



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UPLC-MS/MS) PARA CUANTIFICAR IFOSFAMIDA  
EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POR DRIED BLOOD SPOT**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**JOAQUÍN HERRERA CAMPOS**



**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** FRANCISCO ROJO CALLEJAS.

**VOCAL:** MINERVA CARRASCO FUENTES.

**SECRETARIO:** JUAN LUÍS CHÁVEZ PACHECO.

**1er. SUPLENTE:** MARÍA EUGENIA IVETTE GÓMEZ SÁNCHEZ.

**2° SUPLENTE:** PATRICIA DIAZ ARISTA.

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA (INP), TORRE DE INVESTIGACIÓN,  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Juan Luíz Chávez Pacheco.**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**M. en C. Liliana Rivera Espinosa.**

**SUSTENTANTE:**

**Joaquín Herrera Campos.**

## Contenido.

1. Introducción.	1
2. Objetivos.	4
3. Justificación.	4
4. Generalidades.	5
4.1. Tumores sólidos.	5
4.1.1. Retinoblastoma.	6
4.1.2. Sarcoma de Ewing y tumor neuroectodérmico primitivo.	8
4.1.3. Tumor de Wilms.	10
4.1.4. Sarcomas de partes blandas: rhabdomyosarcoma.	10
4.2. Ifosfamida.	11
4.2.1. Estructura.	12
4.2.2. Propiedades fisicoquímicas.	12
4.2.3. Farmacocinética.	12
4.2.3.1. Absorción y distribución.	12
4.2.3.2. Metabolismo.	13
4.2.3.3. Eliminación.	15
4.2.4. Farmacodinamia.	15
4.2.4.1. Mecanismo de acción.	15
4.3. Cromatografía.	16
4.3.1. Cromatografía líquida (HPLC y UPLC).	16
4.4. Espectrometría de masas.	18
4.4.1. Formación del espectro de masas.	18
4.4.2. Tipos de ionización.	21
4.4.2.1. Ionización por electrospray.	21
4.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).	22
4.5. Cromatografía líquida-espectrometría de masas.	23
4.6. Dried blood spot.	24
4.7. Efecto del hematocrito.	25
4.8. Validación del método analítico.	26

5. Desarrollo experimental. ....	29
5.1. Reactivos. ....	29
5.2. Desarrollo del método. ....	30
5.3. Condiciones espectrométricas. ....	32
5.4. Condiciones cromatográficas. ....	33
5.5. Elaboración de estándares y controles. ....	34
5.6. Procesamiento de las muestras (extracción). ....	36
6. Resultados. ....	37
6.1. Variación de hematocrito. ....	37
6.2. Linealidad del método. ....	39
6.3. Precisión y exactitud. ....	42
6.4. Límite de cuantificación. ....	44
6.5. Efecto de matriz. ....	45
6.6. Acarreo. ....	46
6.7. Estabilidad. ....	47
6.8. Selectividad. ....	50
7. Aplicabilidad del método. ....	53
8. Análisis de resultados. ....	54
9. Conclusiones. ....	55
10. Referencias. ....	56
10.1. Revistas científicas. ....	56
10.2. Libros. ....	58
10.3. Recursos electrónicos. ....	59

## Abreviaturas.

En esta tesis, se hace referencia a algunos símbolos, siglas y unidades de medición, en las cuales debe entenderse:

±	Más menos
%	Por ciento
CYP	Citocromo
DBS	Dried Blood Spot (gota de sangre seca)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés: Deoxyribonucleic acid)
FECG	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
HCT	Hematocrito
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés: High Performace Liquid Chromatography)
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IV	Intravenosa
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/z	Relación masa/carga
NOM	Norma Oficial Mexicana
pH	Potencial de hidrógeno
RCNA	Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes
RMS	Rabdomiosarcoma
rpm	Revoluciones por minuto
RTB	Retinoblastoma
RtbMex	Grupo Mexicano de Retinoblastoma
SNC	Sistema Nervioso Central
SSA	Secretaría de Salud
STB	Sarcomas de Tejidos Blandos
UPLC	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (por sus siglas en inglés: Ultra Performance Liquid Chromatography)
v/v	Relación volumen/volumen
°C	Grado Centígrado
Kg	Kilogramo
g	Gramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
L	Litro
mL	Mililitro

μL	Microlitro
m <sup>2</sup>	Metro cuadrado
mm	Milímetro
μm	Micrómetro
mol	mol
μmol	Micromol
M	Molar
mM	Milimolar
min.	Minuto
psi	Libra fuerza por pulgada cuadrada (por sus siglas en inglés: Pound-force per Square Inch)
Th	Thomson
V	Volt

## 1. Introducción.

La cifra estimada que se tiene de personas diagnosticadas con cáncer en el mundo es de 12 000 000, de las cuales el 3% (360 000) son niños (Fernández, 2011). En México, el cáncer infantil representa la segunda causa de mortalidad (Rivera, 2012).

