso de centrifugado se separa el plasma. Posteriormente, se recurre a un lavado (con solución salina fisiológica o diversas soluciones amortiguadoras) y el paquete celular es almacenado en congelación a -70° y -80°C. Cuando se emplea sangre total, el pretratamiento consiste en un proceso de conversión de MTX-PG a MTX por adición de γ -glutamil hidrolasa y, en realidad, se cuantifica MTX como indicador de la cantidad de MTX-PG total.

Tabla 3. Metodologías para la cuantificación de MTX y MTX-PG en sangre.

Ref.	Enf.	Analitos	Muestra: Pretratamiento	Método de separación	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector	Recobro (%)	Guía de validación
46	AJI	MTX	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, lavado con SSF, almacenamiento (-80°C), hemólisis al descongelar, ELL (AP al 70%).	CLAR (FR)	XBridge BEH C18 (4.6× 100 mm, 2.5 µm) a 35 °C	Gradiente A: Acetato de amonio 10 nM, ajustado a pH 10 con NH ₄ OH B: Metanol	Espectrómetro de masas (ESI)	106	FDA, 2018
		MTX-PG ₂						99	
		MTX-PG ₃						99	
		MTX-PG ₄						101	
		MTX-PG ₅						84	
		MTX-PG ₆						101	
		MTX-PG ₇						98	
47	AR	MTX-PG ₃	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, almacenamiento (-80°C), hemólisis con agua, ELL (AP al 70%).	CLAR (FR)	Accucore Pentafluorofenil propilo (2.1 × 50 mm, 2.6 µm)	Isocrática Ácido fórmico (0.1%), TEA (0.01%) y ACN.	Espectrómetro de masas (ESI)	>80%	NR
13	AR	MTX PG ₁₋₇	Eritrocitos: Extracción, separación de plasma, lavado con SSF, hemólisis acuosa+ ELL (AP al 70%).	CLAR (FR)	Atlantis dc18 (1x50 mm, 3 µm)	Gradiente A: 10 mM NH ₄ HCO ₃ 5 mM DMHA en agua (pH 7.4 Ácido fórmico) B: 5 mM de DMHA + Ácido fórmico al 0.1% en ACN	Espectrómetro de masas (ESI)	NR	FDA, 2001
14	AR	MTX	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, lavado con PBS, almacenamiento (-80°C), hemólisis con agua, ELL (AP frío).	CLAR (FR)	Thermo C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)	Gradiente A: Acetato de amonio 10 mM + 2 % H ₂ O ₂ (30% en agua) B: ACN	Fluorimetría (Excitación: 274 nm y Emisión: 470 nm)	50	NR
		MTX-PG ₂						85	
		MTX-PG ₃						80	
		MTX-PG ₄						80	
		MTX-PG ₅						68	

Tabla 3. Metodologías para la cuantificación de MTX-PG en sangre (Continuación).

Ref.	Enf.	Analitos	Muestra: Pretratamiento	Método de separación	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector	Recobro (%)	Guía de validación
48	AR	MTX-PG ₁₋₅	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, almacenamiento (-80°C), ELL (AP al 16% en frío por 30 min)	UPLC (FR)	Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1x 100 mm, 1.7 µm) a 35 °C	Gradiente: A: NH ₄ HCO ₃ (10 mM, pH 10 NaOH 25%) B: Metanol	Espectrómetro de masas (ESI)	98-100	FDA, 2001
49	AR	MTX y MTX-PG	Sangre total: Conversión de MTX-PG a MTX (Ácido ascórbico a 37°C por 3 h + GGH), PP (TCA) y ELL (AAE).	CLAR (FR)	XB-C18 (2.1x 100 mm, 3 µm)	Isocrática: 30: 70 ACN (1% Ácido fórmico): 20 mM solución formato de amonio	Espectrómetro de masas (ESI)	29.3-37.8	FDA
50	AR	MTX-PG ₂₋₅	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, lavado con sol. Hank, hemólisis con agua, PP por cambio de temperatura.	CLAR (FR)	LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm)	Gradiente A: Acetato de amonio 10 mM (pH 6.5) + 2 % H ₂ O ₂ (30% en agua) y B: ACN	Fotooxidación post columna (UV)-Fluorimetría (Excitación:274nm y Emisión: 470nm)	NR	NR
51	AJI	MTX	Eritrocitos: Eliminación de plasma, 2 lavados con SSF, almacenamiento (-70°C), PP por cambio de temperatura	UPLC (FR)	Waters Acquity UPLC BEH C18 (2.1x 100 mm, 1.7 µm)	Gradiente A: NH ₄ HCO ₃ 10 mM+5 mM DMHpA (pH 7.5 Ác. carbónico) y B: ACN + DMHpA 5 mM	Espectrómetro de masas (ESI)	51.1	NR
		MTX-PG ₂						62.7	
		MTX-PG ₃						70.2	
		MTX-PG ₄						68.4	
		MTX-PG ₅						70.1	
		MTX-PG ₆						70.1	
MTX-PG ₇	69.8								
52	AJI	MTX	Eritrocitos: Lavado, almacenamiento (-70°C), hemólisis con agua, PP (AP al 70%) + EFS (Oasis HLB).	CLAR (FR)	Phenomenex Sinergy Hydro-RP LC (50x1 mm, 4 µm)	Gradiente: A: NH ₄ HCO ₃ 10 mM + 5 mM DMHA (pH 7.5 Ác. fórmico) B: ACN + DMHA 5 mM	Espectrómetro de masas (ESI)	31.2	NR

Tabla 3. Metodologías para la cuantificación de MTX-PG en sangre (Continuación).

Ref.	Enf.	Analitos	Muestra: Pretratamiento	Método de separación	Fase estacionaria	Fase móvil	Detector	Recobro (%)	Guía de validación
53	AJI	MTX-PG totales	Eritrocitos: Extracción (heparina), separación de plasma, lavados con PBS, almacenamiento (-80°C). Conversión a MTX (GGH+ME) + PP (TCA al 40% y AA).	CLAR (FR)	Gemini C18 110A (150x4.6 mm, 5 µm) 30°C	Isocrática: Acetato de amonio 50 mM pH 5.5: ACN: H ₂ O ₂ (890:110:0.25)	Fluorometría (Excitación: 375 nm y Emisión 463nm)	70.3-72.8	FDA, 2001
54	EII	MTX-PG ₁₋₅	Eritrocitos: Extracción (EDTA), lavado con SSF, hemólisis con agua, ELL (AP 70%).	CLAR (FR)	Columna Luna C18 (250x4.6 mm, 5 µm)	Gradiente A: Fosfato de sodio 0.01 M pH 6.5+ ACN (5%) + 0.2 % H ₂ O ₂ B: ACN	Fluorometría (Excitación:274nm y Emisión: 470nm)	NR	FDA, 2001
55	AR	MTX	Sangre total: Sin pretratamiento+ PP (metanol), ELL (diclorometano)	CLAR (FR)	Zorbax Stable Bond SB-C18 (150x4.6 mm, 5 µm) 40°C	Isocrática: ACN: Acetato de amonio 50 mM (7:93)	Fluorometría (Excitación:367 nm y Emisión 463 nm)	94.3	NR
		MTX-PG totales	Sangre total: Conversión a MTX (Ácido ascórbico a 37°C por 2 h + GGH+ NaOH), PP (metanol), ELL (diclorometano)					89.3	
56	AR	MTX	Eritrocitos: Extracción (EDTA), separación de plasma, 2 lavados con SSF, almacenamiento a -70°C+ Hemólisis con agua, PP (AP al 70%)	CLAR (FR)	Columna Terra MS C18 (25 cm X4.6 mm, 5 µm)	Gradiente A: Acetato de amonio 10 mM/L (pH 6.5) + 2 ml H ₂ O ₂ y B: ACN	Fluorometría (Excitación: 274nm y Emisión: 470nm)	66	NR
		MTX-PG ₂						66	
		MTX-PG ₃						65	
		MTX-PG ₄						66	
		MTX-PG ₅						79	
		MTX-PG ₆						80	
		MTX-PG ₇						60	

AA: Ácido acético AR: Artritis Reumatoide, AJI: Artritis juvenil idiopática, AAE: Acetoacetato de etilo, AP: Ácido Perclórico, CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución, DMHA: Dimetil hexilamina, DMHpA: Dimetil Heptilamina, EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, EFS: extracción en fase sólida, EII: Enfermedades Inflamatorias Intestinales, ELL: Extracción líquido-líquido, ESI: Ionización por electrospray, FR: Fase reversa, GGH: γ-glutamil hidrolasa, mM: milimolar, ME: Mercaptoetanol, NR: No reportado, TEA: trietanolamina, TCA: Ácido tricloroacético, SSF: Solución salina fisiológica. PP: precipitación de proteínas. NH₄OH: Hidróxido de amonio, NH₄HCO₃: bicarbonato de amonio.

4.1.2 Métodos de extracción de MTX

Con respecto al método de extracción, un paso determinante es la precipitación de proteínas, ya sea sola o en combinación con extracción líquido-líquido y con extracción en fase sólida. Para la precipitación de proteínas se emplean ácidos fuertes (perclórico o tricloroacético), solventes orgánicos (metanol) o un cambio brusco de temperatura, seguido de una rápida centrifugación para separar el sobrenadante (que contiene el analito de interés) del pellet de proteínas. Se sabe que el emplear la precipitación de proteínas es una técnica es rápida, sencilla y barata para reducir las interferencias de matriz; sin embargo, presenta como inconvenientes la extracción conjunta de componentes lipídicos que pueden acumularse en la columna aumentando la presión y disminuyendo la eficacia de separación. Como solución a ello se ha propuesto el uso de una precolumna o la realización de una limpieza adicional de la muestra mediante una extracción líquido-líquido o una extracción en fase sólida ^{57,58}.

En la extracción líquido-líquido se emplea el sobrenadante obtenido de la precipitación de proteínas, al que se le adiciona un solvente orgánico que disuelve los lípidos, por lo que la parte acuosa es la que se recupera para su análisis cromatográfico ⁵⁷⁻⁵⁹.

La extracción en fase sólida es empleada en un estudio realizado por van Haandel en 2009, donde utilizan un cartucho Oasis HLB. Aquí la obtención de los MTX-PG se da a través de un proceso de 5 pasos (activación del cartucho con metanol, adición de ácido fórmico para acidificar pH, carga de la muestra, lavado del cartucho con solución amortiguadora y elución de analitos con metanol/NH₄OH), más la evaporación de los solventes con nitrógeno y baño de agua a 40°C y la re-suspensión en fase móvil. van Haandel, además, reportó la utilidad de la extracción en fase sólida respecto a las metodologías de extracción anteriores, que empleaban precipitación de proteínas con ácido perclórico, debido a que estas últimas daban como resultado muestras diluidas con alta fuerza iónica, las cuales eran incompatibles con la detección por espectrometría de masas ⁵². Sin embargo, a pesar de ser una técnica que permite la concentración de los analitos incrementando selectividad y sensibilidad, se considera que es un proceso costoso.

4.1.3 Condiciones cromatográficas

Como se observa en la Tabla 3, el método empleado para separar MTX de sus metabolitos poliglutaminados ha sido la Cromatografía Líquida en Alta Resolución (CLAR) mediante fase reversa (FR). Es por ello por lo que se puede apreciar como la mayoría de los estudios emplean una columna C₁₈, como fase estacionaria; y como fase móvil hacen uso de una variedad de soluciones amortiguadoras con solventes orgánicos (metanol o acetonitrilo), en diferentes proporciones y bajo gradiente o de manera isocrática.

Respecto al sistema de detección, fundamentalmente se utiliza espectrometría de masas (EM) o fluorescencia debido a su alta sensibilidad. Sin embargo, el costo y la disponibilidad de ambos detectores compromete su aplicación en el ámbito clínico, por lo que sería de gran utilidad desarrollar métodos analíticos más accesibles, tales como CLAR acoplada a detector ultravioleta (UV).

En ese sentido Jolivet y Schilsky, en 1981, reportaron un método de separación e identificación de para la detección de MTX-PG₁₋₅ en muestras de cultivo celular, empleando la línea celular MCF-7. Sin embargo, en esta metodología la cuantificación de MTX-PG₁₋₅ es realizada por espectrometría de centelleo líquido⁶⁰. Debido a que la técnica CLAR-UV sólo se emplea de manera cualitativa, no es posible profundizar en más detalles de interés como sería la sensibilidad de la metodología desarrollada por Jolivet y Schilsky, en 1981, para la cuantificación de MTX-PG₁₋₅. En un artículo de revisión Rubino FM, en 2001, reportó un límite de detección para MTX-PG₁, en muestras biológicas, entre 20-200 nM, dependiendo del grado de enriquecimiento logrado durante la preparación de la muestra⁵⁷. Así mismo Giulio y colaboradores, en 2022, reportaron un método para cuantificación de MTX proveniente de experimentos de permeación *in vitro* en capas de piel con un límite de cuantificación de 50 ng/ml empleando una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 como solución de extracción⁶¹.

4.1.4 Validación de métodos bioanalíticos

De las cinco publicaciones que reportan resultados de validación del método bioanalítico, dos emplean CLAR con detección por Fluorometría (CLAR-F)^{53,54} y tres de ellos CLAR con detección por espectrometría de masas-ESI (CLAR-EM)^{46,48,49}. Como hallazgos más relevantes se reportan:

Selectividad. En las metodologías que emplean CLAR-F, se ha reportado la presencia de señales en los blancos de eritrocitos de donadores aparentemente sanos, las cuales no

interfieren con los tiempos de retención de los analitos (MTX-PG). Mientras tanto en las metodologías que hacen uso de CLAR-EM no reportan señales endógenas o bien la señal detectada cumple con los criterios de aceptación establecidos por la guía de validación ⁴⁶.

Curva de calibración y sensibilidad. Las metodologías CLAR-F reportan linealidad de 5-400 nM, con límite de cuantificación de 5 nM; mientras que las metodologías CLAR-EM han evaluado la linealidad en un rango de 1-1000 nM, con límite de cuantificación de 1 nM⁴⁸. Para la detección UV existe un artículo donde se ha reportado un límite de cuantificación de 50 ng/ml.

Exactitud y precisión. Respecto a la exactitud, las metodologías CLAR-F reportan una variación del 3.5 al 18.8%; mientras que para la precisión la variación va de 5.3 a 18.3%. Por su parte, la exactitud de las metodologías CLAR-EM va del 1 al 8.5% y la precisión del 0.8 al 15%;

Recobro. Las metodologías CLAR-F han hecho uso de la extracción líquido-líquido obteniendo porcentajes de recobro el 70%⁵³; mientras que las metodologías CLAR-EM que han empleado ELL reportan porcentajes de recobro que van del 30%⁴⁹ al 100%⁴⁸. Un fenómeno interesante ha sido reportado por Wu y colaboradores, quienes observaron que en su metodología el recobro incrementaba conforme aumentaba la concentración. De la misma forma detectaron que el uso del estándar interno incrementaba los porcentajes de recobro de un 42% a un 82%⁴⁶.

Estabilidad. Las metodologías CLAR-F reportaron estabilidad para MTX-PG₃ durante 24h a 25°C⁵³ y para MTX-PG₁₋₅ a 4°C por 3 días y a -80°C por seis meses⁵⁴; mientras que los estudios que emplearon CLAR-EM reportaron estabilidad para MTX-PG₁₋₇ a -80°C por tres meses^{46,48,49}, a temperatura ambiente por 5h y a 15°C por 26h⁴⁶.

5. JUSTIFICACIÓN

La AR es una enfermedad crónica degenerativa que, en caso de no recibir un tratamiento temprano, puede progresar a la destrucción de cartílago y hueso afectando gravemente la movilidad. Así mismo, esta rápida progresión del daño se ve acompañada, entre otros síntomas, de dolor y fatiga, lo que en conjunto contribuye a la disminución de la calidad y esperanza de vida del paciente. Dado que esta enfermedad produce discapacidad funcional y que afecta al grupo etario con capacidad laboral y productiva, genera impacto en la economía nacional.

El MTX es el medicamento de primera elección para el tratamiento de la AR debido a su notable efecto para impedir la progresión de la enfermedad, su seguridad (al disminuirse los efectos adversos tras la coadministración de ácido fólico) y a su bajo costo. Aunque el mecanismo de acción de MTX no es del todo comprendido, se cree que sus metabolitos (MTX-PG₂₋₇) son los responsables de su acción antiinflamatoria e inmunosupresora y se ha observado que su acumulación en eritrocitos es diferente entre aquellos pacientes que responden a MTX y los que no lo hacen. Estas observaciones han llevado a considerar que la medición de los niveles de MTX y MTX-PG₂₋₇ en eritrocitos de pacientes con artritis reumatoide permitiría, eventualmente, proporcionar un método para monitorear la respuesta terapéutica a MTX y proponer estrategias para su incremento. Sin embargo, los métodos actualmente desarrollados para la medición intracelular de MTX y sus metabolitos son costosos, lo que compromete su empleo, de manera rutinaria, en un entorno clínico. Así mismo, se considera que el alto costo está relacionado con el uso de cromatografía líquida acoplada a detección mediante fluorescencia o espectrometría de masas.

Por otro lado, aunque se intentó contar con muestras enriquecidas de formas poliglutaminadas del MTX (por cultivo celular) o por síntesis química, al final no se pudo obtener ese tipo de moléculas por lo cual no fue posible estandarizar el procedimiento bioanalítico para su evaluación ni su consecuente validación. Por todo eso, en la versión final del proyecto, se propone el desarrollo y validación de una metodología analítica, basada en CLAR-UV, para determinar los niveles circulantes de MTX en sangre de pacientes con AR, como una herramienta de gran utilidad para los estudios clínicos y básicos que el laboratorio de Citocinas y Autoinmunidad de la Facultad de Farmacia desarrolla en colaboración con la Clínica de Artritis Reumatoide del Hospital General de Cuernavaca "José G. Parres".

6. OBJETIVOS

General.

Diseñar y validar una metodología bioanalítica para la detección y cuantificación de MTX en muestras de eritrocitos de pacientes con AR del estado de Morelos.

Específicos.

1. Desarrollar una metodología analítica, empleando CLAR-UV (Fase Reversa) para la detección de MTX.
2. Desarrollar una metodología para la extracción de MTX de eritrocitos.
3. Validar un método de cuantificación por CLAR-UV de MTX en eritrocitos.
4. Confirmar si el método desarrollado permite la detección y cuantificación de MTX en muestras de eritrocitos de pacientes con AR.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Reactivos.

Se empleó metotrexato (MTX) obtenido de Merck (estándar de referencia USP, pureza \geq 99.7%, lote R020L0), ácido fólico (AF) de Sigma (pureza \geq 97%, lote WXBD4723V), 4-nitrobenzofenona (99%, Thermo Scientific), materia prima de metotrexato y teofilina (obtenido como se indica en ANEXO 1), acetonitrilo grado HPLC (para el desarrollo y optimización del método bioanalítico: marca Fermont, pureza 99.9%, lote 883362; validación y análisis de muestras: marca J.T. Baker, pureza 99.9%, lote C05W61), metanol grado HPLC (marca J.T. Baker, pureza 99.9%, lotes X40C60 y C25W32), cloroformo (marca Meyer[®], pureza \geq 99.8%), agua desionizada, ácido cítrico de MP Biomedicals (grado electroforesis, lote R19275) y fosfato de sodio dibásico heptahidratado de J. T. Baker (pureza 99.3%, Lote V47C01).

7.2 Instrumentos.

El análisis fue desarrollado en un cromatógrafo HITACHI Elite La Chrome modelo L-2000 con detector ultravioleta. Se empleó una balanza analítica Wiggan Hauser[®], un potenciómetro Hanna Instrument[®] HI 2210, un limpiador ultrasónico Cole Palmer[®] y una microcentrífuga Eppendorf 5415[®] R.

7.3 Selección de estándar interno

Como consecuencia de la emergencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV-2, la adquisición de estándares comerciales se vio afectada; de tal modo que se optó por evaluar sustancias que se disponían en los laboratorios 4 y 13 de la Facultad de Farmacia, cuya estructura tuviera grupos amino. Derivado de lo anterior se empleó 4-nitrobenzofenona como estándar interno (EI), durante la etapa de evaluación del proceso de extracción de MTX de eritrocitos. Posteriormente, durante el proceso de validación se encontró una interferencia al evaluar el lisado de eritrocitos, por lo cual la 4-nitrobenzofenona fue sustituida por teofilina.

7.4 Soluciones stock y de trabajo

Desarrollo y optimización: La solución stock de MTX se preparó a partir de una sustancia de referencia (SRef) de MTX a una concentración de 100 µg/ml. En la evaluación del detector las diluciones seriadas fueron preparadas en citrofosfato pH 6 0.037 M.

Evaluación de extracción de lisado de eritrocitos. Selección de EI: 4-hidroxi-3-metoxi acetofenona se preparó a una concentración de 210 µg/ml; mientras 4-nitrobenzofenona se preparó a 230 µg/ml. Ambos compuestos fueron disueltos en metanol.

Validación: La solución stock de MTX fue preparada en una mezcla 50:50 metanol: DMSO a una concentración de 200 µg/ml, las soluciones stock de teofilina y ácido fólico se prepararon en metanol a una concentración 1000 µg/ml. Estas soluciones fueron almacenadas a -20° C. Adicionalmente se prepararon las siguientes soluciones de trabajo: MTX en 0.037 M de citrofosfato, pH 6.0 a 5 µg/ml y AF en 0.037 M de citrofosfato, pH 6.0 a 10 µg/ml.

7.5 Desarrollo de método bioanalítico y optimización de las condiciones cromatográficas para la detección de MTX

Con base en los antecedentes, se estableció una separación mediante CLAR en fase reversa. Respecto a la fase móvil se compararon dos opciones: a) agua:acetonitrilo y b) solución amortiguadora de citrofosfato, pH 6:acetonitrilo a diferentes proporciones. Con la fase móvil a) agua:acetonitrilo se probaron las proporciones 50:50, 70:30 y 90:10; mientras que con b) citrofosfato:acetonitrilo se evaluaron las proporciones 80:20, 90:10 y 95:5. Respecto a la fase estacionaria se evaluó el uso de dos columnas con características iguales en dimensiones (4.6 x 150 mm), tamaño de partícula (3.5 µm) y componentes de la fase estacionaria (sílica con ligandos de 18 carbonos); pero con diferente proporción en la carga de carbono. La columna uno, de marca Interstsil ODS® reporta un 15% de carbono; mientras que la columna dos, de marca XBridge®, posee 18% de carbono. Para el detector se evaluó la detección del MTX en el cromatógrafo de líquidos Waters 2996 con detector ultravioleta-arreglo de fotodiodos y en un cromatógrafo de líquidos HITACHI Elite La Chrome con detector ultravioleta-longitud de onda variable mediante diluciones seriadas partiendo de una concentración de 10,000 ng/ml de MTX.

7.6 Obtención de matriz biológica de MTX en eritrocitos

Para la obtención de eritrocitos, se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa de seis voluntarios aparentemente sanos, empleando vacutainer con EDTA como anticoagulante. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm durante 7 min y se separó el sobrenadante (plasma). El paquete eritrocitario se lavó con PBS a proporción 1:1, se centrifugó a 750 rpm durante 4 min y se retiró el sobrenadante (este paso se repitió dos veces, de manera tal que se realizaron 3 lavados). La cantidad de eritrocitos fue cuantificada en la cámara de Neubauer, se realizaron alícuotas de 1.5 ml en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Dado que el número de eritrocitos puede variar entre pacientes, para la obtención del lisado de eritrocitos se tomó un volumen equivalente a 5,000,000 de eritrocitos/ml y se realizó una dilución 1:3 en agua desionizada.

Los calibradores fueron preparados con el lisado de eritrocitos, la adición de 10 µl de stock de teofilina y solución de trabajo de MTX para obtener concentraciones de 25, 75, 100, 150, 175, 225 ng/ml. Los controles de calidad se prepararon en condiciones semejantes a concentraciones de MTX de 25 ng/ml (bajo), 50 ng/ml (medio) y 200 ng/ml (alto).

7.7 Extracción de MTX del lisado de eritrocitos

Con el objetivo de establecer la técnica más apropiada para nuestro análisis se realizó una comparación de las técnicas de preparación empleadas en los artículos de la Tabla 3. Metodologías para la cuantificación de MTX y MTX-PG en sangre. Así mismo, se realizó una búsqueda bibliográfica de métodos alternativos de precipitación de proteínas en la monitorización terapéutica de MTX. Con estos antecedentes se seleccionaron tres metodologías de extracción líquido-líquido: precipitación de proteínas con ácido perclórico (ELL-AP), precipitación de proteínas con acetonitrilo (ELL-ACN) y precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo-Agua (ELL-MCA). Así mismo se propuso la evaluación de la extracción en fase sólida (en la que se analizó el cambio de solvente en la etapa de elusión). Ambas metodologías, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida, fueron probadas en plasma humano y posteriormente evaluadas en lisado de eritrocitos. En las metodologías evaluadas se comparó la presencia de interferencias endógenas y el porcentaje de recobro.

7.7.1 Extracción líquido-líquido

7.7.1.1 Precipitación de proteínas con ácido perclórico (ELL-AP)

A 0.1 ml de la muestra se añadieron 0.025 ml de ácido perclórico al 70%, se mezcló con vórtex por 30 s, se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se secó bajo corriente suave de nitrógeno y calentamiento en baño de agua a 40°C.