De acuerdo con datos del Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA), tan sólo en el periodo 2005-2010 los casos de cáncer en pacientes menores de 20 años ascienden a 3 569. En dicha población, la distribución de los casos en función a la edad, se concentran en pacientes de 10 a 14 años (53.4% de la población inscrita en el RCNA), seguido de pacientes de 5 a 9 años (30.7%) (Fernández, 2011).

En contexto demográfico, en el mismo periodo de 5 años, el RCNA reportó las cifras correspondientes a la incidencia relativa por millón de habitantes de cada entidad federativa (Tabla1).

**Tabla 1.**

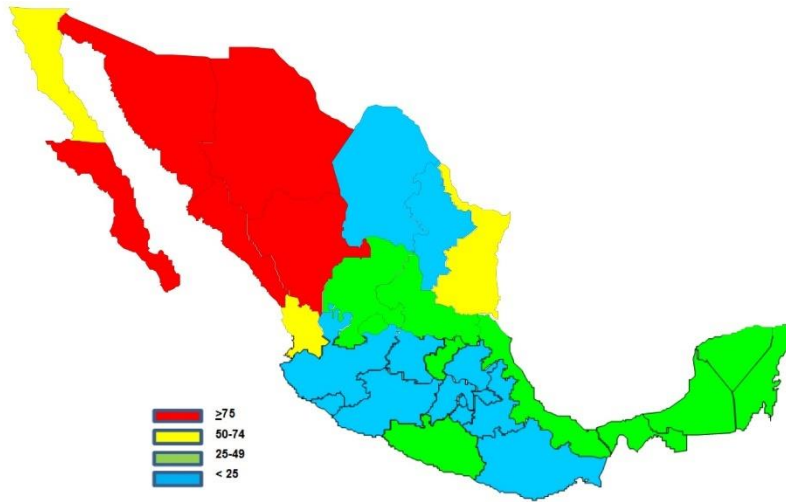
**Incidencia relativa de cáncer en menores de 20 años por entidad federativa de residencia. Unidades Médicas acreditadas. Secretaría de Salud, 2005 - 2009.**

Entidad federativa	Casos	Población	Incidencia relativa*
Aguascalientes	33	208 520	31.7
Baja California	115	450 409	51.1
Baja California Sur	54	73 433	147.1
Campeche	44	188 835	46.6
Coahuila	44	1 753 577	5.0
Colima	237	510 195	92.9
Chiapas	18	295 610	12.2
Chihuahua	11	105 783	20.8
Distrito Federal	95	1 362 389	13.9
Durango	146	331 592	88.1
Guanajuato	259	3 314 582	15.6
Guerrero	108	1 346 208	16.0
Hidalgo	36	1 158 409	6.2
Jalisco	61	714 630	17.1
Estado de México	120	1 412 118	17.0
Michoacán	326	1 243 334	54.4
Morelos	58	420 004	27.6
Nayarit	63	220 624	57.2
Nuevo León	17	518 501	6.6
Oaxaca	279	1 251 107	44.6
Puebla	113	1 804 291	12.5
Querétaro	55	361 354	30.4
Quintana Roo	39	242 749	32.1
San Luis Potosí	116	635 206	36.5
Sinaloa	203	495 277	82.0
Sonora	165	379 630	86.9
Tabasco	102	594 414	34.3
Tamaulipas	155	525 381	59.0
Tlaxcala	12	330 216	7.3
Veracruz	324	2 052 721	31.6
Yucatán	81	393 216	41.2
Zacatecas	79	382 594	41.3

\*Incidencia relativa por 1 millón de menores de 20 años, por año.



Las cifras anteriores indican una notable concentración de casos de cáncer en menores de 20 años en el noroeste del país (Figura 1).



**Figura 1.**

**Incidencia relativa de cáncer en menores de 20 años inscritos en el RCNA, México 2005-2009.**

El seguimiento que han realizado las unidades médicas a los casos de cáncer en pacientes menores de 20 años revelan que, de acuerdo con el tipo histológico del tumor, los tres primeros lugares los ocupan leucemias (30.0%), linfomas y neoplasias (17.1%), y tumores del sistema nervioso central (11.9%) (Tabla 2) (Fernández 2011).

**Tabla 2.**

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

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

En la mayoría de los protocolos actuales de quimioterapia, los antineoplásicos se emplean como una combinación de agentes que tienen diferentes mecanismos de acción con el fin de disminuir la dosis de cada agente individual, manteniendo así el sinergismo de los efectos terapéuticos y la minimización de los efectos tóxicos (Lima, 2011).

Ifosfamida es uno de los fármacos mayormente empleados en el esquema quimioterapéutico de niños diagnosticados con tumores sólidos (Rivera, 2012).