7.7.1.2 Precipitación de proteínas con acetonitrilo (ELL-ACN)

Basándonos en lo reportado previamente por Torregiani en 2018⁵⁹, se tomaron 0.250 ml de la muestra y se adicionaron 0.5 ml de ACN, se mezclaron en vórtex por 30 s y se centrifugaron a 6000 rpm durante 2 min. Al sobrenadante, se le adicionaron 0.6 ml de cloroformo y, nuevamente, se mezcló en vórtex por 30 s y se centrifugó a 6 000 rpm. Se recuperó la fase superior y se secó bajo corriente suave de nitrógeno y calentamiento en baño de agua a 40°C.

7.7.1.3 Precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo-Agua (ELL-MCA)

Se usó como referencia el método de precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo-Agua, desarrollado por Wessel en 1984⁶². Aquí, 0.1 ml de muestra fueron mezclados con 0.4 ml de metanol, agitados en vórtex por 30 s y centrifugados a 9000 RFC por 30 s. Posteriormente se adicionaron 0.2 ml de cloroformo, se repitió la agitación en vórtex por 30 s y la centrifugación a 9 000 RFC por 30 s. Seguido a ello se añadieron 0.3 ml de agua desionizada, se agitó en vórtex por 30 s y se centrifugó a 9 000 RFC por 2 min. Se corroboró la formación de 3 fases: inferior (cloroformo y lípidos), intermedio blanquecino (proteínas), superior (agua y metotrexato). Se recuperó el sobrenadante y se secó bajo corriente suave de nitrógeno y calentamiento en baño de agua a 50°C. El residuo fue resuspendido en 100 µl de citrofosfato pH 6, agitado en vórtex por 30 s y centrifugado a 6000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y 20 µl fueron inyectados en el cromatógrafo para su análisis.

7.7.2 Extracción en fase sólida

Este proceso tiene lugar mediante mecanismos de sorción-desorción de los analitos en la superficie de un material de soporte. Consta de cinco etapas: acondicionamiento, equilibrado, carga de la muestra, lavado y elusión; donde los solventes empleados y sus

proporciones dependen de la naturaleza de los analitos, así como de los sorbentes. Es por ello por lo que se siguieron las recomendaciones de trabajo establecidas por el fabricante evaluando únicamente el cambio de solvente en la etapa de elusión. De esta manera se evaluó un proceso de extracción en fase sólida con Metanol (EFS-Me) y un proceso de extracción en fase sólida con ACN (EFS-ACN); empleando cartuchos STRATA® C18-E, que tienen como sorbente una fase de sílica.

7.8 Validación de método bioanalítico

El método fue validado de acuerdo con la Guía de validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA (2018)³³, evaluando como parámetros: selectividad/especificidad, curva de calibración, precisión, exactitud, sensibilidad, recobro y estabilidad. Adicionalmente se calculó el límite de detección, de acuerdo con la guía Q2(R1) Validación de Procedimientos Analíticos: Texto y Metodología ⁴¹.

La selectividad fue evaluada mediante el análisis de lisado de eritrocitos de cinco donadores aparentemente sanos (blanco), y lisados de eritrocitos adicionados con EI (calibrador cero) y EI+MTX en el límite de cuantificación (125 ng/ml); aplicando el método ELL-MCA y observando la presencia de interferencias endógenas en los tiempos de retención del analito y del estándar interno (EI). Se aceptó una ausencia de interferencias si la respuesta observada fue <5% para el EI y <20% para MTX, en el límite de cuantificación (LC). Así mismo se evaluó la especificidad, capacidad del método para determinar MTX en presencia de medicación concomitante (ácido fólico, AF) en el tratamiento para AR.

Para la curva de calibración se evaluó la existencia de una correlación lineal entre la concentración de MTX (en un rango de 25-225 ng/ml) y la respuesta del instrumento (se analizaron como parámetros de respuesta: área y altura de MTX; así como la relación Respuesta MTX/Respuesta de EI), mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró como significativa una correlación menor al 0.01 (bilateral). El análisis estadístico se realizó en SPSS Statistics 26. Los calibradores fueron preparados como se indica en la sección 7.6 *Obtención de matriz biológica de MTX en eritrocitos*, elaborando la curva de calibración por triplicado.

En la evaluación de la exactitud se prepararon 5 réplicas por cada nivel de control de calidad. De manera similar se trabajó en la evaluación de la precisión, repitiendo el análisis durante tres días. En ambos parámetros se consideró aceptable un coeficiente de

variación (CV) $\leq 15\%$ para los niveles bajo, medio y alto; así como un CV $\leq 20\%$ para el límite de cuantificación.

La sensibilidad (límite de cuantificación) fue establecido como aquella concentración que puede medirse con una exactitud y precisión aceptables.

El recobro fue evaluado mediante la comparación de blancos adicionados pre y post-extracción a niveles de concentración bajo, medio y alto, con 6 réplicas. El porcentaje no necesariamente es del 100% pero debe ser reproducible a cada nivel (CV $\pm 15\%$).

La estabilidad fue evaluada en los calibradores en niveles de concentración bajo, medio y alto, con 6 réplicas bajo un almacenamiento a -20°C durante 30 días, en un congelador Torrey, modelo CH4. El criterio de aceptación indica que la concentración nominal de cada nivel debe ser $\pm 15\%$.

7.9 Evaluación de la aplicación del método a muestras de pacientes con AR

Con el objeto de conocer las variaciones que pudieran presentarse al emplear muestras eritrocitarias reales, de pacientes con AR, respecto al procedimiento analítico validado, se propuso realizar un estudio piloto que nos permitiera evaluar la factibilidad de la aplicación de la metodología para un estudio clínico posterior. Las muestras analizadas provinieron de un biobanco y eran procedentes del estudio clínico “Aparición de Nueva Diabetes en Artritis Reumatoide (ANDAR). 2018-2019, aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de Cuernavaca, Servicios de Salud de Morelos (No. DAM/SEIC/DIC/0516/2019)”. Las muestras de eritrocitos de pacientes seleccionados para ser evaluados fueron de aquellos pacientes en un rango de edad de 37 a 51 años, con Factor Reumatoide (+), con un tiempo de AR de 2-22 años y una puntuación DAS-28 en un rango de 2.97-5.8. Para el análisis de muestras se corroboró la linealidad entre la concentración y altura de MTX preparando una curva de calibración de 5 puntos (a concentraciones 50, 100, 125, 150 y 225 ng/ml). Posteriormente se prepararon por duplicado controles de calidad a niveles de concentración bajo (50 ng/ml), medio (125 ng/ml) y alto (200 ng/ml); estableciendo un coeficiente de variación $<15\%$ y dos criterios de aceptación: en cada nivel un 50% de las muestras debía cumplirlo CV $<15\%$ (Criterio 1) y más del 67% de todos los controles de calidad analizados en la corrida analítica debía tener CV $<15\%$ (Criterio 2). Una vez verificado el cumplimiento de la linealidad y los controles de calidad, se analizaron 10 muestras de pacientes con AR, procedentes de un biobanco, las cuales estaban almacenadas a -80° . Dado que se desconocía el número de eritrocitos/ml de los pacientes y mediante observación al microscopio se verificó la hemólisis de las muestras al descongelarse, se tomaron 990 μl

de lisado y se adicionaron 10 μ l de solución stock de teofilina. La solución fue agitada en vórtex durante 30 s y se aplicó el proceso de extracción de MTX por ELL-MCA. El residuo fue resuspendido en 100 μ l de citrofosfato pH 6, agitado en vórtex por 30 s y centrifugado a 6000 rpm. El sobrenadante fue recuperado y 20 μ l fueron inyectados en el cromatógrafo para su análisis.

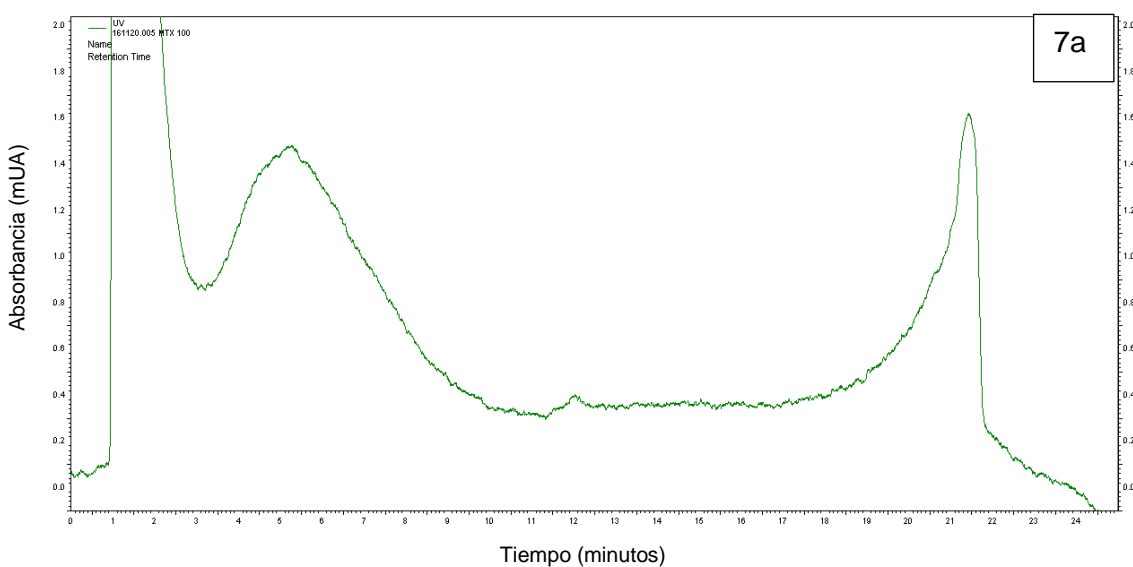
8. RESULTADOS

8.1 Desarrollo de método bioanalítico

8.1.1 Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas

8.1.1.1 Optimización de fase móvil

En la evaluación preliminar de la composición de la fase móvil, se empleó una solución de MTX 100 µg/ml para examinar la detección de MTX y la forma del pico. Se analizó una proporción 50:50 Agua: ACN, detectando la presencia de picos pequeños y no resueltos que van de los 3 hasta los 23 minutos aproximadamente (Figura 7a). Al cambiar la proporción a 70:30 Agua: ACN y 90:10 Agua: ACN se presentó un comportamiento semejante con señales de absorción débiles, no resueltas y con un patrón de picos irregular (Figura 7b y c).



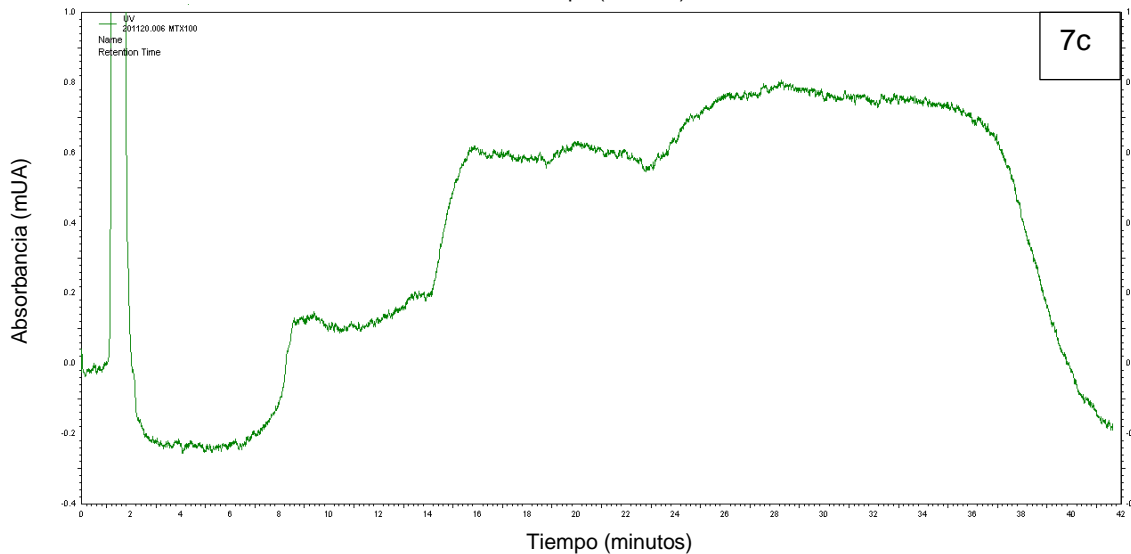
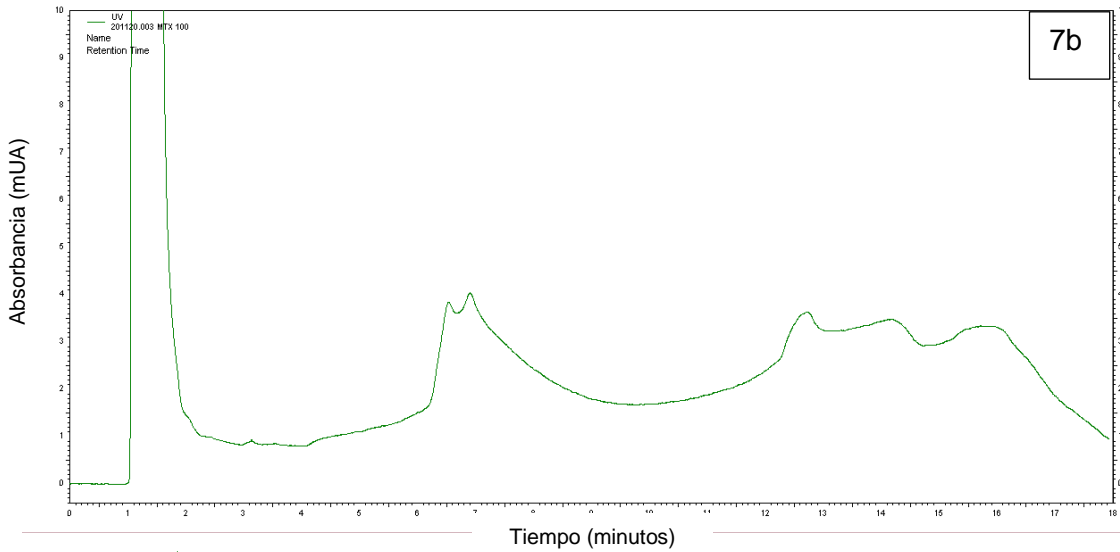


Figura 7. Análisis preliminar de MTX: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en fase móvil Agua: ACN. a) Proporción 50:50 Agua: ACN, b) Proporción 70:30 Agua: ACN y c) Proporción 90:10 Agua: ACN. Inyección de 20 μL . Se observa un patrón irregular de picos.

Al cambiar la composición de la fase móvil de agua a solución amortiguadora (citrofosfato a pH 6), se observó la presencia de una señal con tres picos no resueltos entre los 5 y los 10 minutos (Figura 8), por lo que se decidió continuar con la evaluación de la solución amortiguadora modificando las proporciones de la fase móvil.

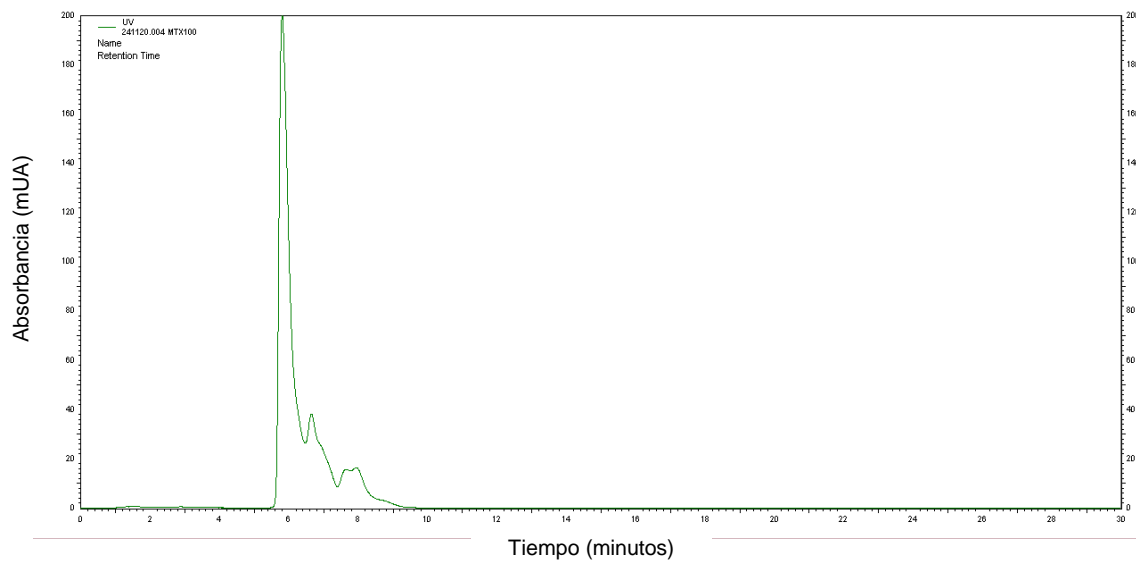


Figura 8. Evaluación de la composición de la fase móvil 90:10 Citrofosfato: ACN. MTX 100 µg/ml en citrofosfato, inyección de 20 µL. Señal de MTX entre 5 y 10 minutos.

En la Figura 9 se observan los resultados del análisis de una inyección de 100 µg/ml de MTX con una proporción 80:20 citrofosfato: ACN. En esas condiciones, se detectó que la elución del MTX ocurre demasiado rápido: 2 minutos, por lo que se decidió disminuir la concentración de ACN.

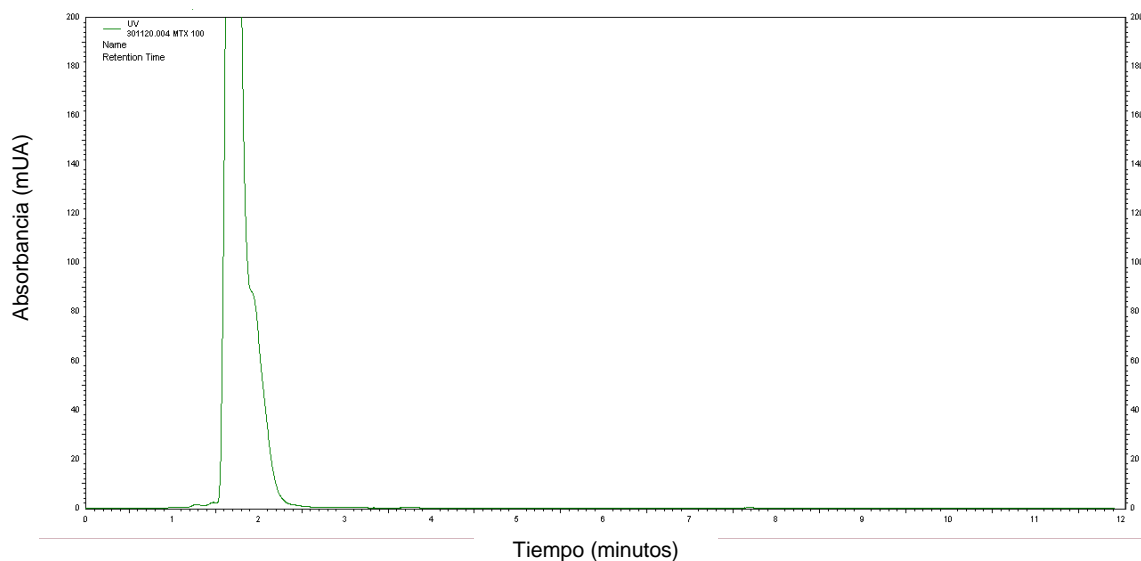


Figura 9. Evaluación de la composición de la fase móvil 80:20 Citrofosfato: ACN. MTX 100 µg/ml en citrofosfato, inyección de 20 µL. Elución de MTX a los 2 minutos

Por el contrario, al evaluar la proporción 95:5 citrofosfato: ACN, se observó un desplazamiento del pico de MTX para situarse entre los 20 y 28 minutos (ver Figura 10). Asimismo, se observaron picos solapados y asimetría posterior. Aunque no se obtuvo un pico completamente resuelto se corroboró que disminuir la concentración de ACN incrementa el tiempo de retención de MTX por la fase estacionaria, es por ello por lo que se decidió continuar la evaluación de los parámetros siguientes con esta proporción.

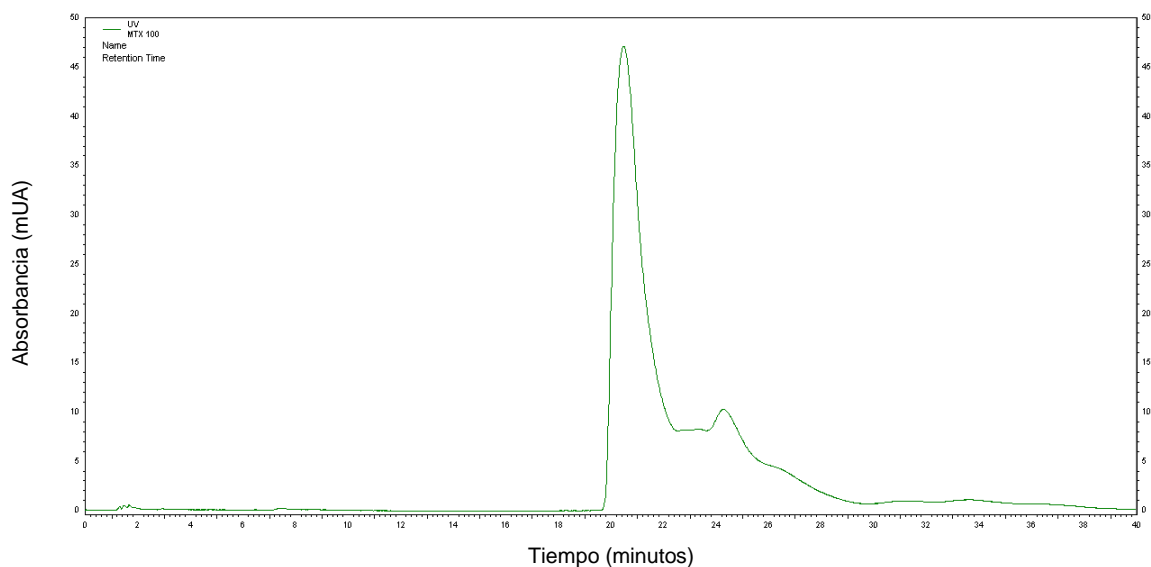


Figura 10. Evaluación de la composición de la fase móvil 95:5 Citrofosfato: ACN. MTX 100 $\mu\text{g/ml}$ en citrofosfato, inyección de 20 μL . Elución de MTX entre 18 y 28 minutos

Por otro lado, también se evaluó el modificar la fuerza iónica de la solución amortiguadora, al cambiar de una concentración de 0.01 M (Figura 11a) a 0.05 M (Figura 11b). Como se observa en la imagen no se observó ningún cambio aparente en la retención del MTX.

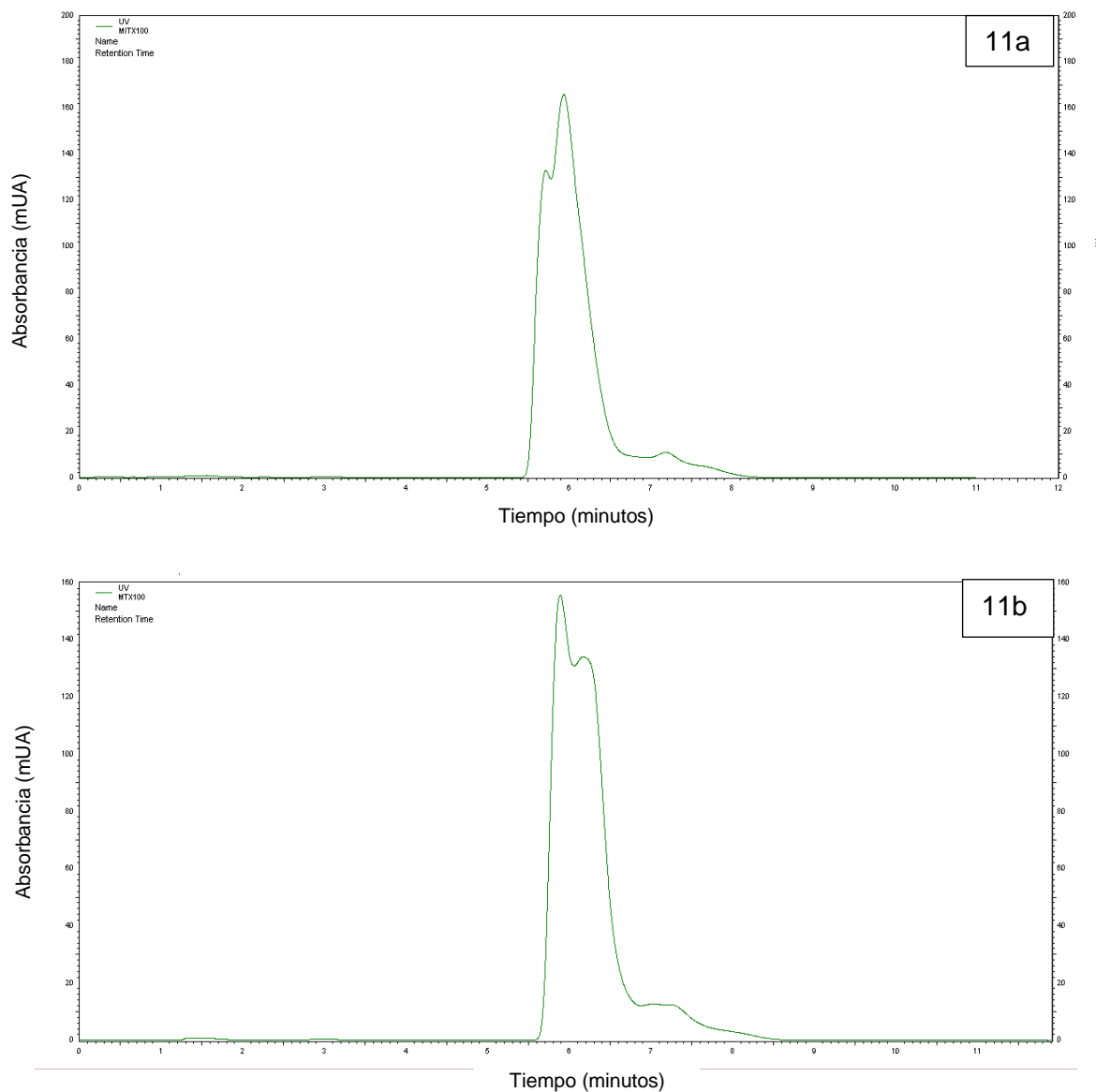


Figura 11. Evaluación del efecto de la fuerza iónica. MTX 100 µg/ml en fase móvil 90:10 Citrofosfato: ACN, inyección de 20 µL. a) Concentración de citrofosfato 0.01 M. b) Concentración de citrofosfato 0.05 M.