A pesar de su gran efectividad como antineoplásico, se han reportado eventos adversos debido a su elevada toxicidad sistémica (Huang, 1999).

En la práctica clínica, con frecuencia los antineoplásicos causan efectos tóxicos que podrían considerarse inaceptables. Aunque la toxicidad es comúnmente considerada como el factor más importante de controlar (en gran parte porque es más fácil de medir), el riesgo de infradosificación y la eficacia reducida también deben ser consideradas (Lima, 2011).

En este marco conceptual, se desarrolló y se validó un método analítico empleando la técnica de dried blood spot (DBS o gota de sangre seca), una técnica poco invasiva con respecto a la venoclisis para la toma de muestras en pacientes pediátricos; la aplicación del método se llevó a cabo para realizar el monitoreo terapéutico de ifosfamida en pacientes pediátricos diagnosticados con tumores sólidos embrionarios, con la finalidad de reevaluar la dosis administrada del fármaco, y con ello disminuir los riesgos de toxicidad. La presente tesis de licenciatura, fue realizada en el Departamento de Farmacología de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría (INP).

## 2. Objetivo.

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ifosfamida en sangre de pacientes pediátricos, empleando la técnica de dried blood spot y cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

## 3. Justificación.

En pacientes pediátricos no se ha establecido con exactitud el rango terapéutico de ifosfamida. A partir de este planteamiento clínico, el Departamento de Farmacología de la unidad de investigación del Instituto Nacional de Pediatría (INP), ha tomado como tarea desarrollar, validar y proponer la implementación de un método analítico para determinar la concentración de ifosfamida en sangre de pacientes pediátricos, con el fin de dar un tratamiento adecuado y disminuir el riesgo de toxicidad.

## 4. Generalidades.

### 4.1. Tumores sólidos.

Un tumor sólido es una masa anormal de tejido que, por lo general, no contiene áreas líquidas o con quistes. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Los diferentes tipos de tumores sólidos reciben su nombre por el tipo de células que los forman (Gavhane, 2011).

Los tumores en niños frecuentemente son de tipo embrionario, del sistema macrófago-monocitario, del sistema nervioso central y en algunos casos extremadamente raros son de tipo epitelial. La frecuencia de neoplasias malignas en el mundo es de 120 a 150 nuevos casos por millón en menores de 15 años; hay tendencia a su incremento, pero en contraste, la mortalidad ha disminuido gracias a los avances en técnicas diagnósticas y al éxito de tratamientos novedosos (Quero, 2006).

De acuerdo con las agendas estadísticas del INP de los últimos 4 años, las cifras perfilan a las neoplasias como la primera causa de mortalidad hospitalaria de 2012 a 2014 y la segunda causa en 2015 (Tabla 3), y a su vez, la principal causa de egreso de 2012 a 2015 (Tabla 4).

**Tabla 3.**

**Causas de mortalidad hospitalaria en el INP.**

Causas	Defunciones por año			
	2012	2013	2014	2015
<b>Tumores (neoplasias)</b>	<b>48</b>	<b>49</b>	<b>57</b>	<b>33</b>
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	39	38	35	39
Enfermedades del sistema respiratorio	23	19	10	10
Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias	16	20	20	11
Enfermedades del sistema nervioso	14	5	8	8
Enfermedades del sistema digestivo	12	4	14	7
Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	10	15	19	19
Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos y ciertos trastornos que afectan el mecanismo de la inmunidad	9	15	17	12
Enfermedades del sistema circulatorio	7	11	12	10
Enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas	5	N/R	N/R	N/R
Enfermedades del sistema genitourinario	N/R	6	6	7

N/R: No reportado.

**Tabla 4.**

**Principales causas de egreso hospitalario en el INP.**

Causas	Egresos por año*			
	2012	2013	2014	2015
<b>Tumores (neoplasias)</b>	<b>1 586</b>	<b>1 812</b>	<b>1 806</b>	<b>1 798</b>
Malformaciones congénitas, deformidades y anomalías cromosómicas	1 248	1 177	1 176	1 234
Enfermedades del sistema digestivo	699	746	779	803
Enfermedades del sistema respiratorio	609	691	680	611
Traumatismos, envenenamientos y algunas otras consecuencias de causas externas	551	466	503	570
Enfermedades de la sangre y de los órganos hematopoyéticos, y ciertos trastornos que afectan el mecanismo de la inmunidad	336	405	349	408
Enfermedad del sistema genitourinario	398	401	411	415
Enfermedades del sistema osteomuscular y del tejido conjuntivo	324	340	326	369
Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	N/R	256	251	255
Ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias	296	249	329	286

\*Incluye transferencias intrahospitalarias.

Para el tratamiento de tumores sólidos, los protocolos de cáncer en niños establecen varios esquemas de tratamiento, dentro de los cuales ifosfamida se emplea en combinación con otros antineoplásicos.

Los tipos de tumores sólidos en los cuales ifosfamida forma parte del esquema de tratamiento, de acuerdo con los Protocolos Técnicos Cáncer en Niños elaborados por el Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y Adolescencia (Rivera, R. Editor, 2010) se describen como:

#### **4.1.1. Retinoblastoma.**

El retinoblastoma (RTB) es una neoplasia maligna congénita derivada del tejido neuroectodérmico; sin embargo, rara vez se diagnostica desde el nacimiento. Se origina en la retina de uno o ambos ojos, ya sea en un sitio único de la retina o en múltiples focos. La edad de presentación varía entre los primeros días de vida y los 40 meses, con una media de 30 meses, sin predilección por sexo y de origen desconocido.

La frecuencia de presentación es baja, 10 casos por millón con una prevalencia de 1 en cada 18 000 a 30 000 nacidos vivos. En EUA se calcula que se presentan 200 casos nuevos al año. No se cuentan con datos precisos sobre la incidencia de la enfermedad

en México. El Grupo Mexicano de Retinoblastoma (RtbMex), que representa a 16 centros hospitalarios del país, realizó el primer estudio nacional acerca de la frecuencia de RTB y encontró 90 nuevos casos al año en un periodo de estudio de cinco años.

En el INP se informa que, en 27% de los pacientes, la enfermedad se presenta de forma bilateral y en 73% como enfermedad unilateral.

- Manifestaciones clínicas.

El cuadro clínico depende del estadio en el que se encuentra el enfermo. El signo más frecuente es la leucocoria; el segundo en frecuencia de presentación es el estrabismo que se debe a la pérdida de la visión central por infiltración macular. Otro signo común es el incremento de la presión intraocular, llamado glaucoma.

- Diagnóstico.

El diagnóstico de RTB es clínico. La leucocoria en un paciente menor de cuatro años de edad, es un dato suficiente para sospechar la enfermedad, y realizar un ultrasonido ocular que permita hacer un diagnóstico de mayor precisión. La exploración del fondo del ojo es un método importante para emitir un diagnóstico. Al revisar el reflejo del ojo dilatado en una habitación oscura, la presencia del reflejo rojo indica la integridad de la retina; en contraste, el reflejo de ojo blanco al iluminar el ojo en las mismas condiciones, indica la sospecha de una tumoración en el ojo. Para fines de diagnóstico temprano, siempre que un paciente menor de cuatro años presente estrabismo, deberá descartarse RTB.

- Tratamiento.

En estadio metastásico:

- a) Con enfermedad al SNC: Dos semanas después de la última sesión de radioterapia se toma una biometría; si los límites son normales se inicia un esquema de quimioterapia que será aplicada cada 21 días, con carboplatino 450.0 mg/m<sup>2</sup> en solución glucosada al 5% en infusión de 2 horas en 200.0 mL, previa utilización de antieméticos acorde al protocolo local para el vómito; etopósido 100.0 mg/m<sup>2</sup>/día por tres días, en infusión fisiológica, 4 veces la cantidad de

miligramos en mililitros, en infusión de 3 horas. Mesna en infusión de 400.0 mg/m<sup>2</sup> para 1 hora en solución fisiológica en la hora 0; ifosfamida 1.2 g/m<sup>2</sup>/día + mesna 1.2 g/m<sup>2</sup>/día por 5 días y, al final de la infusión, mesna en infusión de 400.0 mg/m<sup>2</sup> para 1 hora en solución fisiológica + temezolamida a razón de 100.0 mg/m<sup>2</sup> al día por 5 días. Alternado con paclitaxel en dosis de 150.0 mg/m<sup>2</sup> los días 1,4,7; hidratación día 8 y el día 9; platino a razón de 90.0 mg/m<sup>2</sup> en infusión de 4 horas, previa preparación. Se aplicará un máximo de seis cursos, evaluando la respuesta cada 2.

- b) Sin afección al SNC: Dos semanas después de la última sesión de radioterapia se tomará una biometría; si los límites son normales, se inicia un esquema de quimioterapia que se aplica cada 21 días con carboplatino 450.0 mg/m<sup>2</sup> en solución glucosada al 5% para 2 horas, en 200.0 mL, previa utilización de antieméticos acorde al protocolo local de vómito; 100.0 mg/m<sup>2</sup>/día por tres días, en infusión fisiológica 3.5 veces la cantidad de miligramos en mililitros, para infusión de 3 horas. Mesna en infusión de 400.0 mg/m<sup>2</sup> para 1 hora en solución fisiológica en la hora 0; ifosfamida 1.5 g/m<sup>2</sup>/día + mesna 1.5 g/m<sup>2</sup>/día por 5 días, y al final de la infusión, mesna en infusión de 400.0 mg/m<sup>2</sup> para 1 hora en solución fisiológica en la hora uno. Alternando con paclitaxel en dosis de 150.0 mg/m<sup>2</sup> días 1,4,7; hidratación día 8, y el día 9, platino 90.0 mg/m<sup>2</sup> en infusión de 4 horas, previa preparación.