8.1.1.2 Optimización de fase estacionaria

Al evaluar el efecto de la carga de carbono, con la columna uno: Interstsil ODS® (15%), se obtuvo una señal entre los 18 y 28 min con picos no resueltos (Figura 12a); mientras que con la columna dos: XBridge® (18%), se observó un pico simétrico entre los 12-13 minutos (Figura 12b). Es por esto por lo que se decidió emplear la columna con 18% de carga de carbono para el resto de los ensayos.

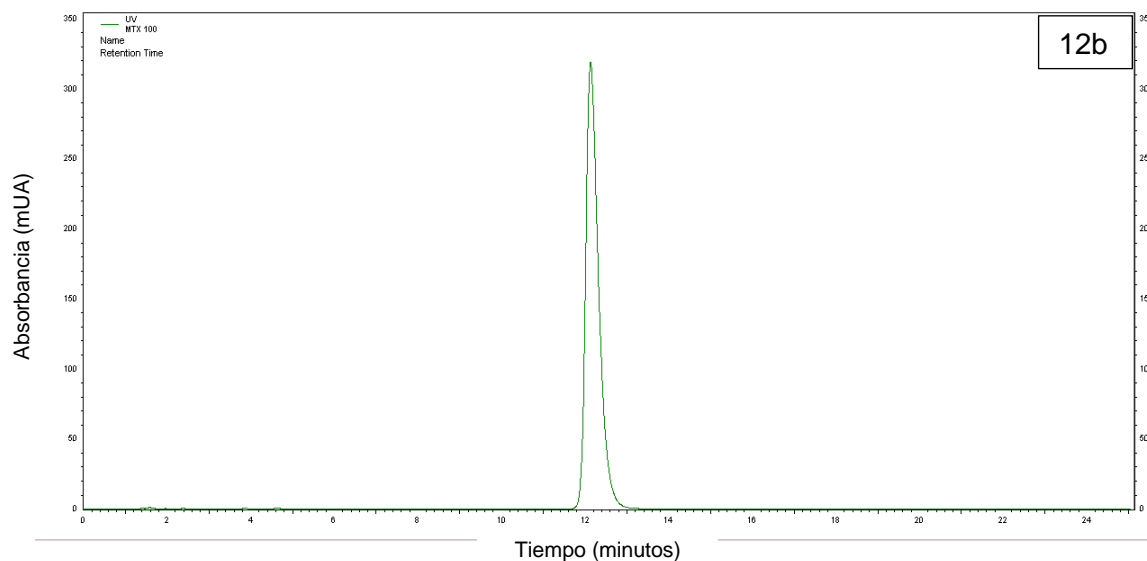
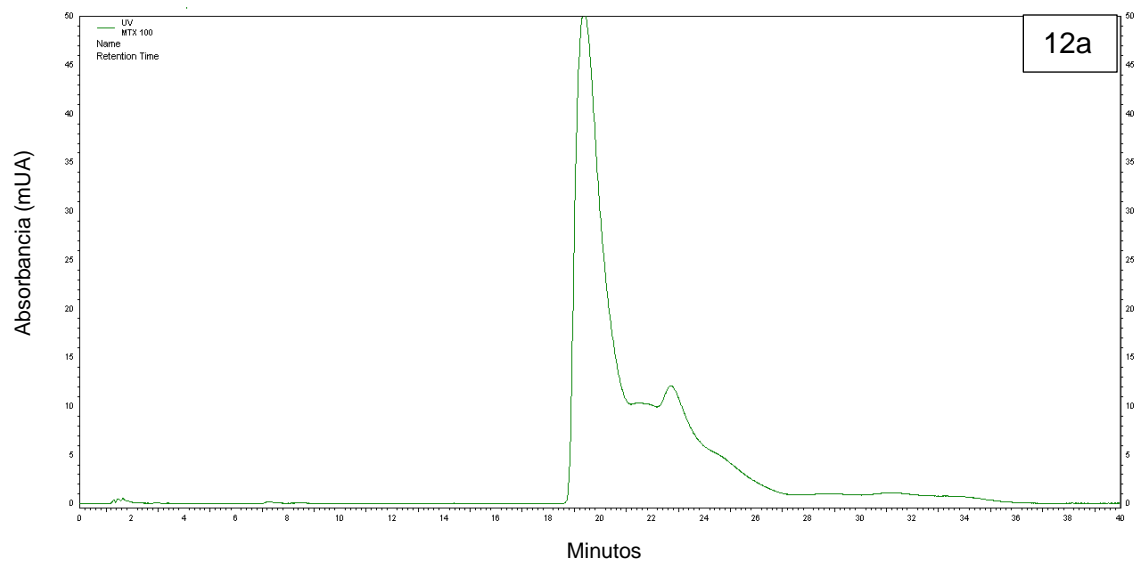


Figura 12. Evaluación de la carga de carbono. MTX 100 $\mu\text{g/ml}$, inyección de 20 μL en fase móvil 95:5 Citrofosfato: ACN. a) Carga de carbono al 15%, pico no resuelto y b) Carga de carbono al 18%, pico resuelto.

8.1.1.3 Selección del detector

En la Figura 13 se observa la comparación de sensibilidad entre dos equipos de CLAR. Referente a la evaluación de la detección de MTX en el cromatógrafo de líquidos Waters 2996 con detector ultravioleta-arreglo de fotodiodos se detectó MTX hasta una concentración de 156 ng/ml (Figura 13a). Por su parte, en el equipo HITACHI Elite La Chrome, que emplea un detector ultravioleta-longitud de onda variable, la concentración mínima detectada fue de 39 ng/ml (Figura 13b). Debido a que la sensibilidad fue mayor para

el detector ultravioleta-longitud de onda variable, se optó por el uso del equipo HITACHI Elite La Chrome.

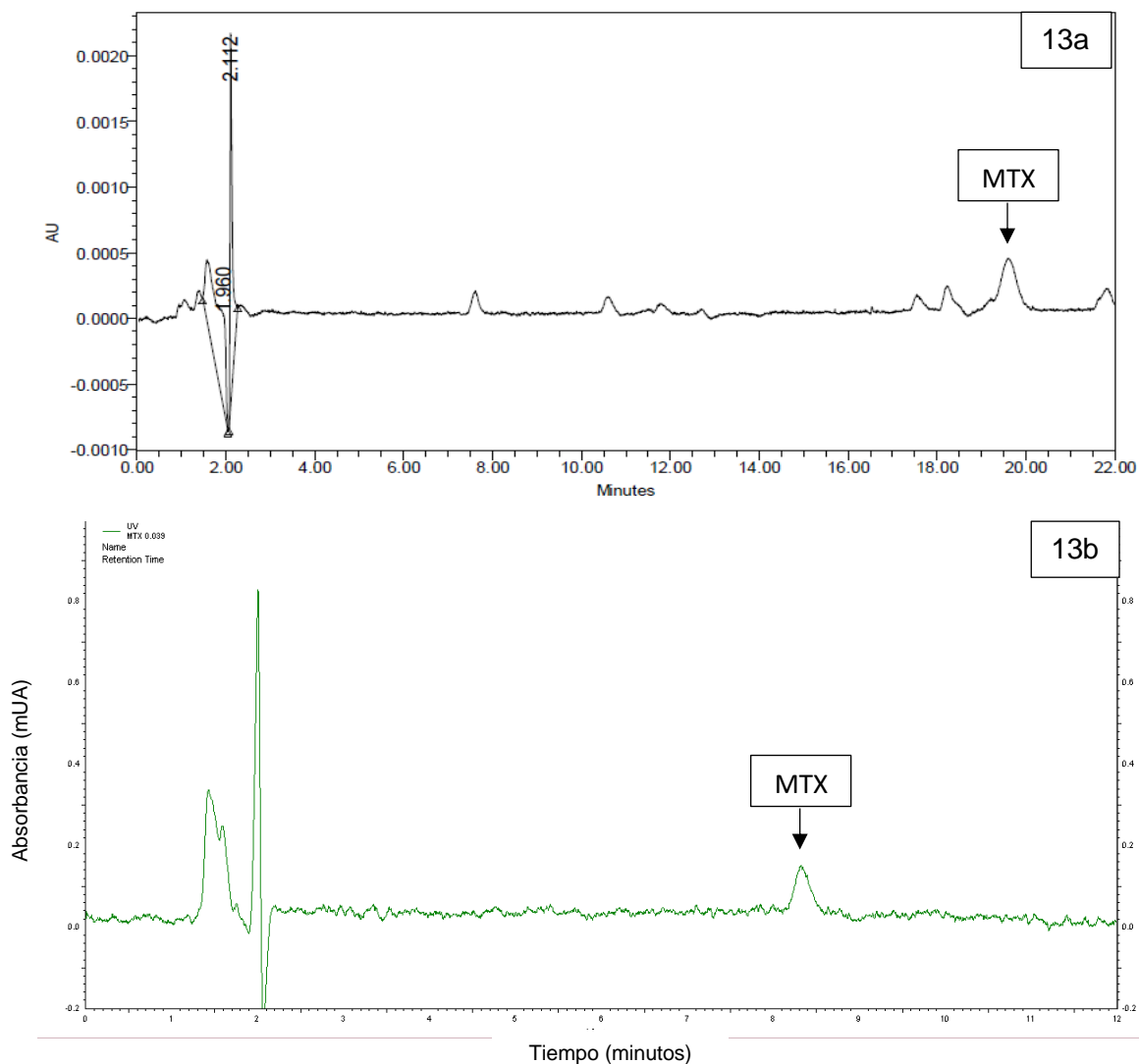


Figura 13. Evaluación de la detección de MTX. a) Cromatógrafo de líquidos Waters 2996 con detector ultravioleta-arreglo de fotodiodos, se detecta MTX hasta 156 ng/ml. b) Cromatógrafo de líquidos HITACHI Elite La Chrome con detector ultravioleta-longitud de onda variable, se detecta MTX hasta 39 ng/ml.

Con base en los resultados de las evaluaciones anteriores (Figuras 7-13) se establecieron como condiciones cromatográficas finales: 1) fase móvil constituida por una mezcla isocrática en proporción 95:5 Citrofosfato 0.03 M pH 6: ACN, a flujo de 1 ml/min y 2) fase estacionaria constituida por una columna C₁₈ Waters XBridge® (18% carbono) con tamaño de partícula 3.5 µm y dimensiones 4.6 x 150 mm a 40°C y una precolumna Security

Guard (C18, 4 x 3 mm, Phenomenex®). El volumen de inyección fue de 20 µL; 3) Detector ultravioleta- longitud de onda variable a λ de 302 nm.

8.1.2 Selección del estándar interno 1

En la determinación del estándar interno se contaba con dos compuestos: 4-hidroxi-3-metoxi acetofenona y 4-nitrobenzofenona. Primero se evaluó su detección, bajo las condiciones metodológicas establecidas, 4-hidroxi-3-metoxi acetofenona se empleó a una concentración de 210 µg/ml y se detectó una señal entre los 42 y 45 minutos (Figura 14a); mientras que para 4-nitrobenzofenona se utilizó a una concentración de 230 µg/ml y la señal se detectó alrededor de los siete minutos (Figura 14b). Debido al menor tiempo de retención observado 4-nitrobenzofenona, fue elegido estándar interno

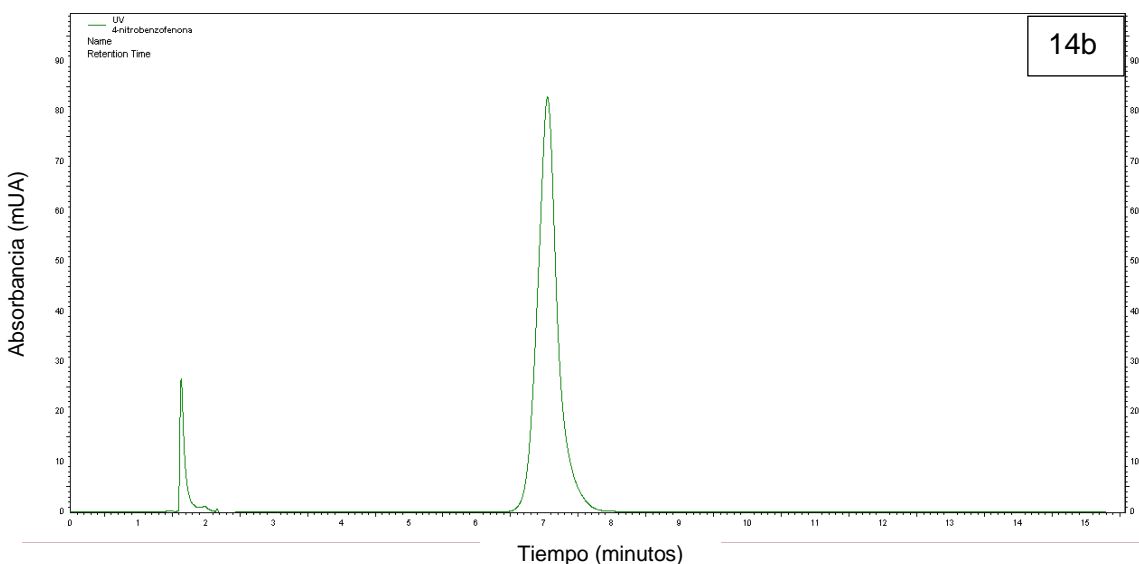
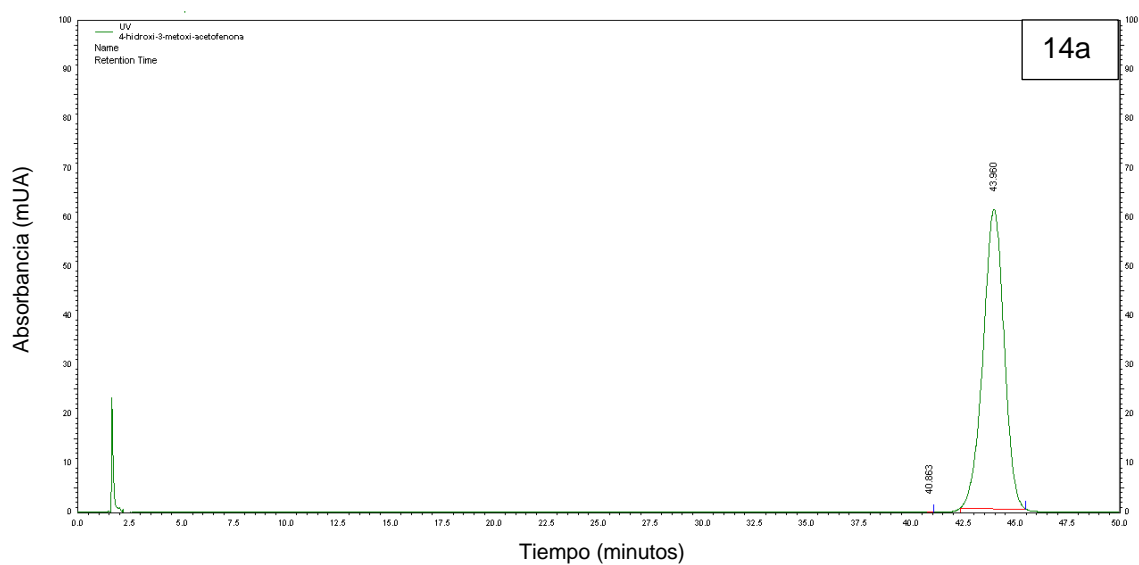


Figura 14. Cromatogramas de sustancias propuestas como estándar interno. a) 4-hidroxi-3-metoxi acetofenona a 210 µg/ml, inyección de 4.2 µg, se detecta pico después de los 40 minutos. b) 4-nitrobenzofenona a 230 µg/ml, inyección de 4.6 µg, pico a los 7 minutos.

8.1.3 Extracción de MTX de lisado de eritrocitos

Para la etapa de evaluación y selección de un método de extracción de MTX del lisado de eritrocitos, se consideraron tres metodologías de extracción líquido-líquido: precipitación de proteínas con ácido perclórico (ELL-AP), precipitación de proteínas con acetonitrilo (ELL-ACN) y precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo-Agua (ELL-MCA). Así mismo se consideró la evaluación de la extracción en fase sólida, sin embargo, durante el desarrollo del experimento se observó que el lisado de eritrocitos no eluyó por el cartucho desde la etapa de carga, por lo que este procedimiento fue descartado. De este modo, a continuación, se presentan los resultados de los métodos de extracción líquido-líquido.

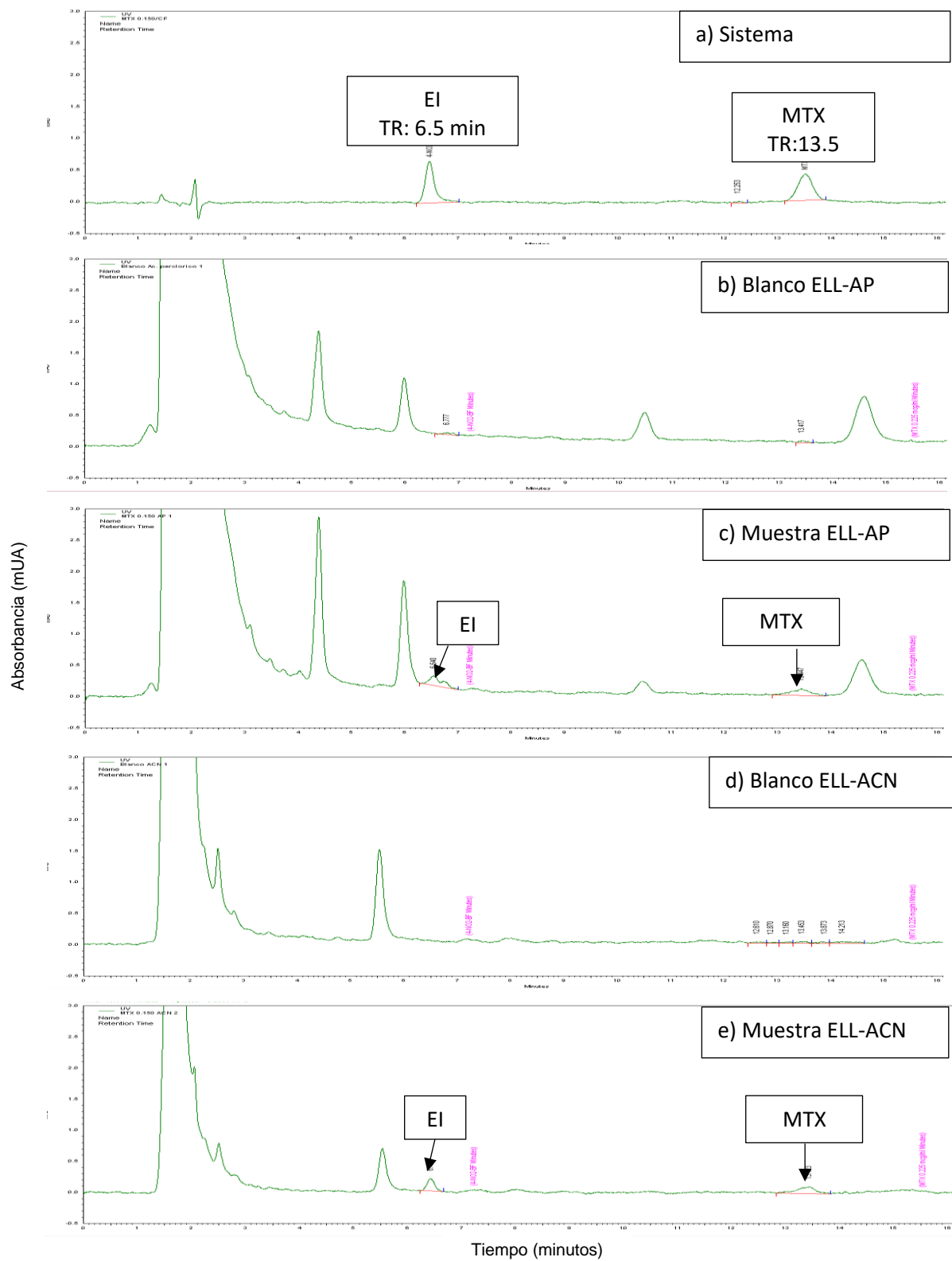
8.1.3.1 Evaluación de la extracción líquido-líquido en plasma humano

En un primer experimento se evaluaron los 3 métodos de extracción líquido-líquido en plasma humano; los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15. En el sistema se comprueba la detección de 4 nitrobenzofenona, el estándar interno (EI), a los 6.5 min y de MTX con un tiempo de retención de 13.5 min (Fig. 15a).

Al aplicar el procedimiento de precipitación de proteínas con ácido perclórico (ELL-AP) se observó la presencia de múltiples picos en el blanco, incluso en regiones cercanas a los picos de interés (6 y 14.5 min), posibilitando que pudieran interferir con nuestros compuestos (Fig. 15b). Al analizar el EI y MTX observamos un solapamiento de picos en la región correspondiente al EI, mientras que hubo una separación entre MTX y el pico observado a los 14.5 min (Fig. 15c).

Por su parte, al emplear el procedimiento de precipitación de proteínas con acetonitrilo (ELL-ACN), en el sistema sin estándares se detectó únicamente la presencia de un pico a los 5.5 min (Fig. 15d). Sin embargo, en presencia de los estándares el pico observado no interfiere ni con el EI ni para el MTX (Fig. 15e).

En el caso del procedimiento de extracción por precipitación de proteínas con Metanol-Cloroformo-Agua (ELL-MCA), en condiciones basales (sin presencia de estándares, se observó sólo un pico en el blanco a los 5.54 min (Fig. 15f), el cual no interfirió con la presencia del EI, ni con el pico de MTX (Fig. 15g).



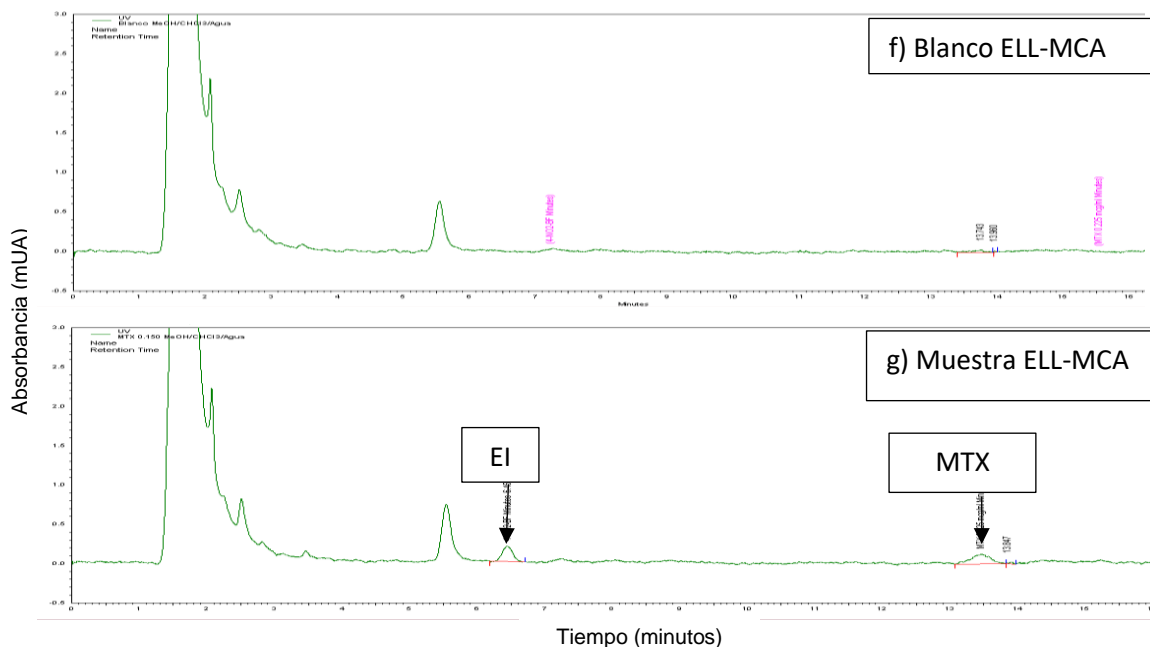


Figura 15. Cromatogramas de extracción líquido-líquido en plasma humano. a) Sistema, se detecta MTX a 13.5 min, b) Blanco ELL-AP, se observa la presencia de múltiples picos c) Muestra ELL-AP, solapamiento de picos en región de EI, d) Blanco ELL-ACN, se presenta pico a los 5.5 min, e) Muestra ELL-ACN, no hay interferencia en región de EI ni de MTX, f) Blanco ELL-MCA, se detecta pico a los 5.5 min y g) Muestra ELL-MCA, sin interferencia en región de EI ni de MTX. EI: estándar interno, MTX: Metotrexato, TR: Tiempo de retención.