#### 4.1.2. Sarcoma de Ewing y tumor neuroectodérmico primitivo.

Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing comprenden el sarcoma de Ewing y el tumor neuroectodérmico primitivo. Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing se presentan con mayor frecuencia en el segundo decenio de la vida y comprenden cerca del 4% de los tumores pediátricos. En el hospital Infantil de México representa la duodécima neoplasia en frecuencia con un promedio de cinco a seis nuevos casos al año. Los tumores de la familia del sarcoma de Ewing son curables mediante un tratamiento en combinación de quimioterapia y radioterapia o quimioterapia y cirugía o las tres.

Para la quimioterapia clásicamente se usan regímenes que contienen vincristina, actinomicina D, ciclofosfamida y dexorrubicina (VACD). Al combinar estrategias de tratamiento local e intensificar dosis de alquilantes y de dexorrubicina, la supervivencia aumentó de 20% a 60%. La columna vertebral del tratamiento estaba constituida por quimioterapia con VACD y modalidades de control local. Después, se incorporaron otros agentes al tratamiento como la ifosfamida y el etopósido. Desde 1987 se comprobó que esta combinación es altamente efectiva para pacientes con enfermedad de bajo riesgo y logró un modesto incremento en la supervivencia de aquellos con enfermedad de alto riesgo. La combinación ifosfamida y etopósido demostró que el beneficio era mayor para los pacientes con enfermedad de alto riesgo y con sitios primarios en pelvis.

- Tratamiento.

Se propone quimioterapia neoadyuvante, control local por cirugía cuando sea posible, seguido de radioterapia y quimioterapia adyuvante de acuerdo a márgenes y respuesta a quimioterapia.

- Tratamiento de enfermedad localizada. (Quimioterapia neoadyuvante).

Para los pacientes con respuesta completa o muy buena respuesta histopatológica y bordes libres de enfermedad, en el séptimo ciclo (que se administra a los 21 días o al tener más de 75 000 plaquetas y más de 1 000 neutrófilos) se incluye: ifosfamida (2.0 g/m<sup>2</sup>/día por 5 días), mesna (al 100% de la dosis de ifosfamida), etopósido (100.0 mg/m<sup>2</sup>/día por 5 días), ondansetrón (4.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis, 30 minutos antes de la aplicación de quimioterapia, junto con dexametasona a razón de 4.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis) y FECG (5.0 µg/Kg/día por 10 días a partir del sexto día de quimioterapia).

Para pacientes con respuesta parcial o mala respuesta histopatológica y enfermedad residual y microscópica, cuando al terminar la radioterapia y se tienen más de 75 000 plaquetas y más de 1 000 neutrófilos se inicia el siguiente esquema: ifosfamida (2.2 g/m<sup>2</sup>/día con rescate de mesna al 100% por 5 días), etopósido (100.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis, 30 minutos antes de la aplicación de quimioterapia, junto con dexametasona a razón de 4.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis) y FECG (5.0 µg/Kg/día, iniciando día el 6 por 5 a 10 días).



Para pacientes con enfermedad residual macroscópica, si al terminar la radioterapia se tienen más 75 000 plaquetas y más de 1 000 neutrófilos, se inicia el siguiente esquema: ifosfamida (2.2 g/m<sup>2</sup>/día con rescate de mesna al 100% por 5 días), etopósido (100.0 mg/m<sup>2</sup>/día por 5 días), ondansetrón (4.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis, 30 minutos antes de la aplicación de quimioterapia, junto con dexametasona a razón de 4.0 mg/m<sup>2</sup>/dosis) y FECG (5.0 µg/Kg/día iniciando el día 6 por 5 a 10 días).

#### 4.1.3. Tumor de Wilms.

En México, el cáncer en niños representa el 5% de todas las neoplasias malignas. Los tumores renales en la infancia, incluyendo el tumor de Wilms ocupa el sexto lugar en los niños y se presentan principalmente en individuos menores de cinco años. El tumor de Wilms es uno de los tumores abdominales más comunes de la infancia y el más frecuente en riñones. Se estima que se presenta en uno de cada 200 000 a 250 000 niños; la máxima incidencia es alrededor de los tres años y rara vez aparece después de los ocho años. El tumor está asociado con ciertos defectos congénitos como malformaciones en el aparato urinario, aniridia y hemihipertrofia.

#### - Tratamiento.

Dos ciclos con ICE (ifosfamida 1.8 g/m<sup>2</sup> IV, carboplatino 360.0 mg/m<sup>2</sup> IV y etopósido 150.0 mg/m<sup>2</sup> IV) y posteriormente cirugía y radioterapia. Se evalúa la respuesta y se continúa con cuatro a seis ciclos más. Este esquema se repite cada tres semanas. En casos particulares se puede realizar trasplante de médula ósea.