Además del análisis cualitativo (Figura 15), se calculó el porcentaje de recuperación de MTX para cada método, a partir de 3 ensayos independientes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. Como se aprecia el método ELL-AP indica una recuperación superior al 100%, que puede ser explicado debido al alto nivel de interferencia detectada en la región del EI la cual ocasionó una disminución en su altura y, por tanto, alteró la relación MTX/EI. Por su parte, tanto el procedimiento de extracción ELL-ACN como el ELL-MCA muestran porcentajes de recuperación superiores al 85%, siendo la ELL-MCA la que muestra un menor porcentaje de variación.

Método	% Recuperación MTX	
	Media \pm DE	CV (%)
ELL-AP	308.37 \pm 172.23	55.85
ELL-ACN	86.51 \pm 9.35	10.81
ELL-MCA	89.82 \pm 6.38	7.11

Tabla 4. Extracción de MTX de plasma humano. El método ELL-MCA proporciona elevada recuperación y presenta menor variación. ACN: Acetonitrilo, AP: Ácido perclórico, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, ELL: Extracción Líquido-Líquido, MCA: Metanol-clorofórm-agua. n=3.

Considerando que se observaron menores interferencias en el análisis de plasma humano, así como un mayor porcentaje de recuperación y datos más homogéneos, se decidió continuar con la evaluación del método ELL-MCA en eritrocitos.

8.1.3.2 Evaluación del método ELL-MCA en eritrocitos.

En la Figura 16 se presentan los cromatogramas del sistema donde se comprueba la detección del estándar interno (EI) a los 6.8 min y de MTX a los 15.6 min (Fig. 16a). En el blanco del lisado de eritrocitos se detectaron dos picos solapados en la zona del EI, entre los 6 y 7 min, así como un pico a los 14.9 min que podría solaparse con el pico de MTX (Fig. 16b). En el cromatograma de la muestra del lisado de eritrocitos se aprecia un incremento en el tamaño del pico del EI y un solapamiento de picos en la zona de MTX (Fig. 16c). Dado que se observaron interferencias tanto en la zona del EI como en la de MTX, se decidió evaluar el efecto de la dilución de eritrocitos, así como también se optó por evaluar la ELL-ACN.

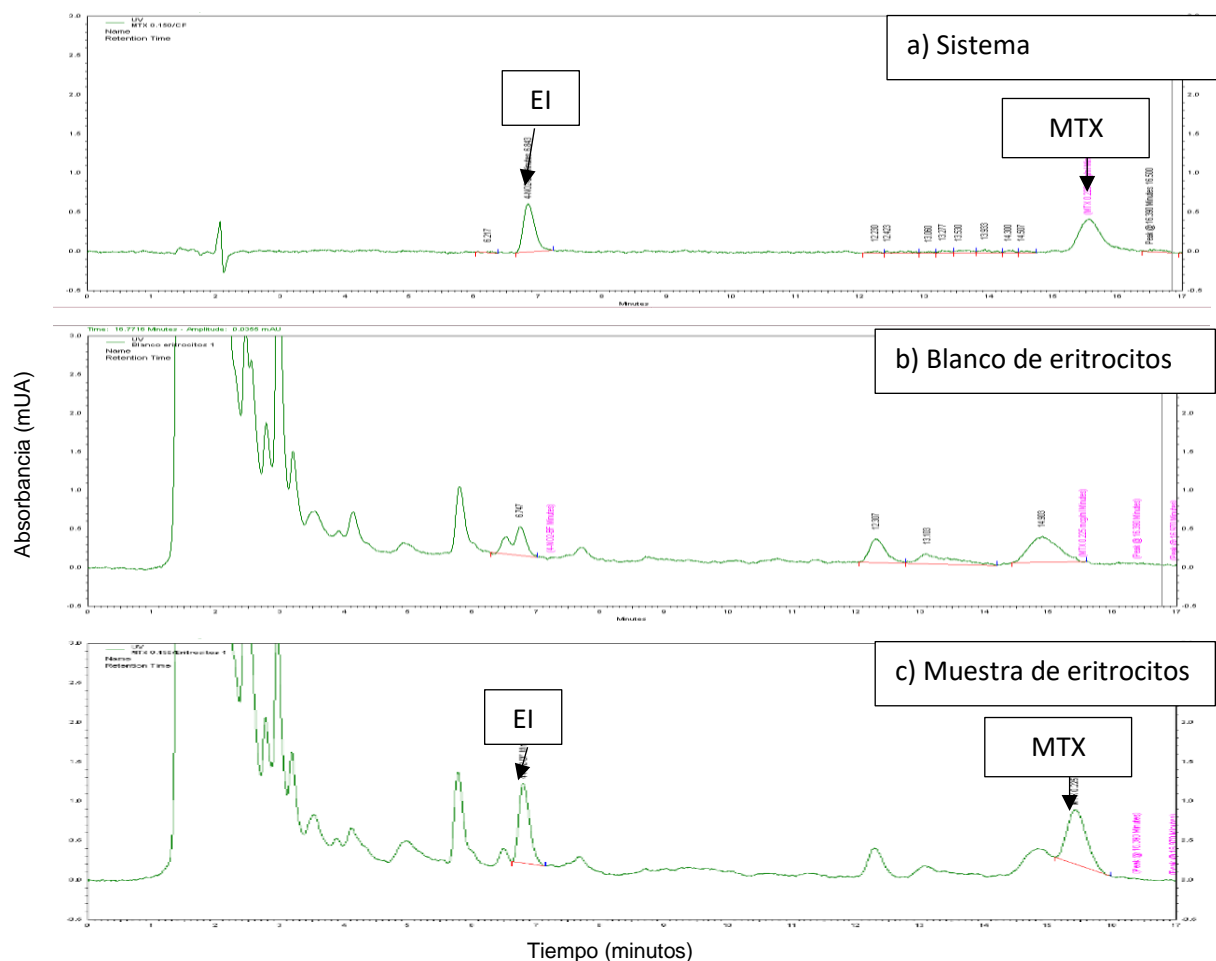
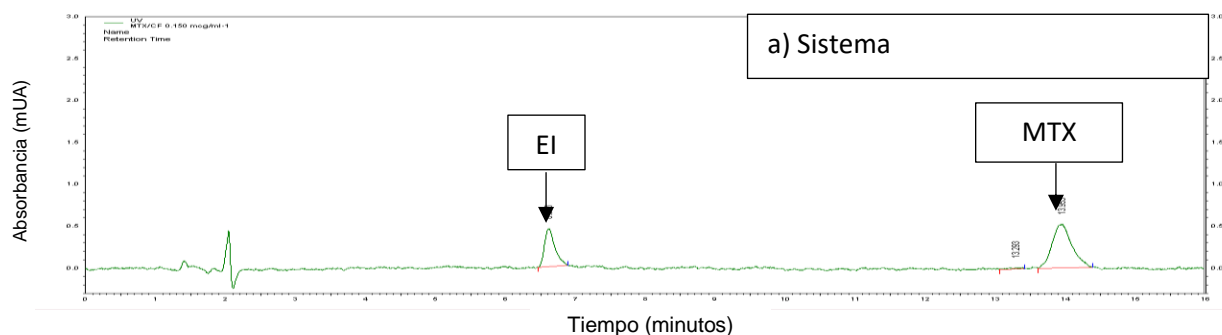


Figura 16. Extracción líquido-líquido por el método MCA en lisado de eritrocitos. a) Sistema, detección de EI a los 6.8 min y de MTX a los 15.6 min, b) Blanco eritrocitos, con interferencias en zona de EI, c) Muestra de eritrocitos, solapamiento de picos en región de MTX. EI: estándar interno, MTX: Metotrexato.

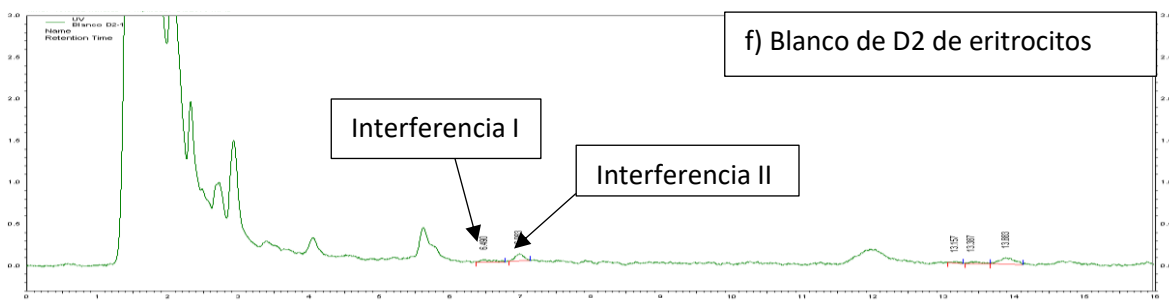
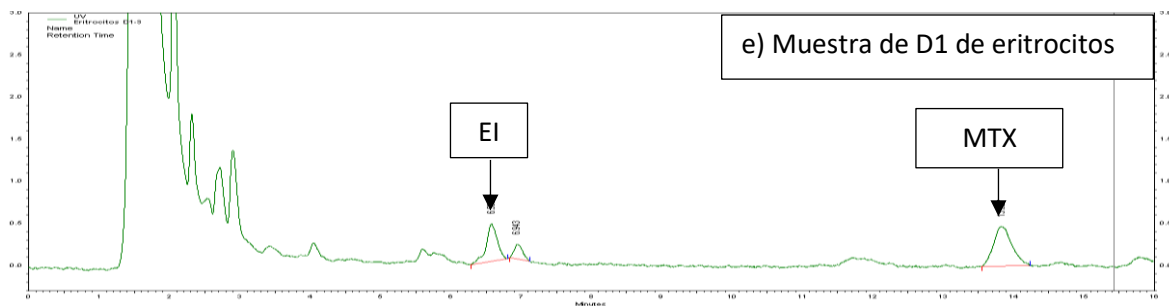
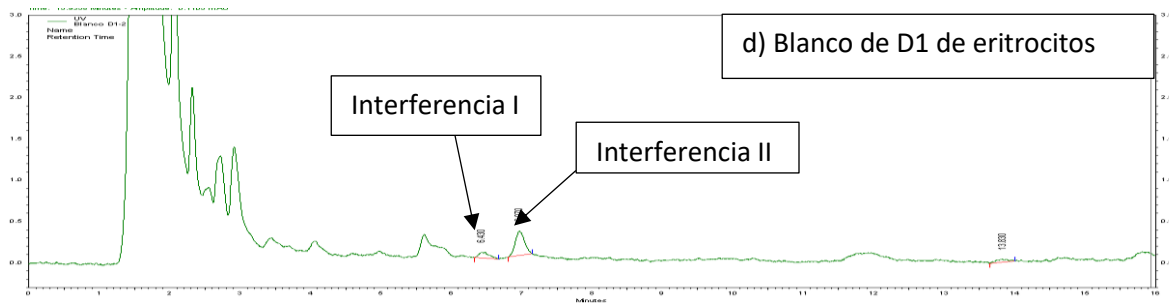
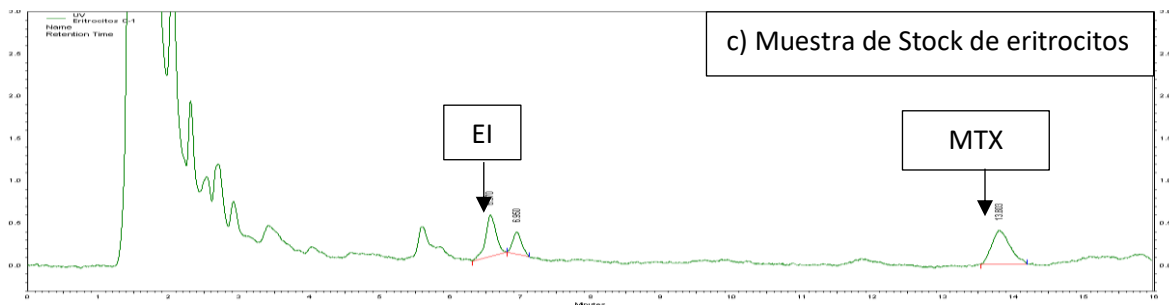
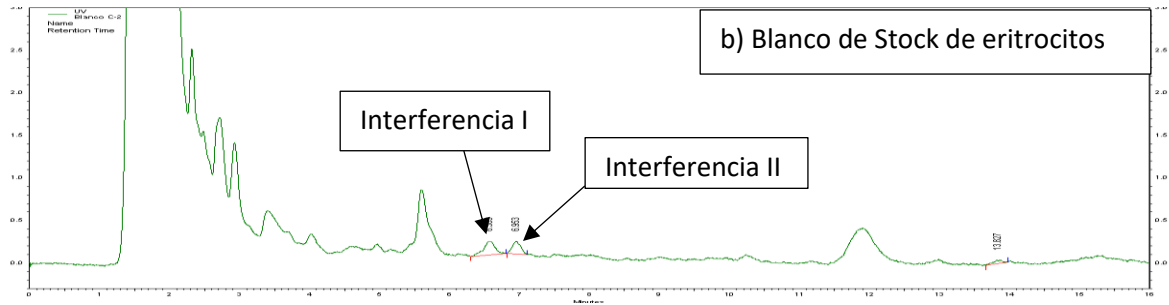
8.1.3.3 Evaluación de los métodos ELL-MCA y ELL-ACN en muestras de eritrocitos diluidas

Se decidió evaluar si el efecto de la dilución de los eritrocitos permitía disminuir las interferencias observadas en las regiones del EI y MTX al aplicar el método ELL-MCA; así mismo se optó por evaluar si el método ELL-ACN, proporcionaba menores interferencias al emplear eritrocitos como matriz biológica. Para ello se aplicó un conteo de eritrocitos en cámara de Neubauer tras descongelar la muestra, obteniendo un total de 72,600 eritrocitos/ml. A partir de esta muestra se realizaron dos diluciones seriadas 1:1 de eritrocitos en agua, de tal modo que en la Dilución 1 había 36,300 eritrocitos/ml y en la Dilución 2 había 18,150 eritrocitos/ml.

El análisis mediante CLAR-UV permitió la detección de EI (6.6 min) y de MTX (13.8 min) (Fig. 17a). En el análisis basal de la solución stock de eritrocitos se detectaron dos picos en la región del EI, con tiempos de retención de 6.5 (denominado interferencia I) y 7.0 (denominado interferencia II); mientras que para la zona de MTX no se observaron interferencias (Fig. 17b), como se habían mostrado en la Figura 16. Así también, al analizar los estándares se detectó que la interferencia I incrementa la señal del EI (Fig. 17c). En las condiciones basales de la dilución 1 y dilución 2 se observó una disminución significativa de la señal de la interferencia I (Fig. 17d y Fig. 17f). En estas condiciones, la evaluación de MTX no se ve alterada (Fig. 17e y Fig. 17g). Sin embargo, a pesar de su disminución en la dilución, la Interferencia II, no logró eliminarse y aunque hay una aparente separación respecto al EI se consideró que podría interferir con el pico del estándar interno. En razón a eso, se decidió sustituir el EI por alguna otra sustancia con diferente tiempo de retención.



Absorbancia (mUA)



Tiempo (minutos)

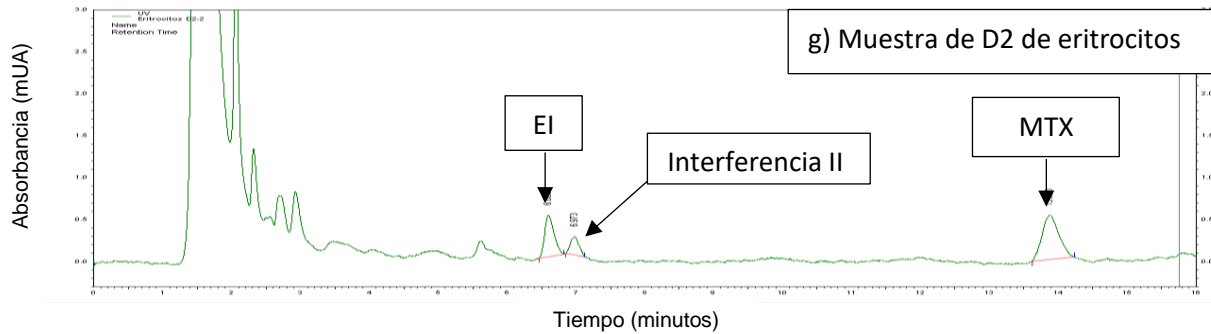
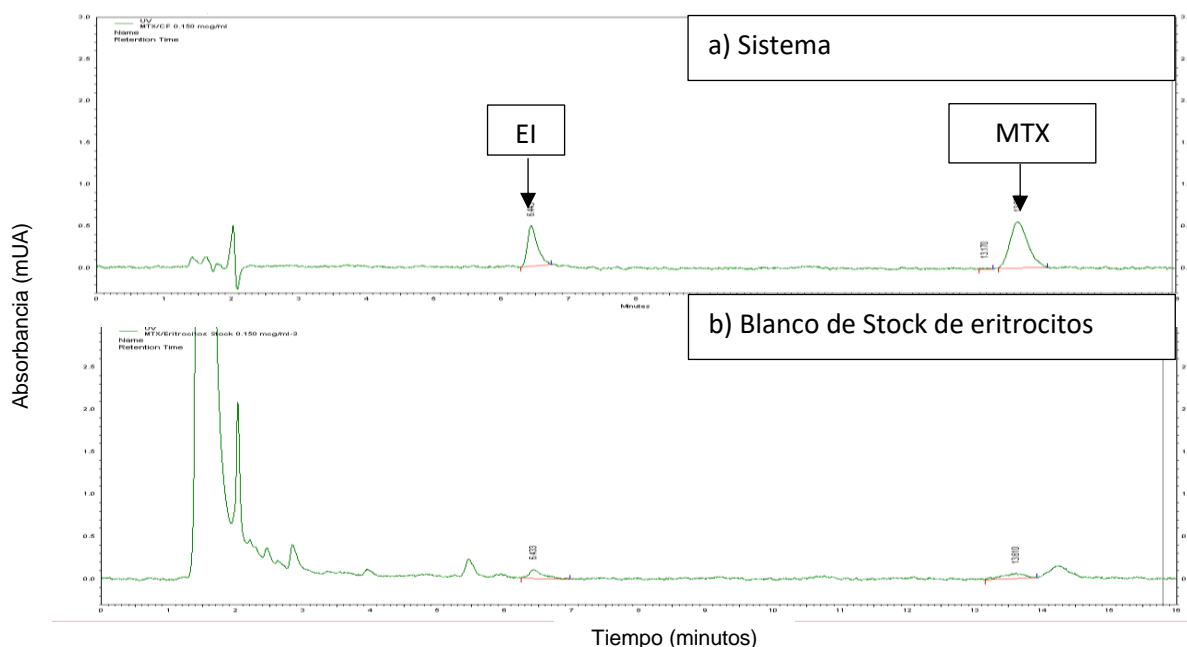


Figura 17. Extracción de MTX por el método ELL-MCA en lisado de eritrocitos diluidos. a) Sistema, detección de EI a los 6.6 min y de MTX a los 13.8 min, b) Blanco stock de eritrocitos, c) Muestra de stock de eritrocitos, d) Blanco de Dilución 1 (D1) de eritrocitos, e) Muestra de Dilución 1 de eritrocitos, f) Blanco de Dilución 2 (D2) de eritrocitos y g) Muestra de Dilución 2 de eritrocitos. Los blancos fueron analizados por duplicado, mientras que las muestras se evaluaron por triplicado. EI: estándar interno, MTX: Metotrexato.

Por otra parte, también se evaluó el efecto de muestras de eritrocitos extraídos por el método ELL-ACN para la detección de EI y MTX en nuestro sistema de CLAR-UV. De esa manera, en la Figura 18a se observa nuevamente las condiciones basales de los estándares: 6.4 min para EI y 13.7 min para MTX. En el análisis en blanco del stock de eritrocitos únicamente se detectó un pico a los 5.5 min (Fig. 18b), sin embargo, no interfirió con el EI en la muestra enriquecida (Fig. 18c). Al realizar la Dilución 1, tampoco se detectan interferencias en el blanco (Fig. 18d) ni en la muestra enriquecida (Fig. 18e) a lo largo de la corrida analítica. Un comportamiento similar puede observarse para el blanco (Fig. 18f) y la muestra enriquecida (Fig. 18g), en la Dilución 2.



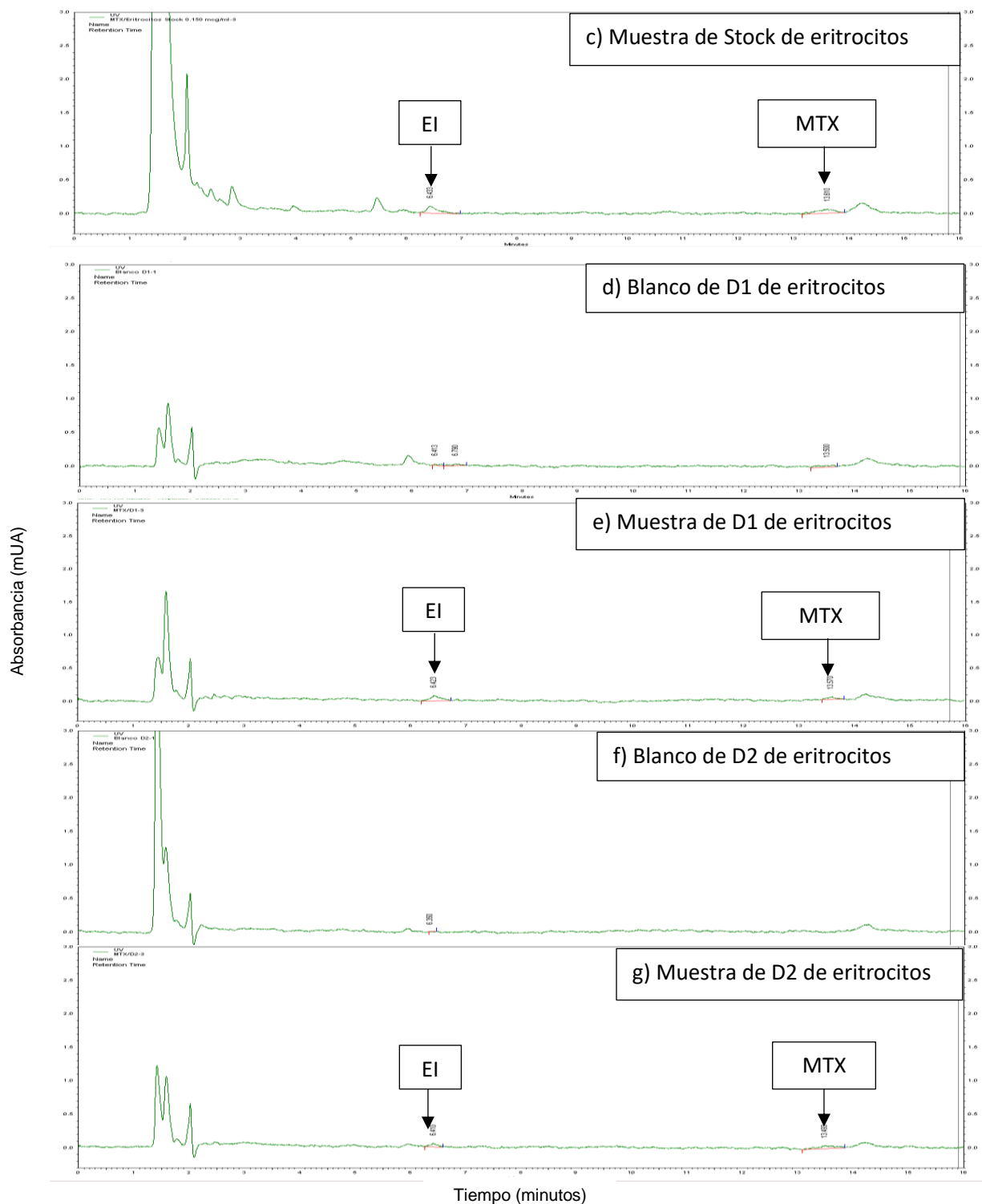


Figura 18. Extracción de MTX por el método ELL-ACN en lisado de eritrocitos diluidos. a) Sistema, detección de EI a los 6.4 min y de MTX a los 13.7 min, b) Blanco stock de eritrocitos, c) Muestra de stock de eritrocitos, d) Blanco de Dilución 1 (D1) de eritrocitos, e) Muestra enriquecida de Dilución 1 de eritrocitos, f) Blanco de Dilución 2 (D2) de eritrocitos y g) Muestra enriquecida de Dilución 2 de eritrocitos

eritrocitos. Los blancos fueron analizados por duplicado, mientras que las muestras se evaluaron por triplicado. El estándar interno, MTX: Metotrexato.

Los resultados del análisis cuantitativo se muestran en la Tabla 5. Como se puede observar hay una mayor variabilidad cuando se emplea el stock de eritrocitos, resultando más favorable el empleo de la dilución de éstos. Así mismo se aprecia un mayor porcentaje de recuperación de MTX cuando se aplica el método ELL-MCA en comparación con ELL-ACN, sin embargo, hay que considerar la interferencia observada en la región del estándar interno para el método ELL-MCA, la cual podría alterar el porcentaje de recuperación de MTX.

Tabla 5. Extracción de MTX de lisado de eritrocitos.

	MÉTODO			
	PP MCA		PP ACN	
SOLUCIÓN	Media (%) ± DE	CV (%)	Media± DE	CV (%)
Stock Eritrocitos	121.52± 7.01	46.91	48.86±6.94	14.21
Dilución 1	99.29±4.75	4.79	32.07±5.27	16.45
Dilución 2	113.17±12.77	11.28	48.61±5.16	10.62

CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, PP ACN: precipitación de proteínas por el método de acetonitrilo, PP MCA: precipitación de proteínas por el método metanol-cloroformo-agua. n=3. El método ELL-MCA proporciona elevada recuperación y presenta menor variación.

8.1.4 Evaluación de teofilina como estándar interno 2

Debido a las interferencias observadas con 4-nitrobenzifenona, se decide buscar otras sustancias para ser empleadas como estándar interno, considerando derivados de las xantinas, los cuales fueron propuestos por Mo X en 2012⁴⁹. De este modo se preparó una solución de teofilina en metanol a una concentración de 10 ng/ml. Al evaluar esta sustancia en nuestro sistema cromatográfico se detectó una señal a los 7.6 min, que se asignó a teofilina 10 ng/ml; mientras que MTX 150 ng/ml tuvo un TR de 14.1 minutos (Figura 19).

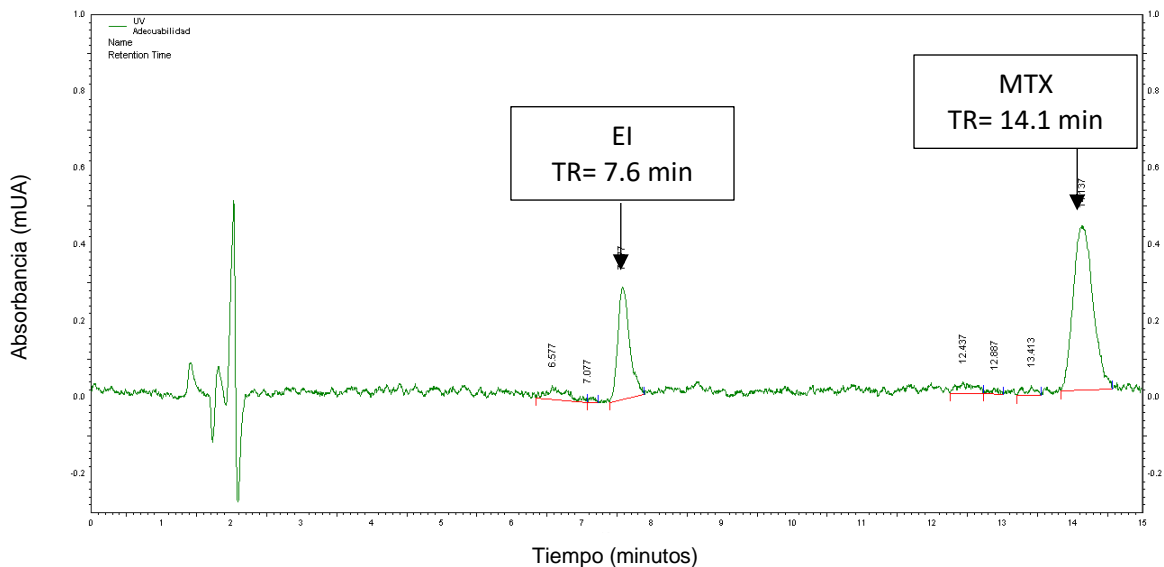
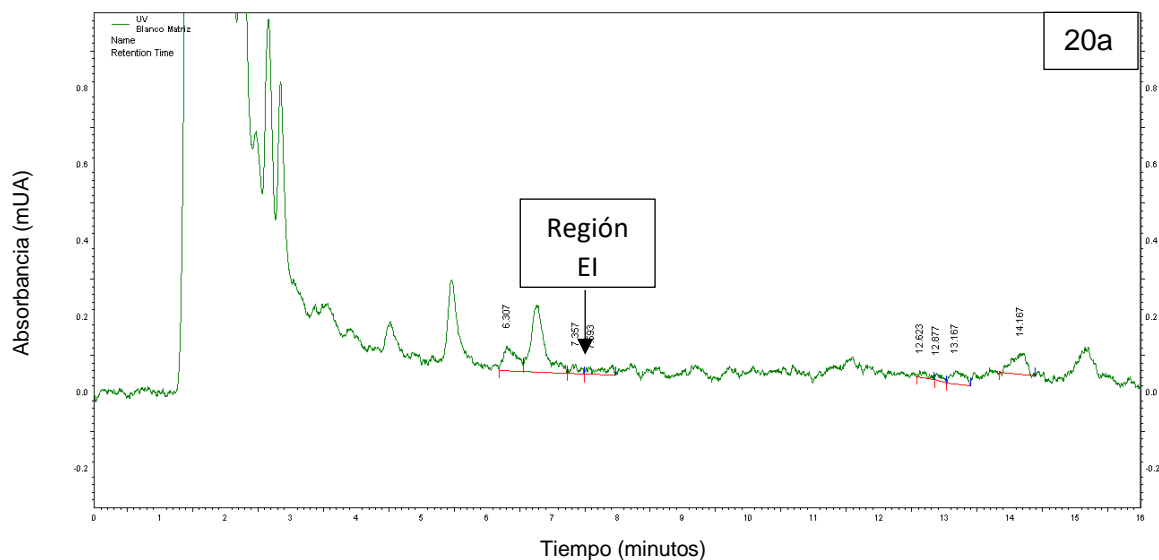


Figura 19. Detección de teofilina 10 ng/ml (7.6 min) y MTX 150 ng/ml (14.1 min) en citrofosfato pH 6.

Una vez que se comprobó la detección de teofilina bajo las condiciones cromatográficas desarrolladas, se evaluó su comportamiento en la extracción del lisado de eritrocitos por ELL-MCA. En la Figura 20 se muestra el cromatograma del blanco de lisado de eritrocitos y las extracciones a niveles de MTX bajo (50 ng/ml), medio (125 ng/ml) y alto (200 ng/ml), donde se distingue la señal de teofilina sin interferencias. Así mismo se obtuvo el porcentaje de recobro a cada nivel, siendo superior al 50% (Tabla 6).



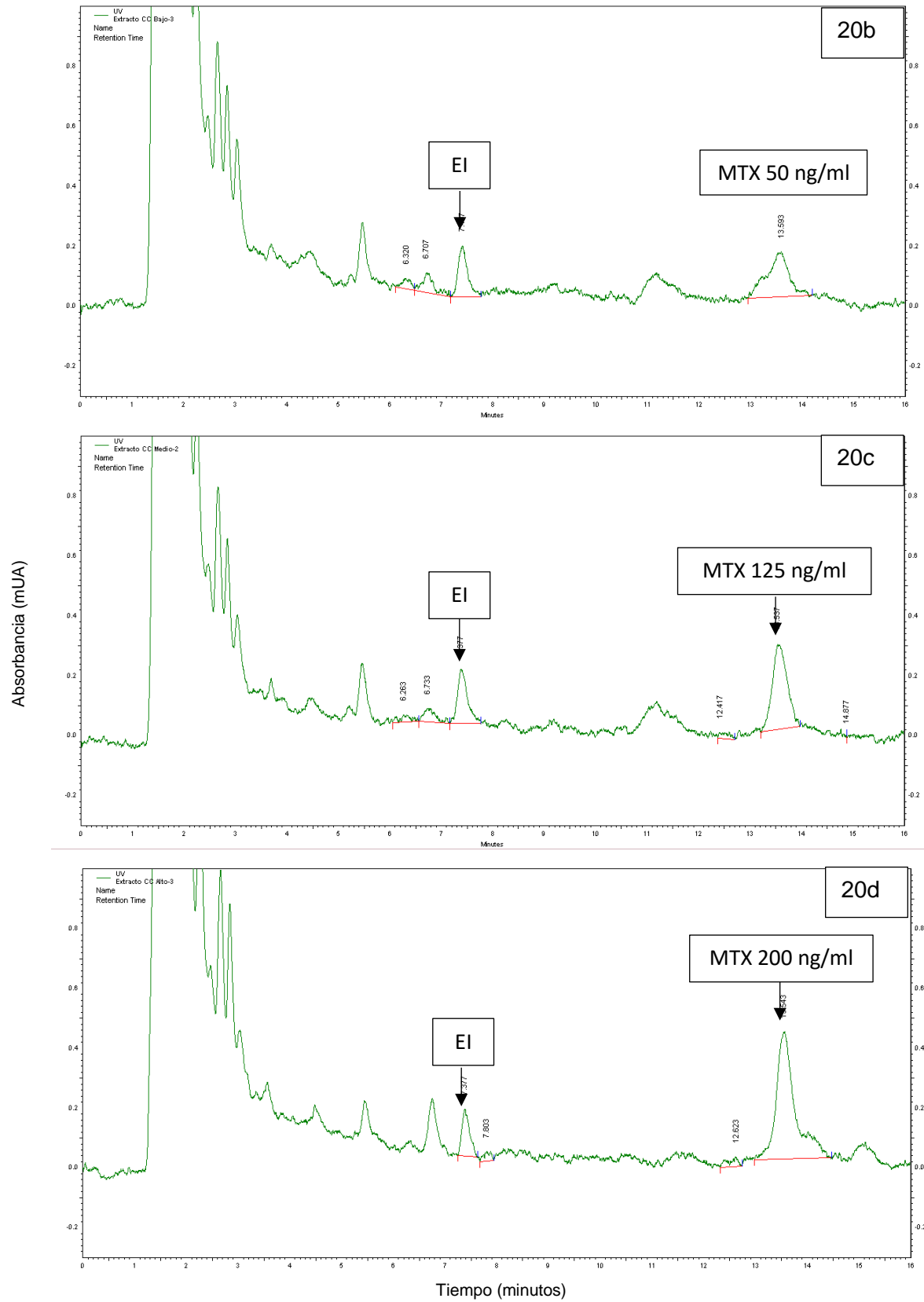


Figura 20. Extracción de EI (teofilina 10 ng/ml) y MTX de lisado de eritrocitos. a) Blanco de lisado de eritrocitos, b) Extracción nivel bajo (MTX 50 ng/ml), c) Extracción nivel medio (MTX 125 ng/ml) y d) Extracción nivel alto (MTX 200 ng/ml).

Tabla 6. Porcentaje de recobro de la extracción de teofilina del lisado de eritrocitos.

Nivel	Recobro (%)
Bajo	71.24
Medio	78.56
Alto	51.42

De este modo se consideró el uso de teofilina 10 ng/ml como estándar interno en la validación del método bioanalítico.

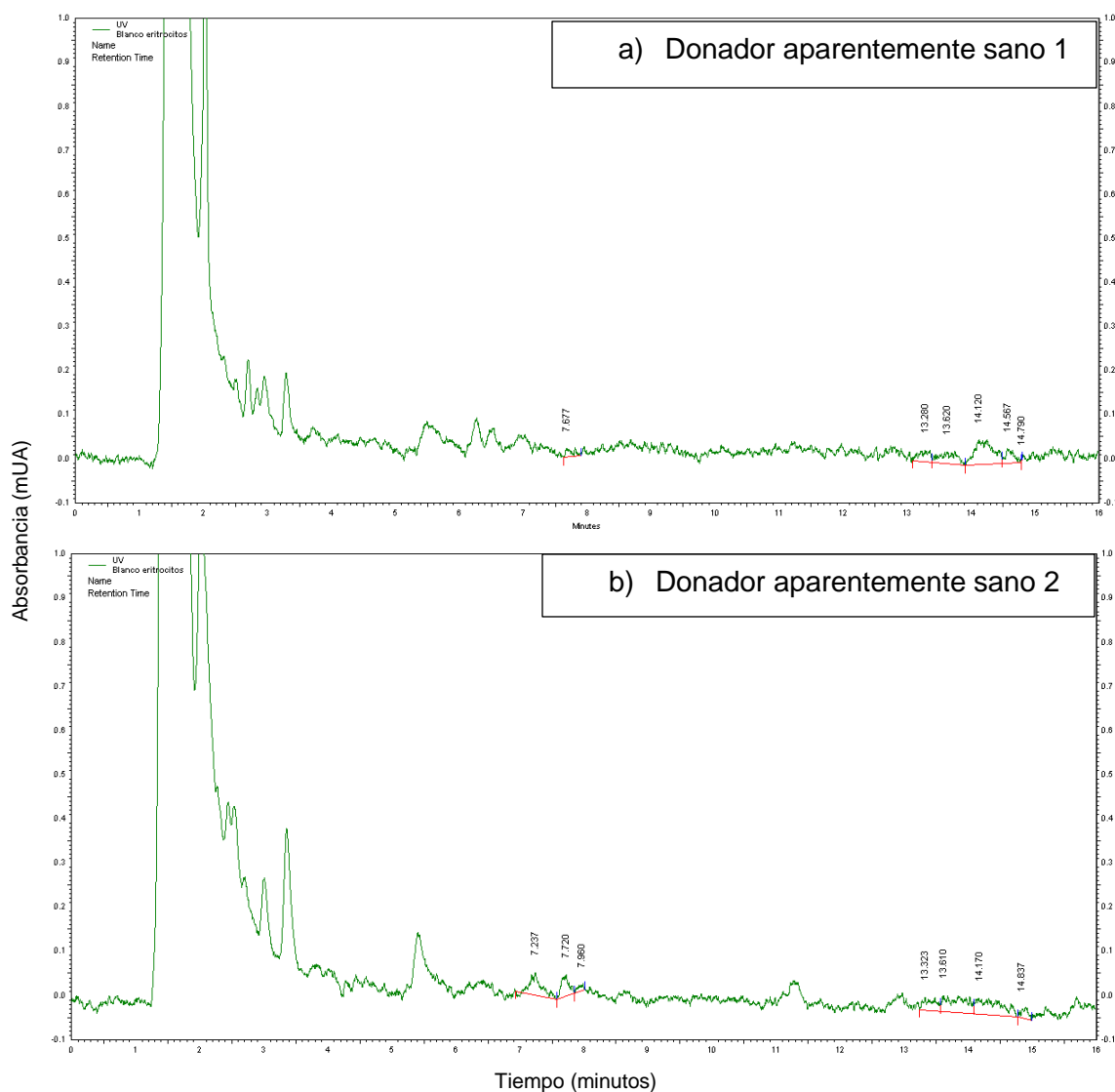
8.2 Validación de método bioanalítico

8.2.1. Selectividad/Especificidad

En la prueba de selectividad se evalúa la capacidad del método para determinar MTX en el lisado de eritrocitos sin interferencias de los componentes de la matriz. Para ello la *Guía de validación de métodos bioanalíticos*, publicada por la FDA en 2018, propone la evaluación de blancos de la matriz biológica de al menos seis individuos; en los que se espera la ausencia de interferencias en los tiempos de retención de los analitos evaluados. Aquí para poder afirmar que no hay interferencias de matriz se permite una respuesta <5% para el estándar interno y <20% para el analito de interés, respecto a la respuesta observada en muestras adicionadas a una concentración equivalente al límite de cuantificación.

En la evaluación de selectividad (Figura 21) se obtuvo un tiempo de retención (TR) de 7.36 ± 0.04 min para el EI (teofilina) y de 13.93 ± 0.36 min para MTX. En el análisis de blancos de lisado de eritrocitos de donadores aparentemente sanos se detectó señal en el tiempo de retención del EI, únicamente en la muestra del donante cinco (Figura 21e). Al comparar la intensidad de la señal detectada con el límite de cuantificación se obtuvo una respuesta equivalente al 20.12% para el EI, siendo superior al 5% permitido por la guía; sin embargo, es importante recalcar que la señal sólo fue detectada en una de las cinco muestras analizadas. Respecto a los demás blancos analizados, en las muestras de los donantes 2 y 4 se detectaron señales cercanas al tiempo de retención del EI, que resultan

de interés pues podrían solaparse con éste, aunque no se consideran como interferencias. En el caso de MTX se detectaron señales en tres de las cinco muestras evaluadas (Figura 21a, b y d), que representan el 12.27%, cumpliendo con el criterio de aceptación (señal observada < 20% de la señal en el límite de cuantificación). Lo anterior nos permite concluir que el lisado de eritrocitos está libre de interferencias en el TR para EI y MTX.



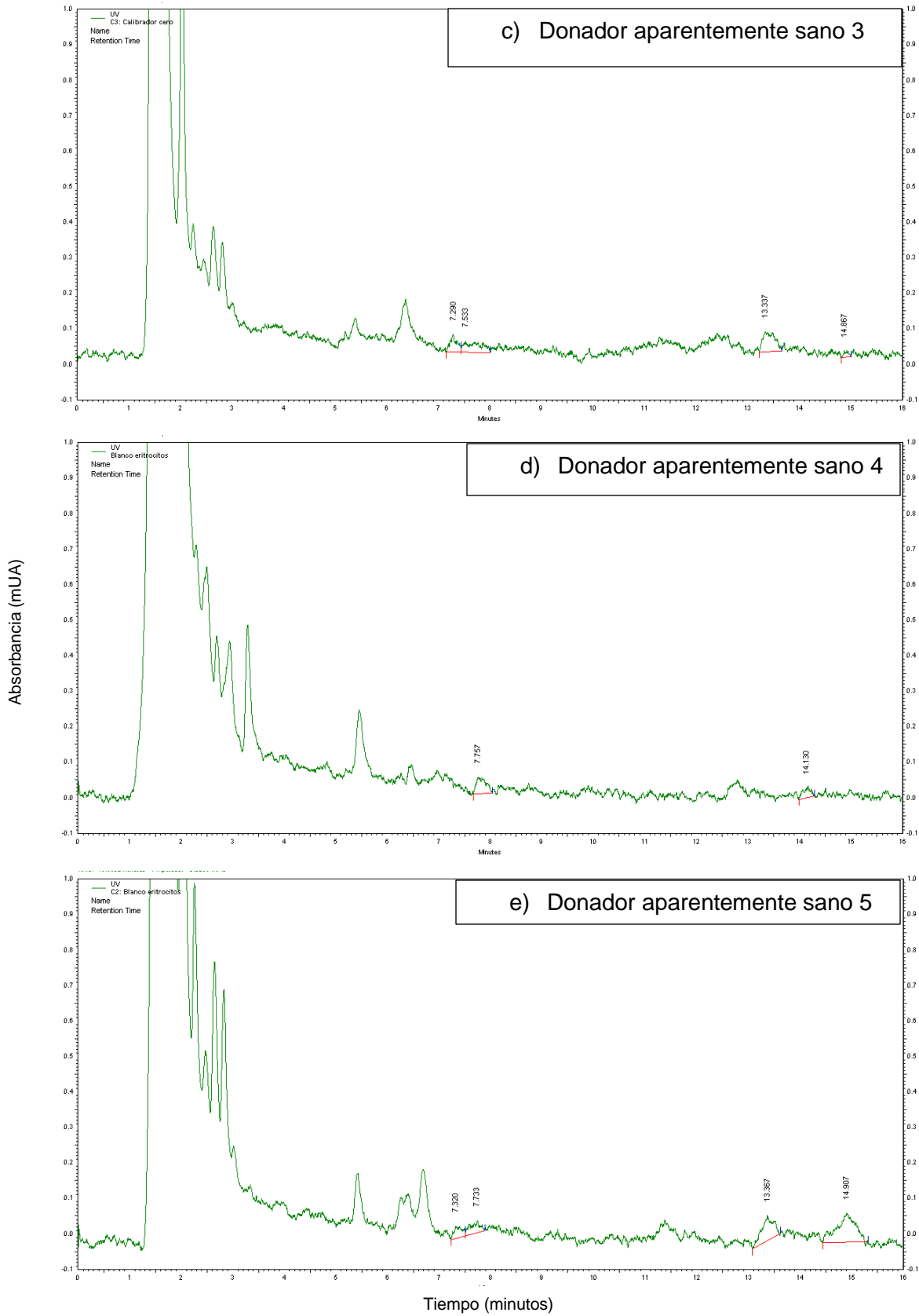


Figura 21. Cromatograma de lisado de eritrocitos de donadores aparentemente sanos. a) Muestra donador sano 1, b) Muestra donador sano 2, c) Muestra donador sano 3, d) Muestra donador sano 4 y e) Muestra donador sano 5.

Respecto a la especificidad se evaluó la capacidad del método para detectar MTX en presencia de ácido fólico, molécula estructuralmente similar y administrada de manera concomitante en el tratamiento de la AR. Como criterio de aceptación, la guía de validación propone que la señal observada para la medicación concomitante no interfiera con la señal del analito de interés.

En la Figura 22a se muestra el cromatograma de la evaluación del sistema, donde se obtuvo un TR de 2.4 min para ácido fólico, 7.7 minutos para teofilina y 15 min para MTX. En la Figura 22b se muestra el cromatograma de un blanco de lisado de eritrocitos de un donante voluntario sano, en la cual no se observan señales en los tiempos de retención del EI ni de MTX. Al evaluar la extracción de los analitos de una muestra de lisado de eritrocitos, mediante una ELL-MCA, se obtuvo un TR de 2.4 para ácido fólico (señal que se encuentra solapada con interferencias no caracterizadas), 7.7 minutos para teofilina y 15 min para MTX (Figura 22c).

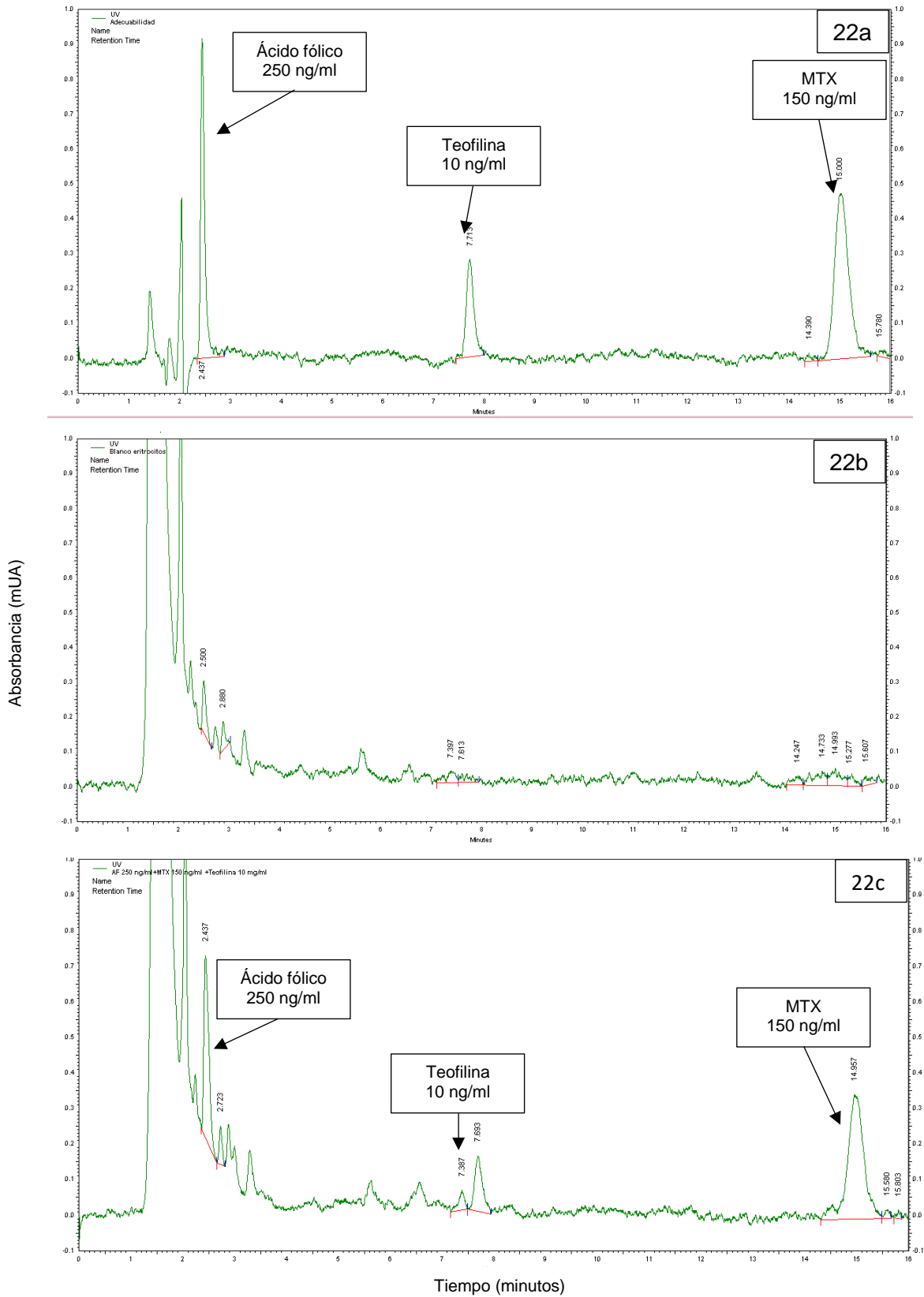


Figura 22. Evaluación de especificidad. a) Lisado se eritrocitos de donador sanos b) AF, EI, MTX en citrofosfato y c) AF, EI y MTX extraído de un lisado de eritrocitos de donador sano.

8.2.2 Curva de calibración

Con la curva de calibración se confirmó la existencia de una correlación lineal entre la concentración de MTX (en un rango de 25-225 ng/ml) y la respuesta del instrumento. Primero se evaluó la correlación considerando como respuesta la relación Área MTX/Área de EI y después se evaluó la relación de Altura MTX/Altura EI. Los resultados se muestran en la Tabla 7. Como podemos apreciar, los niveles más altos de correlación se dieron en las curvas 2 y 3 de la relación de Altura MTX/Altura EI.