La toxicidad esperada o potencial presente para ifosfamida en el régimen terapéutico es toxicidad hematológica y cistitis hemorrágica.

#### 4.1.4. Sarcomas de partes blandas: rhabdomyosarcoma.

Los sarcomas de tejidos blandos (STB) se originan desde el mesénquima primitivo (mesodermo), incluye a las neoplasias del músculo (estriado y liso), tejido conectivo (fibroso y adiposo), tejidos de soporte (sinovial, fascia) y tejido vascular (vasos sanguíneos linfáticos). Aunque es un tumor derivado del mesénquima primitivo y se cree que su origen es en la células musculares primitivas, se puede presentar en cualquier

parte del cuerpo con excepción del hueso. Los sitios más frecuentes son cabeza y cuello (28%), extremidades (24%), y aparato genitourinario (18%); otros sitios menos frecuentes son: tronco (11%), órbita (7%) y retroperitoneo (6%). El rabdomiosarcoma (RMS) es el sarcoma de tejidos blandos más común, la incidencia anual oscila de 4.4 a 7 casos por millón en sujetos de raza blanca y de 1.3 por millón en los de raza negra.

#### - Tratamiento.

El tratamiento principal propuesto fue vincristina, actinomicina D y ciclofosfamida con variaciones al agregar dexorubicina, radioterapia o administrar la quimioterapia en pulsos; sin embargo, cuando los pacientes tratados con el esquema VAC han tenido una mala respuesta, puede emplearse un esquema alternativo, el cual consta de: ifosfamida (1.8 g/m<sup>2</sup>/día por cinco días, intravenoso, + mesna al 100%), adriamicina (30.0 mg/m<sup>2</sup>/día por dos días, intravenoso, y se administra en 1 hora), y FECG (5.0 µg/Kg/día por 10 días, subcutáneo con técnica estéril). Este esquema se administra cada 21 días, con evaluación cada dos ciclos.

#### 4.2. Ifosfamida.

Ifosfamida, N,3-bis(2-cloroetil)-tetrahidro-2H-1,3,2-oxazafosforin-2-amin-2-óxido, es una oxazafosforina perteneciente a la clase de fármacos alquilantes con un amplio espectro de actividad antineoplásica, y es un componente de primera línea para el tratamiento de diversos tumores sólidos, sarcomas de partes blandas y neoplasias hematológicas en adultos y niños (Kerbusch, 2000.a.) (Kerbusch, 2000.b.).

El agente bisalquilante ifosfamida, se introdujo en ensayos clínicos en la década de 1970; pero su uso temprano fue limitado debido a los graves efectos urotóxicos que produce (cistitis hemorrágica) (Storme, 2005).

Los principales eventos adversos producidos por ifosfamida que se han reportado incluyen urotoxicidad, mielosupresión, náuseas, vómitos, neurotoxicidad y nefrotoxicidad, factores que son limitantes para sugerir una quimioterapia basada en ifosfamida (Huang, 1999).

#### 4.2.1. Estructura.

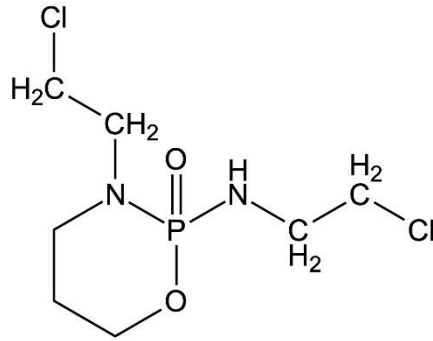


Figura 2.

Estructura molecular de ifosfamida.

#### 4.2.2. Propiedades fisicoquímicas.

Descripción: Polvo cristalino blanco.

Fórmula molecular:  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$

Peso molecular: 261.085961 g/mol.

Punto de fusión: 39.0 – 41.0 °C.

Solubilidad: Soluble en agua, 3 780.0 mg/L.

#### 4.2.3. Farmacocinética.

##### 4.2.3.1. Absorción y distribución.

Se ha reportado que, en pacientes adultos, ifosfamida se absorbe bien tras ser administrada oralmente, y tiene una biodisponibilidad del 85% - 100%. Su volumen de distribución total corporal es 0.5 - 0.8 Kg/L. Su interacción con proteínas plasmáticas es del 20%, aunque la interacción de los metabolitos alquilantes se aproxima al 50% (Fleming, 1997).