Tabla 7. Evaluación de la correlación entre concentración de MTX y relación respuesta MTX/EI.

		Relación Área			Relación altura		
CALIBRADOR	MTX (ng/ml)	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3
UNO	25	0.5132	0.7198	0.7936	0.3729	0.4777	0.4734
DOS	75	1.3765	1.6422	1.4475	0.7800	1.1278	0.9574
TRES	100	1.8704	2.2686	2.4869	1.0564	1.3359	1.4535
CUATRO	150	2.1274	3.3248	3.8808	1.4673	2.1495	2.2656
CINCO	175	2.1337	4.3874	5.2841	1.2818	2.7536	2.8336
SEIS	225	3.6815	6.2149	5.9381	2.2734	3.7141	3.4394
	m	0.0138	0.0272	0.0282	0.0086	0.0162	0.0156
	b	0.2309	-0.3031	-0.2240	0.1319	-0.0986	-0.0519
	r	0.9536	0.9869	0.9841	0.9575	0.9910	0.9945

m: pendiente, b: intercepto, r: coeficiente de correlación.

Con la finalidad de determinar qué analito tiene mayor influencia en la disminución del coeficiente de correlación, se evaluó la correlación entre la concentración y la respuesta absoluta de MTX, los resultados se muestran en la Tabla 8. Aquí vemos que tanto en área como en altura de MTX existe una correlación lineal respecto a la concentración de MTX. Lo anterior nos lleva a suponer que la respuesta del EI es la causa de la disminución en la relación, de tal modo que se evaluó la respuesta absoluta del EI. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 9, donde se aprecian coeficientes de variación que van de 12 al 23% para el área del EI y del 10 al 21% para la altura del EI. Debido a la alta variabilidad observada en la respuesta del EI, se propuso emplear como respuesta del instrumento, el área de los picos correspondientes a la respuesta absoluta de MTX.

Tabla 8. Evaluación de la correlación entre concentración de MTX y respuesta absoluta de MTX.

		Respuesta absoluta: Área MTX			Respuesta absoluta: Altura MTX		
CALIBRADOR	MTX (ng/ml)	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3
UNO	25	4227	4167	5921	283	279	294
DOS	75	12123	12031	11503	656	768	674
TRES	100	17541	17820	18194	956	1046	1016
CUATRO	150	25235	27799	26145	1501	1653	1527
CINCO	175	33326	30567	32270	1792	1732	1873
SEIS	225	39742	42143	43241	2137	2351	2497
	m	183.0095	189.4810	189.3000	9.7457	10.3076	11.1629
	b	-843.8571	-1263.9524	-783.5000	2.6190	16.3810	-81.8571
	r	0.9957	0.9978	0.9938	0.9961	0.9970	0.9962

m: pendiente, b: intercepto, r: coeficiente de correlación.

Tabla 9. Evaluación de la respuesta absoluta del EI.

		Respuesta absoluta: Área EI			Respuesta absoluta: Altura EI		
CALIBRADOR	MTX (ng/ml)	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3
UNO	25	8236	5789	7461	759	584	621
DOS	75	8807	7326	7947	841	681	704
TRES	100	9378	7855	7316	905	783	699
CUATRO	150	11862	8361	6737	1023	769	674
CINCO	175	15619	6967	6107	1398	629	661
SEIS	225	10795	6781	7282	940	633	726
	Media	10757.29	7089.43	6760.00	971.43	681.71	651.00
	DE	2481.41	851.90	1165.69	205.57	73.83	85.93
	CV (%)	23.07	12.02	17.24	21.16	10.83	13.20

CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación, EI: Estándar Interno

8.2.3. Exactitud

La exactitud se define como el grado de proximidad del valor observado respecto al valor nominal. Para su evaluación se prepararon 5 réplicas por cada nivel de control de calidad. Se consideró aceptable un coeficiente de variación (CV) $\leq 15\%$ para los niveles bajo, medio y alto; así como un CV $\leq 20\%$ para el límite de cuantificación.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la exactitud (considerando como respuesta el área de MTX), se muestran en la Tabla 10, donde se obtuvo un coeficiente de

variación de 36.15% para una concentración de 25 ng/ml, el cual excede el criterio de aceptación establecido en la guía (<20%). Dado que para los siguientes niveles de concentración evaluados se cumple con el criterio de aceptación, es posible concluir que el método es exacto para cuantificar MTX extraído de lisado de eritrocitos a concentraciones superiores a 50 ng/ml.

Tabla 10. Evaluación de exactitud para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos.

Nivel CC	Concentración (ng/ml)	Media ± DE (ng/ml)	CV (%)	CA (vs CV)	Resultado
LC	25	23.13± 8.36	36.15	<20%	No cumple
Bajo	50	41.04 ± 3.30	8.04	<15%	Cumple
Medio	125	114.71±10.86	9.46	<15%	Cumple
Alto	200	179.94±25.66	14.26	<15%	Cumple

CA: Criterio de aceptación, CC: Control de calidad, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, LC: Límite de cuantificación, n=5

8.2.4. Precisión

La precisión se define como el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples. Para su evaluación se preparan cuatro niveles de concentración, con cinco réplicas por cada nivel, durante tres días diferentes. Como criterio de aceptación se admite un coeficiente de variación (CV) ≤ 15% para los niveles bajo, medio y alto; así como un CV ≤20% para el límite de cuantificación.

Los resultados obtenidos para la evaluación de la precisión (considerando como respuesta el área de MTX), se muestran en la Tabla 11. Como se aprecia el criterio de aceptación se cumple para los niveles medio y alto, pero no se cumplió a concentraciones bajas (25 y 50 ng/ml). De estos resultados se puede concluir que el método es preciso para cuantificar MTX de lisado de eritrocitos a concentraciones superiores a 125 ng/ml.

Tabla 11. Evaluación de precisión para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos.

Nivel CC	Concentración (ng/ml)	Media ± DE (ng/ml)	CV (%)	CA	Resultados
LC	25	33.05±9.93	30.05	<20%	No cumple
Bajo	50	45.48±19.21	45.24	<15%	No cumple
Medio	125	124.87±14.69	11.76	<15%	Cumple
Alto	200	197.50±27.08	13.71	<15%	Cumple

CA: Criterio de aceptación, CC: Control de calidad, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, LC: Límite de cuantificación, n=15

8.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad permite determinar la concentración de analito más baja que se puede cuantificar en la matriz, con exactitud y precisión aceptable. Es por ello por lo que su valor debe comprobarse experimentalmente, mediante la evaluación de cinco réplicas en al menos tres corridas; teniendo un CV $\leq 20\%$. De acuerdo con los resultados obtenidos en las evaluaciones de precisión y exactitud, se estableció como límite de cuantificación 125 ng/ml.

En adición, con el objetivo de tener una mejor caracterización del método, se determinó el límite de detección basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de linealidad, de acuerdo con las recomendaciones de la guía ICH Q2(R1), 2005. Al aplicar la ecuación correspondiente: $LD=3.3 (\sigma)/S$, donde σ es la desviación estándar de la respuesta (área de MTX) y S es la pendiente de la curva de calibración.

Se obtuvo que:

$$LD = 3.3 (261.72) / 187.26 = 4.61$$

Por lo que se determinó un límite de detección teórico de 4.61 ng/ml.

8.2.6. Recobro

El recobro se refiere a la eficiencia en el proceso de extracción de MTX del lisado de eritrocitos. Aquí se aplica el proceso de extracción a blancos adicionados a tres niveles de concentración y se compara el porcentaje de MTX recuperado respecto a blancos adicionados después de la extracción. El porcentaje de recobro no será del 100%, pero se espera que sea reproducible en cada nivel.

Respecto a la evaluación del recobro, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12, donde se aprecia un recobro superior entre 67 y 87%. A diferencia de otros parámetros evaluados, aquí la variación parece no ser un factor atribuible a la concentración del analito en evaluación, sino potencialmente asociado a aspectos de la técnica, como se discutirá en la sección Discusión de resultados.

Tabla 12. Evaluación de recobro para la determinación de MTX en eritrocitos.

Nivel CC	Concentración (ng/ml)	% de recuperación ± DE	CV (%)
Bajo	50	87.06±10.7	12.29
Medio	125	72.73±12.80	17.60
Alto	200	67.77±9.65	14.24

CA: Criterio de aceptación, CC: Control de calidad, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, LC: Límite de cuantificación, n=6

8.2.7. Estabilidad

La estabilidad es una medida de la integridad del analito bajo condiciones específicas de almacenamiento para intervalos de tiempo dados. Se analizan tres niveles de control de calidad y se acepta un CV ≤ 15%.

Finalmente, los resultados del análisis de la estabilidad se muestran en la Tabla 13, donde se observa que MTX es estable a concentraciones de 200 ng/ml almacenados a -20°C por 30 días.

Tabla 13. Evaluación de estabilidad para la determinación de MTX en lisado de eritrocitos almacenados a -20°C por 30 días.

Nivel CC	Concentración (ng/ml)	Día 0 (n=6)		Día 30 (n=6)		CA	Resultado
		Media ± DE (ng/ml)	CV (%)	Media ±DE (ng/ml)	CV (%)		
Bajo	50	59.57 ± 24	40.28	72.34 ± 19.94	27.56	± 15%	No cumple
Medio	125	132.46 ± 14.01	10.57	110.93± 42.84	36.82	± 15%	No cumple
Alto	200	218.10 ± 23.54	10.79	215.12 ± 19.99	9.22	± 15%	Cumple

CA: Criterio de aceptación, CC: Control de calidad, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar

A manera de resumen, en la Tabla 14, se muestran los resultados de la validación del método bioanalítico. Se destaca la identificación y diferenciación inequívoca de MTX y ácido fólico, moléculas semejantes estructuralmente y administradas de manera conjunta en el tratamiento de la AR. Así mismo, aunque teóricamente, el método desarrollado permite la detección de MTX a concentraciones superiores a los 5 ng/ml, la cuantificación es posible a partir de los 125 ng/ml.

Tabla 14. Resultados de la validación del método bioanalítico

PARÁMETRO	RESULTADO
1a. Selectividad	Detección de MTX libre de interferencias de matriz. Detección de EI (Teofilina) con interferencias en 1/5 de muestras evaluadas.
1b. Especificidad	Detección de MTX y EI (Teofilina) sin interferencias con ácido fólico
2. Curva de calibración	Ajuste lineal ($r > 0.99$) de 25-225 ng/ml empleando respuesta absoluta de área de MTX
3. Sensibilidad	125 ng/ml
4. Límite de detección (Teórico)	4.61 ng/ml
5. Exactitud	>50 ng/ml

6. Precisión	>125 ng/ml
7. Recobro	>67%
8. Estabilidad	200 ng/ml bajo almacenamiento a -20°C por 30 días.

8.3 Evaluación de muestras de pacientes con AR

Para verificar que el sistema de medición funcionaba adecuadamente se evaluó la adecuabilidad del sistema, los datos obtenidos se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados prueba de adecuabilidad del sistema.

COMPUESTO	METOTREXATO		
	PARÁMETRO	TR (min)	Área
MEDIA	14.73	33056.20	1780.20
DE	0.02	592.91	16.80
CV (%)	0.10	1.79	0.94
CA	<2%		
RESULTADO	Aprobado	Aprobado	Aprobado

CA: Criterio de aceptación, CV: Coeficiente de variación, DE: Desviación estándar, TR: Tiempo de retención.

Para la evaluación de muestras primero se corroboró la correlación lineal entre la concentración de MTX (de 50-225 ng/ml) y el área de MTX, obteniendo una $r > 0.99$, con una $p < 0.01$ (ver Tabla 16). A partir de estos datos aplicó el modelo de regresión lineal para generar una ecuación ($y = 156.87x + 4372.7$; $R^2 = 0.9892$) que permitiera calcular la concentración de MTX en las muestras analizadas.

Tabla 16. Correlación entre concentración y área de MTX *

		Área MTX
[MTX]	Correlación de Pearson	.995**
	Sig. (bilateral)	.000

*. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

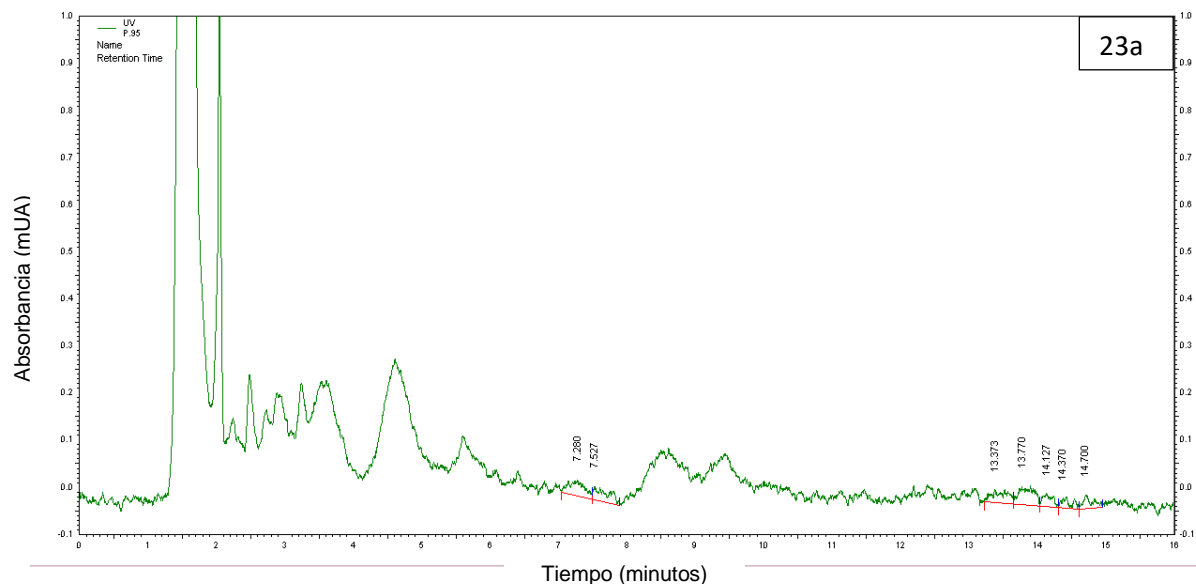
Como parte del control de calidad del análisis de muestras, se evaluaron por duplicado controles a niveles bajo, medio y alto. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17. Como se puede observar se cumplen con los criterios de aceptación, lo que permitió proseguir con la evaluación de las muestras.

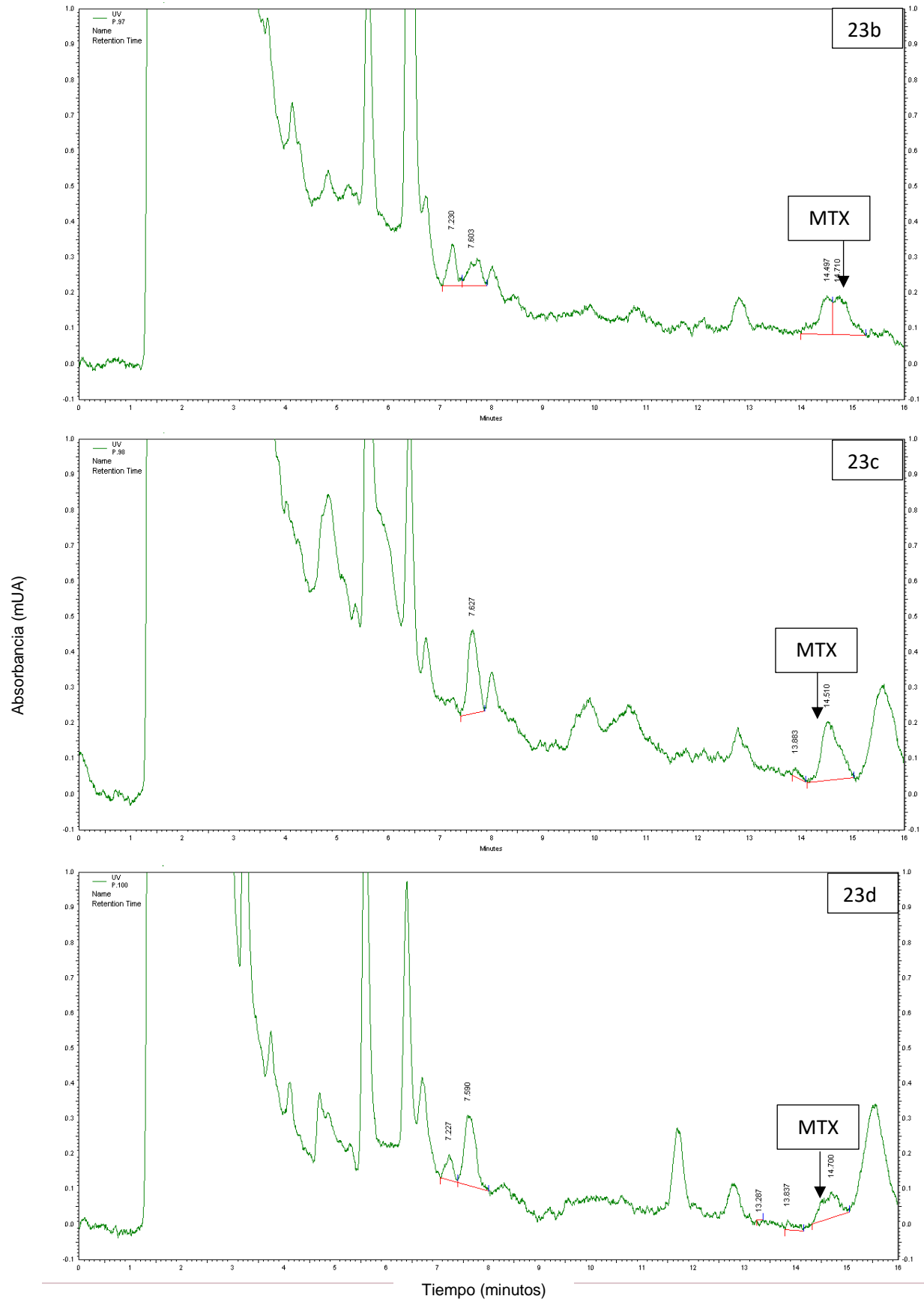
Tabla 17. Evaluación de los controles de calidad (CC), (n=2)

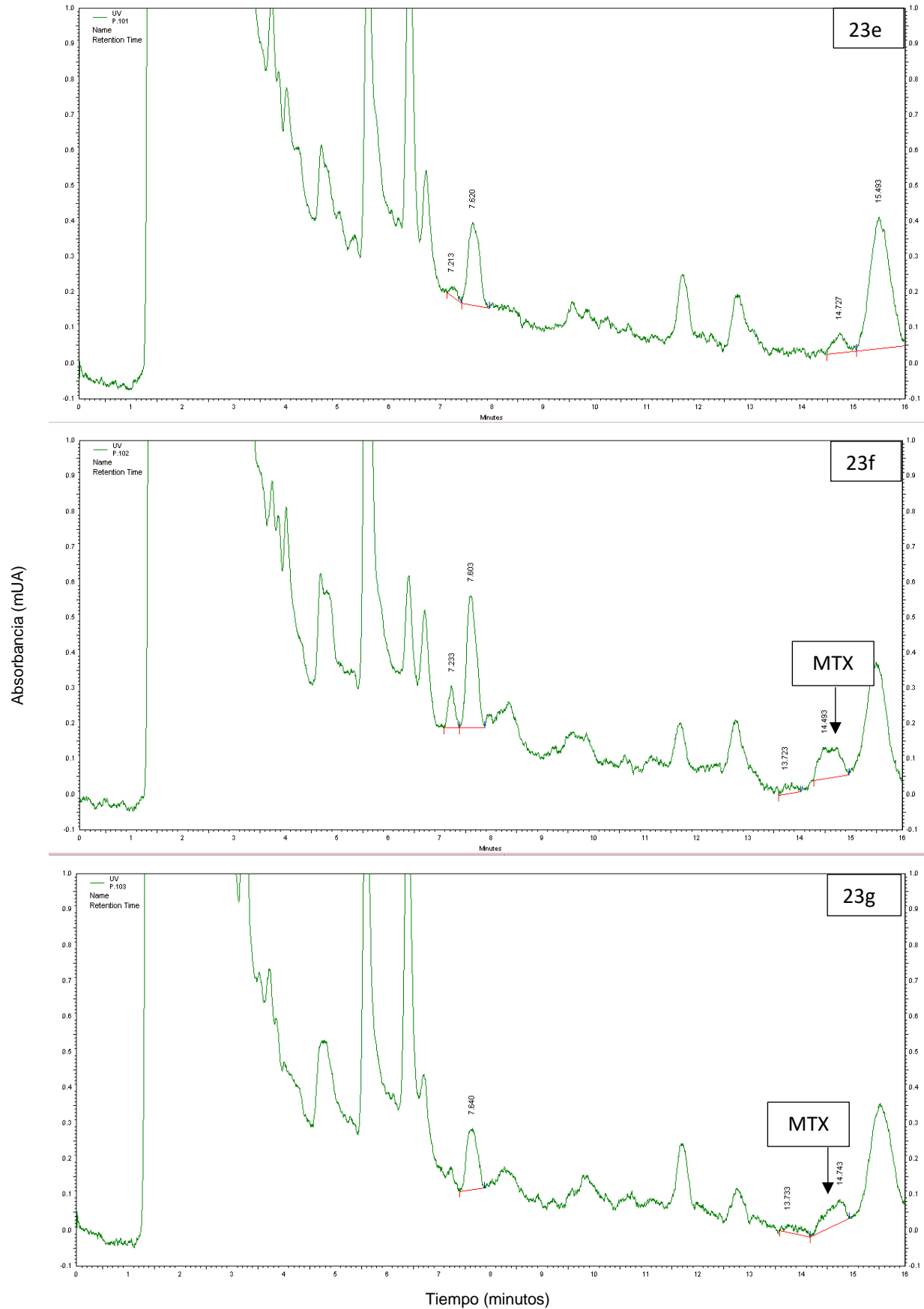
NIVEL	Concentración nominal (ng/ml)	Concentración Recuperada (ng/ml)	Rango de variación (ng/ml)	Criterio 1	Criterio 2
Bajo	50	43.45	42.5-57.5	Cumple	Cumple
	50	43.08			
Medio	125	121.21	106.25-143.75		Cumple
	125	122.90			
Alto	200	264.76	170-230		Cumple
	200	253.17			

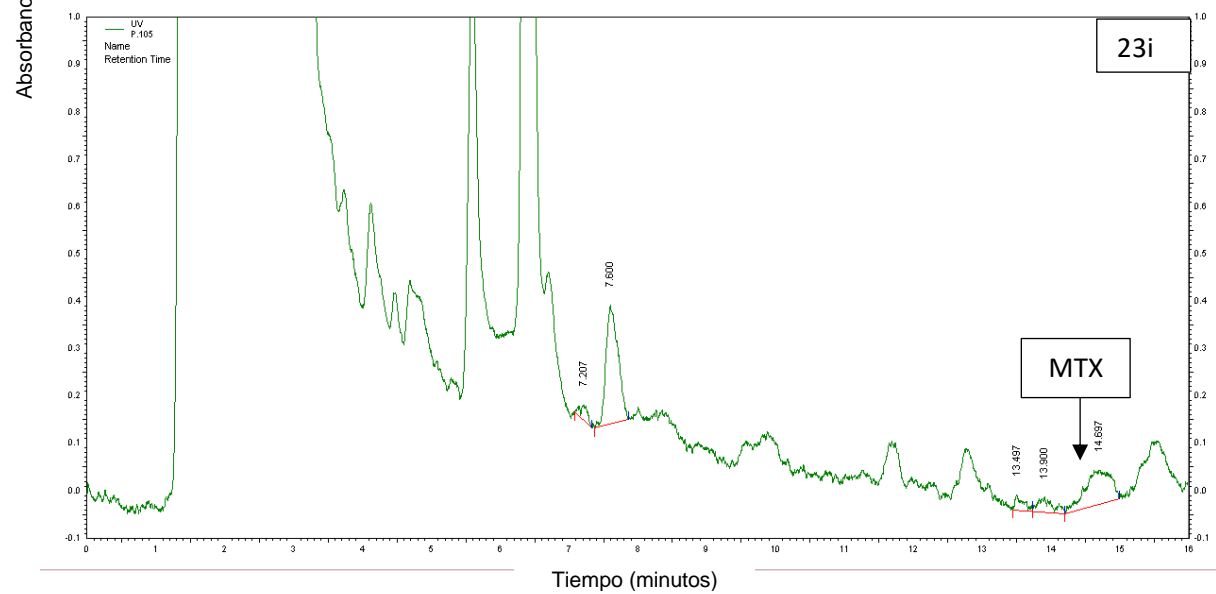
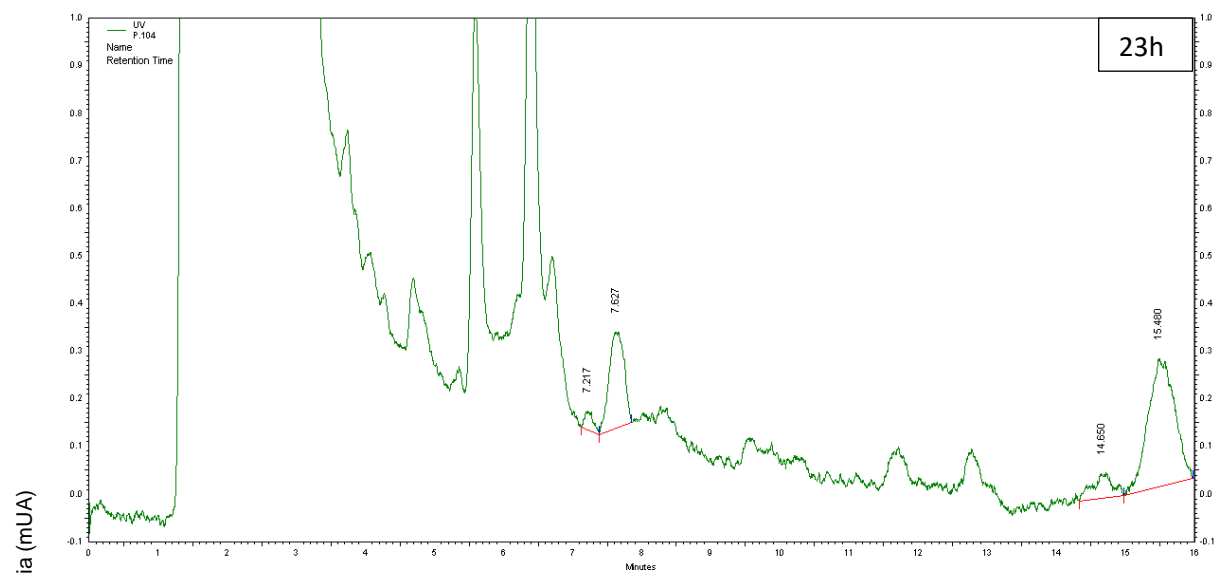
Criterios de aceptación: 1. $\geq 67\%$ de los CC debe ser $\pm 15\%$ del nominal. 2. $\geq 50\%$ de los CC por nivel debe ser $\pm 15\%$ de su nominal.

A continuación, se muestran los cromatogramas de las muestras de pacientes analizadas (Figura 23). De acuerdo con la prueba de adecuabilidad, el pico de MTX fue detectado a los 14.7 minutos, bajo esta consideración se detectó una señal a este tiempo en nueve de las diez muestras analizadas (Figura 23b-j).









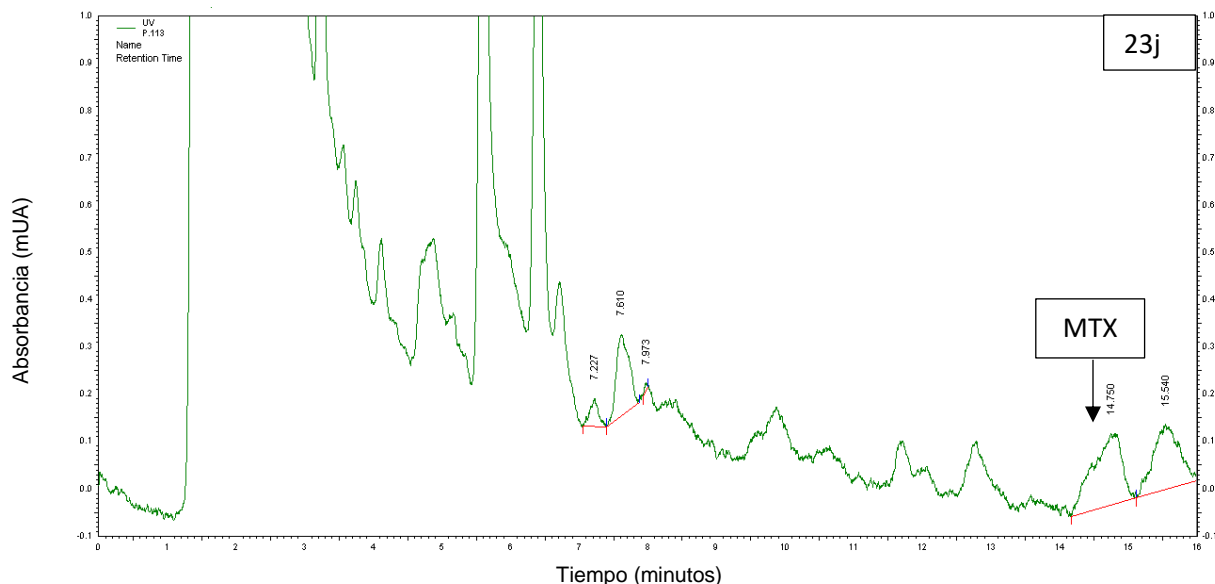


Figura 23. Cromatogramas de pacientes con AR. Se detecta MTX en nueve de diez muestras (Figuras 23 b-d, f, g, i y j), en una muestra no se detecta señal (Figura 23a) y en dos muestras hay una señal por debajo del límite de detección de MTX (Figure 23e y h).

La señal obtenida fue interpolada en la curva de calibración para determinar la concentración de MTX presente en la muestra; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18. Como se aprecia, se detectó MTX en siete de las diez muestras evaluadas; sin embargo, en todas ellas la concentración recuperada estuvo por debajo del límite de cuantificación.

Tabla 18. Evaluación de extracción de MTX en muestras de eritrocitos de pacientes con AR.

Paciente	MTX recuperado (ng/ml)	Resultado
P.95	Sin señal	Sin detección de señal
P.97	29.33	Detección de MTX, <LC
P.98	74.08	Detección de MTX, <LC
P.100	14.41	Detección de MTX, <LC
P. 101	ND	Sin detección de MTX
P.102	33.38	Detección de MTX, <LC
P.103	15.96	Detección de MTX, <LC
P.104	ND	Sin detección de MTX
P.105	21.36	Detección de MTX, <LC
P.113	87.17	Detección de MTX, <LC

ND: No detectado, LC: límite de cuantificación

9. DISCUSIÓN

9.1 Desarrollo de método bioanalítico

En la fase de planeación del proyecto, se propuso el desarrollo de un método bioanalítico que permitiera la cuantificación de las formas poliglutaminadas de MTX (MTX-PG₂₋₇), ya que se considera que estas moléculas son las especies activas del MTX en el tratamiento de la AR. Sin embargo, entre varios factores vinculados a la contingencia sanitaria derivada del virus SARS-CoV-2, los estándares comerciales de MTX-PG₂₋₇ no pudieron adquirirse comercialmente. Como alternativa a ello se evaluó la generación *in vitro* empleando como modelo celular a la línea THP-1 diferenciada a macrófagos mediante PMA. Bajo las condiciones evaluadas, únicamente se detectó la presencia de MTX, pero no fue posible la obtención de sus metabolitos. Aunque también se consideró la generación a través de la síntesis química, el tiempo y las condiciones de trabajo dificultaron el desarrollo de esta opción. Es por ello por lo que, finalmente, el proyecto se enfocó en desarrollar un método bioanalítico para la cuantificación de MTX en eritrocitos y se evaluó su aplicación en muestras de pacientes con AR.

9.1.1 Desarrollo y optimización de condiciones cromatográficas

Durante el desarrollo del método cromatográfico para la detección de MTX, se evaluó la composición de la fase móvil, encontrando que la regulación del pH es un factor clave para favorecer la interacción de MTX con la fase móvil. Con base en los resultados observados al evaluar Agua: ACN como fase móvil, se pudo suponer la existencia de una fuerte interacción entre MTX y la fase estacionaria. Considerando la disociación de MTX en solución acuosa (Figura 2), a pH 6 el compuesto existirá como un conjugado con carga negativa, pues a este valor los grupos α - y γ -carboxilato, así como el átomo N1 del anillo de pteridina se encuentran mayormente ionizados; lo que permitiría explicar el incremento en la interacción de MTX con la fase móvil. Así mismo, la selección de este valor de pH estuvo fundamentada en lo reportado por Rubino FM en 2001, quien mencionó que la absorbancia del cróforo pteridina incrementa al acercarse más a un pH neutro y se reduce en un factor de 2 en pH ácido⁵⁷ y concuerda con nuestras observaciones de señales de absorción débiles al evaluar Agua: ACN, que se incrementaron al regular el pH a 6 (Figuras 7-10). Otro elemento importante en la composición de la fase móvil es la polaridad, donde su disminución, proporcionada por el incremento en la concentración de acetonitrilo disminuye el tiempo de retención de MTX. Una conducta semejante fue reportada por Wu y

colaboradores en 2021⁴⁶, quienes observaron que la disminución en la polaridad de la fase móvil, al incrementar el componente orgánico (en su caso metanol), también ocasionaba una disminución en el tiempo de retención y aumentaba la resolución de MTX.

Por su parte, la evaluación del incremento en la carga de carbono (de un 15 a un 18%) en la fase estacionaria, permitió mejorar la resolución del pico. Dado que se sabe que, en fase reversa, el incremento en el porcentaje de carbono presente en la superficie de la sílice de la columna proporciona una superficie más hidrofóbica³⁰, se considera posible que el favorecimiento de las interacciones hidrofóbicas entre MTX y la fase estacionaria, de algún modo, ayudaran a mejorar la forma del pico.

Con respecto al sistema de detección empleado, se optó por evaluar el uso de un detector ultravioleta (UV) debido a tres razones. Primero, a pesar de que existen otros detectores con mayor sensibilidad (EM y fluorescencia), su empleo requiere el uso de estándares internos marcados con isótopos estables o de la extracción en fase sólida (para EM), así como aditamentos adicionales para la derivatización (caso del detector de fluorescencia); lo que incrementa el costo del análisis y a su vez compromete el desarrollo de la metodología de manera rutinaria en la práctica clínica. Segundo, MTX es una molécula que posee un anillo de pteridina en su estructura, el cual es responsable de la absorción UV. Tercero, en un artículo de revisión se reportó un límite de detección para MTX entre 20-200 nM para muestras biológicas⁵⁷. Así mismo, recientemente se publicó un artículo que emplea HPLC-UV para cuantificar MTX con un límite de cuantificación de 50 ng/ml⁶¹. En ambos casos la identificación de MTX se dio dentro del rango establecido para las concentraciones reportadas de MTX en eritrocitos, *Tabla 1* (0-50 ng/ml). De este modo se consideró posible el uso de un detector UV.

La longitud de onda se seleccionó con base en el método farmacopeico para la cuantificación de MTX en tabletas (302 nm)⁶³. Se encontró que el uso de un detector UV-longitud de onda variable en comparación con un detector UV-arreglo de diodos, favorece la sensibilidad al detectar MTX. Sin embargo, se observaron diferencias en el tiempo de retención de MTX. Además del equipo, el análisis se realizó en días diferentes, lo que influyó en el uso de diferentes preparaciones de fase móvil. A pesar de ello, el procedimiento de preparación, reactivos e instrumental empleado para la preparación de la FM fue el mismo. Dado que las demás condiciones se mantuvieron igual entre ambos análisis, se considera que únicamente el cambio de equipo es la causa de esta variación.

9.1.2 Selección del estándar interno

Especial atención merece la selección del estándar interno, debido a que no se consideró la semejanza estructural respecto a la molécula de MTX como criterio principal para su elección. Esto repercute al no ser de utilidad para reflejar la efectividad del proceso de extracción del analito de interés, aunque sí permite evaluar errores asociados a la inyección³². Cabe mencionar que, por otro lado, si se consideraron otros criterios para seleccionar el estándar interno del método bioanalítico, tales como la ausencia de la molécula en la muestra biológica y la detección bajo las condiciones cromatográficas desarrolladas.

Otro aspecto que se consideró en la selección del EI fue mantener un factor de selectividad (α)>1 entre los tiempos de retención para el EI y el MTX, de manera tal que se permitiera la posible evaluación de las formas poliglutaminadas del fármaco. En concordancia con el modo de separación (FR), era lógico considerar que la adición de residuos de ácido glutámico al MTX incrementaría los grupos ionizables a pH 6.0 y, por lo tanto, incrementaría la polaridad de los metabolitos; por lo que se esperaba que redujera el tiempo de retención, con respecto a la forma basal del MTX.

9.1.3 Extracción de MTX de lisado de eritrocitos

Referente al proceso de extracción de MTX a partir del lisado de eritrocitos, se planteó como primera opción una extracción en fase sólida, con la finalidad de tener una muestra más limpia y concentrada, ventajas observadas en el análisis de muestras biológicas donde la matriz es suero o plasma⁵⁸; sin embargo, en la evaluación experimental no se logró que la muestra fluyera por el sorbente desde la etapa de carga. Entre los estudios desarrollados para la cuantificación de MTX en eritrocitos, referidos en la *Tabla 3. Metodologías para la cuantificación de MTX-PG en sangre*, únicamente van Haandel, en 2009, reportó el uso de un método donde como pretratamiento de la muestra se realiza una hemólisis con agua, seguida de una precipitación de proteínas con ácido perclórico al 70% y una EFS; pero no se menciona algún problema semejante al nuestro. Buscando en la literatura especializada, se encontró un estudio publicado por Parent y colaboradores, en 2016, donde desarrollan un método para cuantificar el péptido LR12 en sangre total por CLAR-FR. En este método también se aplica un paso previo de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético al 10% y posteriormente la EFS. Tomando esto en consideración, la diferencia encontrada al desarrollar nuestra técnica de EFS, fue la ausencia del paso

previo de precipitación de proteínas, lo cual pudo haber condicionado la obstrucción de los poros del sorbente empleado (C₁₈). Cabe mencionar que la obstrucción de columnas C₁₈ por muestras de sangre, ha sido reportado previamente por Parent y colaboradores⁶⁴.

Debido a lo anterior se propuso como alternativa la extracción líquido-líquido. Como método de cribado y dado el conocimiento existente en el desarrollo de métodos bioanalíticos en plasma respecto a eritrocitos, se seleccionó el plasma humano como matriz biológica para evaluar el método de extracción que presentara menores interferencias. Con la ELL-AP, únicamente se asegura la precipitación de proteínas y su separación mediante centrifugación; sin embargo, en el sobrenadante pueden quedar una diversidad de sustancias miscibles; lo que explicaría los múltiples picos observados en el blanco. En la ELL-ACN se utiliza ACN como solvente para precipitar proteínas, presentando la ventaja de que MTX es soluble en él, y adicionalmente se adiciona cloroformo, con la intención de disminuir la cantidad de lípidos en la muestra. Aunque el método ha sido utilizado para el monitoreo terapéutico de MTX en plasma⁵⁹ y presenta menores interferencias, los porcentajes de recobro obtenidos y la alta variabilidad condicionan su aplicación en eritrocitos. Finalmente, el método seleccionado ELL-MCA, presenta como ventajas la precipitación de proteínas con metanol y su separación tras un proceso de centrifugado, la extracción de MTX en la fase agua-metanol y la disminución de lípidos en la fase de cloroformo. Con la finalidad de concentrar la cantidad de MTX recuperado, se recurre a un proceso de eliminación del solvente mediante la aplicación de un baño de agua y bajo corriente suave de nitrógeno.

Referente a teofilina, se sabe que es soluble en metanol, cloroformo y agua; por lo que, al aplicar el método de extracción, este analito puede distribuirse a diferentes proporciones en los solventes, lo que podría contribuir a explicar la alta variabilidad observada en el análisis de linealidad durante el estudio de validación.

9.2 Validación de método bioanalítico

La validación de un método bioanalítico demuestra que el método es adecuado para el análisis de las muestras de estudio, ya que permite asegurar la confiabilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos^{33,40}. A pesar de que esta actividad está regulada para sectores como la industria farmacéutica, la situación en entornos clínicos hospitalarios y de investigación parece ser diferente, y aparentemente, aún no es un requisito en los estudios publicados en la literatura especializada. De esa manera, de las 13 referencias

analizadas, sólo en 6 artículos se reporta el uso de una guía para la validación del método bioanalítico, siendo la guía publicada por la FDA la única que se emplea; sin embargo, sólo cinco de los estudios reportan los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros de desempeño sugeridos. En las publicaciones restantes, aunque si bien se hace referencia a parámetros de validación y la metodología empleada para su evaluación, no especifican el documento de referencia ni los criterios de aceptación utilizados. Como se mencionó anteriormente, sólo cinco publicaciones reportan resultados de validación del método bioanalítico, dos de las cuales emplean CLAR con detección por Fluorometría (CLAR-F)^{53,54} y tres de ellas CLAR con detección por espectrometría de masas-ESI (CLAR-EM)^{46,48,49}. Por otra parte, se ha reportado el uso de CLAR con detector UV para la identificación de MTX en muestras biológicas^{57,60}, con un límite de detección de 20 nM aplicando un paso de precipitación de proteínas⁵⁷. Dado que se han observado concentraciones intracelulares de MTX de 0-100 nM, se consideró la posibilidad de emplear CLAR-UV para la cuantificación de MTX en eritrocitos de pacientes con AR. Así mismo, recientemente se ha publicado un método que reporta la cuantificación de MTX en experimentos de permeación *in vitro* con un límite de cuantificación de 50 ng/ml⁶¹, respaldando su posible uso para la cuantificación a bajos niveles de concentración.

Para el caso del presente método bioanalítico, durante la evaluación de la selectividad se detectó la presencia de señales en los blancos de eritrocitos de donadores aparentemente sanos, sin embargo, se determinó que estas señales no interfieren con los TR del EI (teofilina) ni de MTX, dando blancos libres de interferencias endógenas; de manera semejante a los métodos anteriormente desarrollados que emplean CLAR-F y CLAR-EM. Por otro lado, una de las ventajas de nuestra metodología es que permite la detección de MTX en presencia de ácido fólico, fármaco coadministrado en el tratamiento de pacientes con AR, cuya evaluación conjunta no ha sido reportada en los métodos anteriores.

De acuerdo con rango de concentraciones esperadas para MTX (0-50 ng/ml), se propuso la evaluación de MTX en un rango de 25-225 ng/ml. En la curva de calibración se determinó una correlación lineal entre la concentración y área de MTX; sin embargo, también se detectó una alta variabilidad en la respuesta de teofilina. Respecto a la eliminación del estándar interno en la cuantificación de MTX, Quatrocchi debate la utilidad del uso de un estándar interno, mencionando que es de gran ayuda para minimizar errores de dilución; sin embargo, “en procesos de extracción puede empeorar resultados en lugar de mejorarlos, lo que en ciertos casos los vuelve innecesarios”. Así mismo recomienda

evaluar la utilidad en cada caso particular³². Así mismo, de las metodologías presentadas en la *Tabla 1. Metodologías para la cuantificación de MTX y MTX-PG en sangre*; que emplean CLAR-F, no reportan el uso de una sustancia como estándar interno. El dejar de usar el estándar interno implica que no se podrá caracterizar si el pretratamiento de la muestra tuvo algún efecto sobre la concentración del analito. Tomando en consideración estas observaciones, se propuso no emplear EI en el análisis cuantitativo. Sin embargo, otras de las alternativas para solucionar este inconveniente serían evaluar el uso de otras moléculas como EI (por ejemplo, aminopterina, cuya estructura química es semejante a MTX, no se encuentra en el organismo y está disponible comercialmente) o evaluar otros métodos de cuantificación (estándar externo o estándar agregado).

En relación con la exactitud del sistema se observó un elevado coeficiente de variación (36.15%) a una concentración de 25 ng/ml (nivel inicialmente propuesto para evaluarse como límite de cuantificación), además de la inconsistencia en la detección de la señal en este nivel, también se observó que no era fácilmente distinguible del ruido. En la evaluación de la precisión, la elevada variación no sólo se presentó a los 25 ng/ml (CV=30.05%), sino que también se observó una gran variación a una concentración de 50 ng/ml (CV=45.24%), lo que determinó que el límite de cuantificación (LC) se estableciera en 125 ng/ml.

Respecto a la sensibilidad, a pesar de que inicialmente se había decidió evaluar 25 ng/ml como posible límite de cuantificación, dado que la guía define al LC como la menor concentración con exactitud y precisión aceptables, se determinó experimentalmente que ambas condiciones se cumplían únicamente a 125 ng/ml (equivalente a 275 nM), por lo que este valor se estableció como LC. 275 nM está por encima de lo reportado para los métodos CLAR-F (LC=5 nM) y CLAR-EM (LC=1 nM). Sin embargo, cabe mencionar que de manera experimental no se evaluaron concentraciones intermedias entre 50 y 125 ng/ml, por lo que es posible que el límite de cuantificación se encuentre en un valor intermedio, siendo necesario una evaluación experimental para confirmar esta idea. En cuanto al límite de detección, cabe mencionar que se obtuvo de manera teórica a partir de metodologías usadas en la validación de métodos analíticos. Sin embargo, en los métodos bioanalíticos la matriz presenta mayores "contaminantes", lo que puede incrementar el ruido de la línea base y es por ello que el valor obtenido difiera enormemente respecto al límite de cuantificación obtenido de manera experimental.

En cuanto al recobro se observó una disminución en el porcentaje de recuperación de MTX conforme incrementaba la concentración de este analito, contrario a lo reportado

por Wu y colaboradores en 2021. Así mismo la variabilidad observada fue mayor respecto a los análisis anteriores para los tres niveles evaluados. Sin embargo, esta variabilidad puede ser explicada por el número de muestras evaluadas (n=6), y posiblemente incrementando el número de muestras esta variabilidad se disminuya.

En la estabilidad (evaluada bajo un almacenamiento a -20°C por 30 días) se observó un incremento en la media a los 30 días de almacenamiento para una concentración de 50 ng/ml (59.57 ng/ml vs 72.34 ng/ml), mientras que a concentración de 125 ng/ml la concentración disminuyó (132.46 ng/ml vs 110.93 ng/ml); sin embargo, los datos muestran una alta variabilidad (27% y 36%, respectivamente), ver Tabla 11; debido a la cual, no se puede hablar de una influencia de la concentración sobre la estabilidad de MTX. Para el nivel de 200 ng/ml la variabilidad cumple con el criterio de aceptación, y aunque se observa una disminución en la media, esta disminución no es estadísticamente significativa ($p=0.4361$, prueba *T-pareada*). Lo anterior nos llevó a concluir que MTX únicamente es estable en el lisado de eritrocitos a concentraciones de 200 ng/ml, bajo un almacenamiento a -20°C durante 30 días. La comparación de los datos obtenidos con los estudios previos, donde se ha comprobado la estabilidad de MTX por tres meses^{46,48,49} y seis meses⁵⁴, bajo un almacenamiento a -80°C, nos lleva a pensar en la posible influencia de la temperatura sobre la estabilidad de MTX, por lo que se recomienda realizar la extracción y análisis CLAR-UV de MTX en eritrocitos, casi de manera inmediata a la obtención de la muestra. Así mismo sería deseable una evaluación de los ciclos de congelación-descongelación a los que puede estar sometida la muestra desde su toma hasta su análisis.

9.3 Evaluación de muestras de pacientes con AR

Conviene mencionar que la evaluación de muestras eritrocitarias de pacientes con AR, mediante este procedimiento bioanalítico, tuvo como objetivo realizar un estudio piloto que nos permitiera evaluar la factibilidad de la aplicación de la metodología en un estudio clínico posterior. En ese sentido, la finalidad no fue la cuantificación de MTX o aportar información al médico sobre la adherencia de los pacientes. Asimismo, el realizar este estudio piloto, nos permite identificar las debilidades del procedimiento de procesamiento y almacenamiento de muestras sanguíneas para su evaluación bioanalítica. En ese rubro hay que hacer mención de que es preciso llevar a cabo un conteo de eritrocitos de las muestras de sangre de los pacientes previo a su congelación, permitiendo equiparar los resultados con la metodología bioanalítica aquí validada.

De las muestras analizadas, en el caso del paciente 95, no se detectó señal en la región de MTX ni en la región de teofilina. La no detección de señal en la zona de teofilina, si bien no es de utilidad en el análisis cuantitativo, de manera cualitativa, podría ser sugerente de una afectación del proceso de extracción o inyección de la muestra, siendo recomendable la repetición del análisis de la muestra.

En el caso de las muestras 101 y 104, no se detecta MTX, y para las muestras restantes, a pesar de detectar una señal en el tiempo de retención de MTX y poder calcular la concentración con el modelo de regresión, la cantidad obtenida se encuentra fuera del límite de cuantificación de MTX, por lo que no se puede asegurar la exactitud del valor obtenido.

Por otro lado, se puede observar en las Figuras 23b a 23j la presencia de 2-3 picos en la región entre 10 y 13 min del cromatograma, que no se habían observado previamente en las muestras de eritrocitos de donadores aparentemente sanos y que potencialmente podrían constituir las formas poliglutaminadas del MTX. Sin embargo, como se explicó antes, sin un estándar no se puede confirmar su identidad.

En conclusión de esta sección, se puede confirmar que la presencia de MTX es identificable por esta metodología, sin embargo, es necesario incrementar la sensibilidad de la técnica y ajustar las condiciones de almacenamiento de las muestras sanguíneas de pacientes para poder obtener resultados cuantitativos.

9.4 Monitoreo de MTX en pacientes con AR

Como se describió en la Introducción, dado que la AR es una enfermedad crónica su tratamiento farmacológico requiere un nivel elevado de adherencia terapéutica por parte del paciente. Varios estudios previos, mediante pruebas indirectas, han demostrado que la adherencia del paciente hacia el MTX es muy heterogénea, pudiendo ir desde un 9% hasta un 87%. Importantemente, estudios previos han evidenciado que los niveles de adherencia terapéutica altos coinciden con mejor respuesta al tratamiento y disminución de la actividad clínica de los pacientes con AR. Sin embargo, estos estudios comúnmente ocurren en países desarrollados. Por su parte, en países con medios o bajos ingresos, como el nuestro, los estudios de adherencia han evidenciado un bajo a medio nivel de adherencia, donde fundamentalmente existe una mezcla de factores tanto socioeconómicos como propios del paciente y que limitan en gran medida la posibilidad de alcanzar niveles de respuesta terapéutica elevada.