#### 4.2.3.2. Metabolismo.

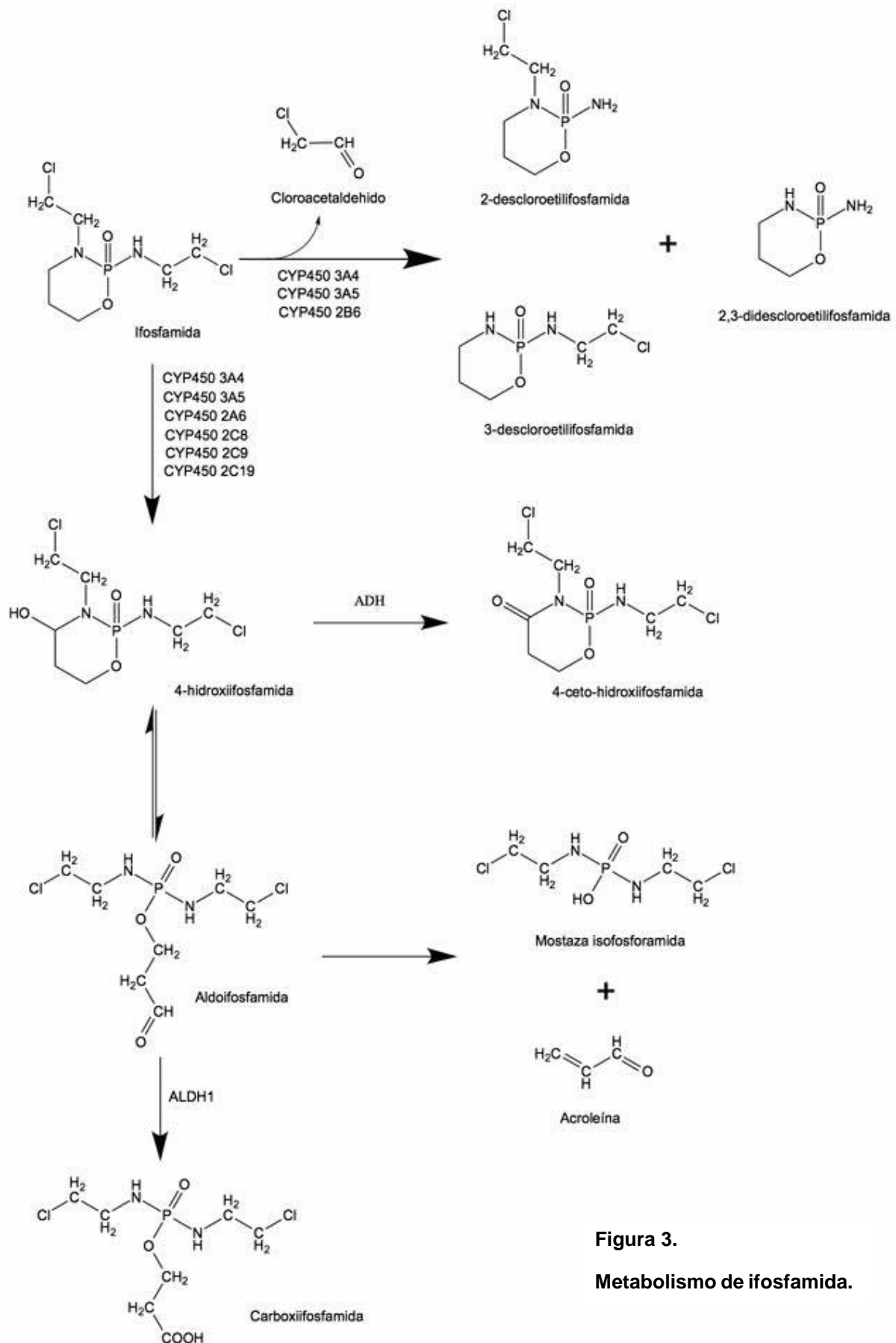
Ifosfamida es un profármaco: su metabolismo es necesario para obtener su forma activa.

Tal como se ilustra en la Figura 3, la reacción inicial de activación hepática de ifosfamida a su molécula farmacológicamente activa está mediada por el sistema citocromo P450, específicamente por las isoformas CYP hepáticas CYP 3A4 y CYP 3A5, con menor contribución de CYP 2A6, CYP 2C8, CYP 2C9 y CYP 2C19 (Lowenberg, 2014).

La hidroxilación en el carbono 4 del anillo oxazafosforina produce la 4-hidroxiifosfamida, la cual se encuentra en equilibrio con su forma tautomérica, la aldoifosfamida; ésta última forma puede ser oxidada por una enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH1) para formar la carboxiifosfamida, un metabolito inactivo, o puede ser descompuesto espontáneamente mediante una reacción retro de Michaël para formar la acroleína y la mostaza isofosforamida, siendo esta última la fracción activa (Storme, 2005).

La 4-hidroxiifosfamida también puede ser oxidada por una enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), formando la 4-ceto-hidroxiifosfamida, otro metabolito inactivo (Lowenberg, 2014).