Otro de los inconvenientes reportados por los reumatólogos, es la sobreestimación de la adherencia debido a las herramientas limitadas para evaluar el apego al tratamiento farmacológico; ya que ellos recurren a la pregunta directa al paciente o a su cuidador para saber si el paciente ha tomado la medicación de manera adecuada⁶⁵. En ese sentido el método desarrollado es un primer paso para generar una herramienta objetiva y accesible, que aporte al médico más información sobre la adherencia y metabolismo de MTX, con la finalidad de ser un apoyo en la toma de decisiones para optimizar el tratamiento del paciente con AR.

Aunque en la etapa de validación del método desarrollado se demostró la capacidad para la detección y cuantificación de MTX, en un análisis preliminar de muestras sólo se comprobó la capacidad de detección de MTX; por lo que antes de poder ser empleado en un entorno clínico se requieren más análisis supliendo las limitaciones del estudio.

9.5 Limitaciones del estudio

Las dificultades encontradas durante el desarrollo del proyecto pueden agruparse en tres rubros, aquellas relacionadas con los reactivos, las inherentes al método desarrollado y aquellas presentadas en el análisis de muestras de pacientes con AR.

Dentro del primer rubro, dado que no fue posible conseguir los estándares de las formas poliglutaminadas del MTX, tampoco fue posible confirmar que el método desarrollado nos permita la identificación de los metabolitos activos del MTX y por consiguiente la evaluación de su presencia en las muestras analizadas, provenientes de pacientes con AR. Otra de las limitantes fue la selección del estándar interno, pues a pesar de que varias sustancias fueron probadas, se observaron interferencias en la matriz (4-nitrobenzofenona) o una alta variabilidad en su respuesta (teofilina). Para el caso de la teofilina otra de las limitaciones presentadas fue que, el polvo obtenido a partir de la extracción de tabletas no pudo ser valorado respecto a una sustancia de referencia (Sref).

Respecto a las limitaciones inherentes al método, tenemos aquellas relacionadas con el proceso de extracción de MTX del lisado de eritrocitos y aquellas relacionadas con el sistema cromatográfico. En el primer caso, durante el proceso de ELL, la evaporación del eluido (metanol-agua) requiere de un tiempo considerable para su evaporación (>45 min), además de que tiene que realizarse bajo una atmósfera de nitrógeno. Lo anterior condiciona el tiempo de análisis de un lote de muestras, requiriendo dedicar al menos un día al proceso

de extracción y otro día a la evaluación en el sistema por CLAR-UV. Así mismo, el empleo de nitrógeno incrementa el costo de análisis de las muestras.

En relación con el sistema cromatográfico, como se mencionó anteriormente, el límite de cuantificación del método desarrollado (125 ng/ml equivalente a 275 nM) es superior respecto a los métodos previamente reportados (5 nM para CLAR-F y 1 nM para CLAR-EM). Esta característica está relacionada con el detector empleado (UV), el cual posee una menor sensibilidad en comparación a las otras técnicas de detección empleadas: fluorescencia y espectrometría de masas. Lo anterior repercute de manera significativa, dado que las concentraciones de MTX esperadas oscilan entre los 15 nM y los 93 nM (0-50 ng/ml) ^{13,14,48,50-52,54}. Sin embargo, es importante mencionar que estas variaciones en los niveles intracelulares de MTX, dependen de múltiples factores como la dosis y el tiempo de administración de MTX¹³, polimorfismos en la enzima FPGS⁴⁵, edad, sexo o función renal¹⁵. Aunado a esto, hay que considerar que se espera que las formas poliglutaminadas reduzcan la presencia de MTX, por lo que se esperaría encontrarlo en una menor concentración respecto a sus metabolitos.

Finalmente, dentro de las limitaciones presentadas en el análisis de muestras provenientes de pacientes con AR, se encuentra la procedencia éstas. Derivado de la emergencia sanitaria ocasionada por el virus SARS-CoV2, así como del desabasto de MTX, el contacto con pacientes con AR bajo administración de MTX se vio interrumpido, por lo cual las muestras se tomaron de un biobanco. Debido a lo anterior, el almacenamiento de los eritrocitos estuvo sujeto a un resguardado a -80°C, sin embargo, se desconoce el tiempo de almacenamiento; y nuestro estudio de validación únicamente nos permite respaldar una estabilidad por 30 días bajo un almacenamiento a -20°C. Otra de las limitaciones es que no se tiene la certeza del protocolo de administración de MTX bajo el que estuvieron los pacientes ni se tiene conocimiento de su nivel de adherencia al tratamiento. Aunado a lo anterior, tampoco se conocía el número de eritrocitos/ml de cada muestra; mientras que en la etapa de validación todas las muestras fueron normalizadas a una concentración de 5,000,000/ml.

10. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una metodología bioanalítica, empleando CLAR-UV (FR) para la detección de MTX a bajas concentraciones (ng/ml). También fue posible obtener un método de extracción de MTX de un lisado de eritrocitos empleando una extracción líquido-líquido en combinación con una precipitación de proteínas, mediante el método *Metanol-cloroformo-agua*. El estudio de validación para la cuantificación de MTX mostró que el método está libre de interferencias en la región de MTX; permite la diferenciación de ácido fólico (medicación concomitante); presenta una correlación lineal entre la concentración y el área de MTX, lo que permite el empleo de un modelo de ajuste lineal en un rango de concentración de 25 a 225 ng/ml. Asimismo, permite calcular de manera exacta, concentraciones de MTX >50 ng/ml y de manera precisa, concentraciones de MTX >125 ng/ml; posee un límite de cuantificación de 125 ng/ml y teóricamente un límite de detección de 4.61 ng/ml. El recobro observado es superior al 65% y se comprobó una estabilidad a concentración de 200 ng/ml durante almacenamiento a -20°C por 30 días. En estas condiciones y considerando que los niveles intracelulares reportados para MTX varían entre 0-50 ng/ml, al momento actual aún no es posible emplear esta metodología en la cuantificación de las concentraciones de MTX en pacientes con AR. En ese sentido, la evaluación preliminar de MTX en los eritrocitos de muestras de pacientes con AR mostró que es posible identificar la presencia del fármaco en un alto porcentaje de las muestras clínicas. Sin embargo, debido a las limitaciones de sensibilidad, no fue posible determinar su concentración intracelular.

Finalmente, sería deseable que la presente metodología mejore en los aspectos de sensibilidad y estabilidad de la muestra. Asimismo, un aspecto que también podría evaluarse es la concentración de muestra por empleo de otros sistemas de extracción de fase sólida.

11. PERSPECTIVAS

Dentro de las características que podrían mejorarse en el método desarrollado se encuentran la evaluación de otras sustancias como estándar interno, destacando la aminopterina, compuesto estructuralmente semejante a MTX, disponible comercialmente y ausente en el organismo.

Otro de los aspectos relevantes es el análisis de estándares de las formas poliglutaminadas de MTX, por un lado, es necesario evaluar su detección bajo las condiciones cromatográficas desarrolladas, y una vez detectadas, optimizar las condiciones operativas para obtener una resolución adecuada entre el fármaco, metabolitos y estándar interno, dentro del cromatograma. Por otro lado, también se requiere conocer su estabilidad al almacenar, aplicar el proceso de extracción y durante su manipulación en el análisis cromatográfico.

Así mismo, sería de utilidad evaluar el método desarrollado empleando muestras de pacientes con AR bajo tratamiento controlado con MTX, tomadas recientemente o resguardadas bajo las condiciones de almacenamiento evaluadas.

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Lin, Y.-J., Anzaghe, M. & Schülke, S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells* **9**, 880 (2020).
2. Smolen, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 18001 (2018).
3. Scherer, H. U., Häupl, T. & Burmester, G. R. The etiology of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **110**, 102400 (2020).
4. Pelaez-Ballesteros, I. *et al.* Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico. A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology. *J. Rheumatol. Suppl.* **86**, 3–8 (2011).
5. Aletaha, D. & Smolen, J. S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA* **320**, 1360 (2018).
6. Cardiel, M. H. *et al.* Actualización de las guías del tratamiento farmacológico de la artritis reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología 2018. *Reumatol. Clínica* **17**, 215–228 (2019).
7. Cronstein, B. N. & Aune, T. M. Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **16**, 145–154 (2020).
8. Friedman, B. & Cronstein, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **86**, 301–307 (2019).
9. Bedoui, Y. *et al.* Methotrexate an Old Drug with New Tricks. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5023 (2019).
10. Maksimovic, V. *et al.* Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 4699–4708 (2020).
11. Dalrymple, J. M. *et al.* Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 3299–3308 (2008).
12. Huerta-García, A. P. *et al.* Methotrexate Triglutamate as a Determinant of Clinical Response in Mexican Patients With Rheumatoid Arthritis: Pharmacokinetics and Dose Recommendation. *J. Clin. Pharmacol.* **61**, 1118–1130 (2021).
13. Goss, S. L. *et al.* Methotrexate Dose in Patients With Early Rheumatoid Arthritis Impacts Methotrexate Polyglutamate Pharmacokinetics, Adalimumab Pharmacokinetics, and Efficacy: Pharmacokinetic and Exposure-response Analysis of the CONCERTO Trial. *Clin. Ther.* **40**, 309–319 (2018).
14. Sandhu, A. *et al.* High Methotrexate Triglutamate Level Is an Independent Predictor of Adverse Effects in Asian Indian Rheumatoid Arthritis Patients—A Preliminary Study. *Ther. Drug Monit.* **39**, 157–163 (2017).

15. Murosaki, T. *et al.* Prediction of the therapeutic response to methotrexate at 24 weeks by methotrexate–polyglutamates concentration in erythrocytes at 8 weeks in patients with rheumatoid arthritis. *Mod. Rheumatol.* **27**, 411–416 (2017).
16. Angelis-Stoforidis, P., Vajda, F. J. & Christophidis, N. Methotrexate polyglutamate levels in circulating erythrocytes and polymorphs correlate with clinical efficacy in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **17**, 313–320 (1999).
17. World Health Organization. *Adherencia a los tratamientos a largo plazo: pruebas para la acción.* (Organización Mundial de la Salud, 2004).
18. Benítez Alejandro, Betancour Graciela, Estévez Adrián, Klimosky Ezequiel, Papagno Maria Julia y Velasco Zamora Jorge. Adherencia al tratamiento en pacientes con artritis reumatoidea. *Rev. Argent. Reumatol.* **30**, 28–34 (2019).
19. Wabe, N. *et al.* Factors associated with medication adherence in a longitudinal study of rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Clin. Pract.* **73**, (2019).
20. Michaud, K. *et al.* Real-World Adherence to Oral Methotrexate Measured Electronically in Patients With Established Rheumatoid Arthritis. *ACR Open Rheumatol.* **1**, 560–570 (2019).
21. Bluett, J. *et al.* Development and validation of a methotrexate adherence assay. *Ann. Rheum. Dis.* **78**, 1192–1197 (2019).
22. National Library of Medicine. Pubchem. *Pubchem* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methotrexate> (2005).
23. Mioduszevska, K. *et al.* Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate. *TrAC Trends Anal. Chem.* **97**, 283–296 (2017).
24. Meloun, M., Ferenčíková, Z. & Vrána, A. The thermodynamic dissociation constants of methotrexate by the nonlinear regression and factor analysis of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data. *Open Chem.* **8**, 494–507 (2010).
25. Medina, F. *et al.* Current Practice for Therapeutic Drug Monitoring of Biopharmaceuticals in Rheumatoid Arthritis. *Ther. Drug Monit.* **39**, 364–369 (2017).
26. Stamp, L. K. *et al.* Methotrexate polyglutamate concentrations are not associated with disease control in rheumatoid arthritis patients receiving long-term methotrexate therapy. *Arthritis Rheum.* **62**, 359–368 (2010).
27. de Rotte, M. C. F. J. *et al.* Methotrexate polyglutamates in erythrocytes are associated with lower disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 408–414 (2015).

28. Dong, M. W. *HPLC and UHPLC for practicing scientists*. (Wiley, 2019).
29. Žuvela, P. *et al.* Addition: Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.* **119**, 4818–4818 (2019).
30. Chromatography Today. Does Carbon Load Affect the Retention Times from Your Columns? <https://www.chromatographytoday.com/news/columns-lc/37/breaking-news/does-carbon-load-affect-the-retention-times-from-your-columns/46748> (2018).
31. Gupta Vibha, Kumar Jain Ajay Deep, Gill N.S y Gupta Kapil. Development and validation of HPLC method - a review. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* **2 (4)**, (2012).
32. Quattrocchi OA, Andrizzi SA y Laba RF. *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*. (1992).
33. Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. (2018).
34. Hopfgartner, G. Bioanalytical method validation: How much should we do and how should we document? *Anal. Bioanal. Chem.* **412**, 531–532 (2020).
35. Hendriks, G. Theoretical models in LC based bioanalytical method development. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **49**, 1–10 (2009).
36. Kaza, M., Karaźniewicz-Łada, M., Kosicka, K., Siemiątkowska, A. & Rudzki, P. J. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J. Pharm. Biomed. Anal.* **165**, 381–385 (2019).
37. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (Ministerio de Salud). RESOLUCIÓN - RDC N° 27, DEL 17 DE MAYO DE 2012. Establece los requisitos mínimos para la validación de métodos bioanalíticos utilizados en estudios con fines de registro y post-registro de medicamentos. (2012).
38. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. (2011).
39. Ministry of Health, Labour and Welfare. Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development. (2013).
40. Moein, M. M., El Beqqali, A. & Abdel-Rehim, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J. Chromatogr. B* **1043**, 3–11 (2017).
41. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. (2021).
42. Secretaría de Salud. 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. (2013).
43. Matuszewski, B. K., Chavez-Eng, C. M. & Constanzer, M. L. Development of high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods for the determination of a new oxytocin receptor antagonist (L-368,899) extracted from human plasma and urine: a case of lack of specificity due to the presence of metabolites. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **716**, 195–208 (1998).
 44. Danila, M. I. *et al.* Measurement of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamate Levels: Ready for Clinical Use in Rheumatoid Arthritis? *Curr. Rheumatol. Rep.* **12**, 342–347 (2010).
 45. Yamamoto, T., Shikano, K., Nanki, T. & Kawai, S. Folyl polyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Sci. Rep.* **6**, 35615 (2016).
 46. Wu, J. *et al.* Simultaneous determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates by a novel and simple HPLC-MS/MS method with stable isotope-labeled internal standards. *J. Sep. Sci.* **44**, 1852–1865 (2021).
 47. Brady, K. *et al.* Transition of Methotrexate Polyglutamate Drug Monitoring Assay from Venipuncture to Capillary Blood-Based Collection Method in Rheumatic Diseases. *J. Appl. Lab. Med.* **4**, 40–49 (2019).
 48. den Boer, E. *et al.* Measuring methotrexate polyglutamates in red blood cells: a new LC-MS/MS-based method. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1673–1681 (2013).
 49. Mo, X. *et al.* Determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after low-dose methotrexate therapy in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *J. Chromatogr. B* **907**, 41–48 (2012).
 50. Hohl, E.-L. *et al.* A short-chain methotrexate polyglutamate as outcome parameter in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Clin. Exp. Rheumatol.* **30**, 156–163 (2012).
 51. van Haandel, L., Becker, M. L., Williams, T., Leeder, J. S. & Stobaugh, J. F. Measurement of methotrexate polyglutamates in human erythrocytes by ion-pair UPLC–MS/MS. *Bioanalysis* **3**, 2783–2796 (2011).
 52. van Haandel, L., Becker, M. L., Leeder, J. S., Williams, T. D. & Stobaugh, J. F. A novel high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method for improved selective and sensitive measurement of methotrexate polyglutamation status in human

- red blood cells: HPLC/MS study of methotrexate polyglutamation status. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3693–3702 (2009).
53. Hroch, M., Tuková, J., Doležalová, P. & Chládek, J. An improved high-performance liquid chromatography method for quantification of methotrexate polyglutamates in red blood cells of children with juvenile idiopathic arthritis. *Biopharm. Drug Dispos.* **30**, 138–148 (2009).
 54. Brooks, A. J., Begg, E. J., Zhang, M., Frampton, C. M. & Barclay, M. L. Red Blood Cell Methotrexate Polyglutamate Concentrations in Inflammatory Bowel Disease. *Ther. Drug Monit.* **29**, 619–625 (2007).
 55. Li, H. *et al.* Method for the determination of blood methotrexate by high performance liquid chromatography with online post-column electrochemical oxidation and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* **845**, 164–168 (2007).
 56. Dervieux, T. *et al.* HPLC Determination of Erythrocyte Methotrexate Polyglutamates after Low-Dose Methotrexate Therapy in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Clin. Chem.* **49**, 1632–1641 (2003).
 57. Rubino, F. M. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **764**, 217–254 (2001).
 58. Silva, M. F., Ribeiro, C., Gonçalves, V. M. F., Tiritan, M. E. & Lima, Á. Liquid chromatographic methods for the therapeutic drug monitoring of methotrexate as clinical decision support for personalized medicine: A brief review. *Biomed. Chromatogr.* **32**, e4159 (2018).
 59. Torregiani, L., Caro, Y. S. & De Zan, M. M. Monitorización terapéutica de metotrexato en pacientes leucémicos mediante cromatografía líquida de alta resolución. Desarrollo, validación y aplicación clínica del método analítico. *Rev. Lab. Clínico* **11**, 64–72 (2018).
 60. Jolivet, J. & Schilsky, R. L. High-pressure liquid chromatography analysis of methotrexate polyglutamates in cultured human breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1387–1390 (1981).
 61. Giulio, L., Padula, C., Pescina, S., Nicoli, S. & Santi, P. Development and validation of a HPLC–UV based method for the extraction and quantification of methotrexate in the skin. *Biomed. Chromatogr.* (2022) doi:10.1002/bmc.5349.
 62. Wessel, D. & Flügge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**, 141–143 (1984).
 63. Mexico. Secretaria de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de & los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. vol. II (2014).

64. Parent, M. *et al.* LR12-peptide quantitation in whole blood by RP-HPLC and intrinsic fluorescence detection: Validation and pharmacokinetic study: LR12-peptide quantitation by HPLC and intrinsic fluorescence detection. *Biomed. Chromatogr.* **31**, e3877 (2017).
65. Curtis, J. R. *et al.* Agreement between Rheumatologist and Patient-reported Adherence to Methotrexate in a US Rheumatoid Arthritis Registry. *J. Rheumatol.* **43**, 1027–1029 (2016).

ANEXO I

a) Obtención de MTX como materia prima

Durante la fase de desarrollo y optimización del método cromatográfico para la detección de MTX, se utilizó MTX extraído de tabletas comerciales [Tabletas de MTX 2.5 mg (Karxitran[®], lote AX18007)], cuya valoración se desarrolló mediante la cuantificación de éste, utilizando una SRef de MTX (estándar de referencia USP, pureza $\geq 99.7\%$, lote R020L0). Para ello se trituraron 10 tabletas comerciales de MTX hasta polvo fino y se tomó el equivalente a 5 mg de MTX, el cual se depositó en un matraz volumétrico de 50 ml y se agregaron 40 ml de una solución 90% citrofosfato 0.025 M, pH 6:10% ACN. Posteriormente se aplicó un baño de ultrasonido durante 20 minutos, se aforó con la solución anterior a 50 ml y se llevó a cabo una filtración mediante un filtro de nylon de jeringa de 0.45 μm . El extracto obtenido se mantuvo en refrigeración y cubierto de la luz hasta su empleo para los análisis en CLAR-UV. La valoración indicó la presencia de 0.268 mg de MTX en 2 mg del polvo extraído de MTX.

b) Obtención de Teofilina como materia prima

Para la obtención de teofilina se emplearon tabletas de teofilina 100 mg (Pharmafil[®] LP, lote 2102666), de las cuales se trituró media tableta hasta obtener polvo fino, el cual se disolvió en 12 ml de metanol, se aplicó ultrasonido por 10 minutos y se adicionaron 2 ml más de metanol. La mezcla se centrifugó a 6000rpm por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se evaporó en un rotavapor con un baño de agua a 36°C. El polvo obtenido se resuspendió en acetona y el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 24 horas. El polvo blanco cristalino obtenido se almacenó en un tubo Eppendorff a temperatura ambiente.

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Diana González Marañón.

Título de la tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Dea Herrera Ruiz.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DEA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-03-14 10:15:45 | Firmante

RakqY5lhOv+7hk4VCV5w7qZV1Brs7S/9D1sMGNUQwDAO/Wo67b61HU976SURYGhv6O5tNiziAKr2TP9QJHvV7JnAUowaBpFKf9EH22i2XxBPmnGGFeTokLIs47EWLRm4Cy4AcxittfQOYZGo292x48AafbpofPsm8giYKN9IIVR42SXp/pLB5jHLBSv7MlhSEhLbFzgrqTl8xokngosArjL8KIPzFbJpJ8TwJNt7fiDD8ALKHVJD+1zM1IOAKC1IC026AZcOJYmsVM0UfV+B7fYygu/umhIk//BCSrl5T9yuafAWifDLKBVpW+rC2UdVsKJd2aCTkEcQ8cbjxnm+g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IZRTvgh0Y

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qpJm96X2C2CmZ0ezKMTdyRUvmdsyCJbG>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Diana González Marañón.

Título de la tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Julio César Rivera Leyva.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2022-03-14 10:53:48 | Firmante

sU4E/mDTCyDnM/3qvEtv5CpjiN7Wz0HEH9xzgcMTxqihLSa10jvDY9n8TsJ/wV/AyMZ3B8E6JO13tFgl7XHSwJkPFdaeBQQbTuWBUOtDNN+6ju6V/IYWsyql5TLTD2w3gnzU8H0K/AlalqfOr4saS4aFYwhl0qoOIV20VknE6Xwjh8bkxDiux34wN6yXv7WYtFShUw2+vP8lqyaos3C14DJtvKtQfeEW2uLMDf2Vv6emxYdYjwRaT83E6m1rT4rtXtSdBQ3J4kqTbPYseB32d8ZGUHjxOBSCHR7BFHJecS0fGVuTMoqFCXb653A6mlZb03rUqo29124F/VDJQxSkLPw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ZtgUWnyAo](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M99PITatR5AygziyIRfbRBJ9VSDC4svb>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Diana González Marañón.

Título de la tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: M.M.M. Ana Victoria Hernández Torres.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANA VICTORIA HERNÁNDEZ TORRES | Fecha:2022-03-08 02:03:24 | Firmante

mdOf2HvPRnEHnS8bjO35xkXIPrdaz5NGQRAmvli2o54IHrOG2q9btjwOdpppGM/nENH/67V7XDCurXN3BswkvnUVb4oG3Kkp46bTpfns4yOuCu1yzfGs/+Y75N8vVC56afy1VvdwDpFGR6H6fxcUTVekNrfz+JT6yT72SKfBgRD8Xe6u0cvuvumMXmyZuHyv3PMzBBIWLuBnucN0eKhr3kCaE5JezSJGY5fC3ZhI2fPpGeBWBZhsppoP0hUL8cKbZdXoHglZnQcydFytANEyfqLoF4rq8OZHnka/BZBtmyjqSuvWCe1Q32cRAV1Qiq0f4PZcshkmfM5ny7L9LHuCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[TclHANfga](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vxZMEejBAOyaT2Ezps4PoD7H5BwZKnNI>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Diana González Marañón.

Título de la tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DIANA LIZBETH GOMEZ GALICIA | Fecha:2022-03-07 08:42:40 | Firmante

L6sDxEud4ubPLBUJNt8k1e+F+5WUe3b/Lcoxb9+NdxB40lnVYJZ0EzCWRxr+PnHkkZjNmKuQwMOJ7U7V+AQHnERMzRUHP3PKgIk9ZT8r50BI3UdjOd7I3Kv/RNPLVmNBkdfsl
JJpWqSSLu66ofTYkg1+1Y60I7CZEo0zBY99CqV35ol+q1yUk3Gr3VKG2lwhk53VCA3wx7q919ytdx7XOaskpSj1QfeYGFHUfjJWv+Nh3Mjib89Z3PeQCC8dUzHP/4wbJwGT8BZlrl
nZlyPUPpmbT11iZal/A2MQRaC//nEvwUqs6Rev0QFU4Tnh2pbN9aBx0OadK1Yb0zQmg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[RY0iLzlqf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/PhmqVRQoMyDvkHJgo6bKBHJRQXv1tIj9>



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Diana González Marañón.

Título de la tesis: DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METOTREXATO EN LISADO DE ERITROCITOS.

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. José Luis Montiel Hernández.

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2022-03-04 20:28:28 | Firmante

W+kNU5am2nzGZmNFIZC0pF2okA+k1k5Gu77dx5i9O7juZ6LaZvGtREb46xKDR3HK41cP9Xx69u2xIre0WIOS8KybT8TxXklVtIF/Hb13YnRrzYRuBBPhTqqhHSFO+Eiw/CtYnkYv
wLA4p9bwC//GEMiZzeBNwQkXyGC6xJzrVjBaJ+ulBx2rhZxzJN7tS8EC6UYIRQSSGRn7he0F/OUh+mq2p4mY3GRdtPcj88sLlyHnFEMrCa1w9l36RejdHPKuVYkuBvTUPU0O2
ulGHUtk7mSvdASZWMQc+VH9dnllJTHv/ZHWYw7oIFA0q56yH8QsyEUyC7vroWajnzHSe2Wgg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



F2WdpjSG8

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/XN0gcNPV03ToxB2EySQgZ0dXWMYhq7k4>