La mostaza isofosforamida es un agente bisalquilante, mientras que la acroleína es la responsable de generar los eventos de urotoxicidad. Hasta el 50% de una dosis de ifosfamida se somete a una reacción de N-desalquilación oxidativa, mediada por CYP 3A4, CYP 3A5 y CYP 2B6, resultante de la pérdida de grupos cloroetil en las cadenas laterales y producir 2-descloroetilifosfamida (N<sup>2</sup>-DCE-IFM), 3-descloroetilifosfamida (N<sup>3</sup>-DCE-IFM), y 2,3-didescloroetilifosfamida (N<sup>2</sup>,N<sup>3</sup>-diDCE-IFM). Una cantidad equimolar de cloroacetaldehído (CAA) se forma en cada una de estas reacciones de N-desalquilación. Este metabolito se sabe que es el responsable tanto de la nefrotoxicidad y neurotoxicidad metabólica que puede estar asociada con el tratamiento (Storme, 2005).



**Figura 3.**  
**Metabolismo de ifosfamida.**

Los niveles plasmáticos de cloroacetaldehído en pacientes con cáncer tratados con ifosfamida son a menudo difíciles de determinar debido a la falta de un método analítico suficientemente sensible y específico (Huang, 1999).

#### 4.2.3.3. Eliminación.

En pacientes adultos se ha reportado que a dosis altas (3.8 - 5.0 g/m<sup>2</sup>), el 50% de una dosis de ifosfamida inalterada se elimina en orina. Si la dosis es inferior a 3.0 g/m<sup>2</sup>, la fracción eliminada es del 20%. La vida media de eliminación de ifosfamida es de 15 horas a dosis de 3.8 - 5.0 g/m<sup>2</sup>, y menos de 6 horas a dosis de 1.0 - 2.0 g/m<sup>2</sup>, sugiriendo así, una farmacocinética dosis-dependiente (Fleming, 1997).

#### 4.2.4. Farmacodinamia.

##### 4.2.4.1. Mecanismo de acción.

Se cree que el principal mecanismo de acción de ifosfamida es la interacción directa de la mostaza isofosforamida con el DNA en el núcleo de las células. También se han sugerido otros mecanismos, en los cuales la mostaza isofosforamida reduce la proliferación de las células cancerosas a través de la activación de las vías proapoptóticas y la reducción de las vías inflamatorias y antiapoptóticas.

La mostaza isofosforamida se transloca en el núcleo, probablemente, por difusión pasiva. En el núcleo, reacciona con el DNA mediante unión covalente de sus grupos alquilo altamente reactivos con los grupos nucleofílicos del DNA, formando entrecruzamientos entre las cadenas (interstrand cross-links) (Lowenberg, 2014). La unión del alquilante y el DNA se efectúa habitualmente a nivel del nitrógeno 7 de la guanina, formándose una 7-alquilguanina; a partir de esta unión puede ocurrir que la base se destruya como tal o que se una a otra base no complementaria, dando lugar a mutaciones celulares y por consiguiente la pérdida de información genética (Escobar, 2011).

Estas rupturas de la cadena de DNA resultan en la incapacidad de sintetizar DNA y conducen a la apoptosis celular mediada por la cascada de caspasas.

Ifosfamida emplea la cascada de caspasas para inducir la muerte de células tumorales. Ifosfamida aumenta los niveles de expresión génica de las caspasas 3 y 9, mientras que disminuye la expresión de BCL2 (un inhibidor de la caspasa), y bloquea la liberación del citocromo C de la mitocondria (Lowenberg, 2014).

La determinación cuantitativa de las oxazafosforinas como ifosfamida y sus metabolitos es difícil, debido a su alta polaridad y a sus propiedades químicas y térmicas. Por lo tanto, varios métodos analíticos se han desarrollado utilizando cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución en combinación con diferentes técnicas de detección.

### 4.3. Cromatografía.

La cromatografía es una técnica analítica de separación en la que una muestra compleja se desplaza en una fase móvil, la cual puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, a través de una fase estacionaria, fijada a una superficie sólida o una columna. Los componentes de dicha muestra se separarán de acuerdo a la afinidad que éstas tengan con la fase estacionaria, de modo que las moléculas que tengan mayor afinidad por la fase estacionaria se desplazarán lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que el resto de las moléculas cuya afinidad por la fase estacionaria es débil serán desplazadas con mayor facilidad por la fase móvil (Alfonso, 2008).

#### 4.3.1. Cromatografía líquida (HPLC y UPLC).

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada en la actualidad debido a su sensibilidad, a su adecuación para realizar determinaciones cuantitativas exactas y a su gran aplicabilidad a diferentes tipos de sustancias.

En principio se utilizó una alta presión para incrementar la velocidad lineal y reducir la difusión de los compuestos en el interior de las columnas empaquetadas, mejorando así la resolución de la cromatografía. Se emplearon para ello bombas capaces de generar hasta 500 psi, y la técnica de cromatografía líquida recibió el nombre de high pressure liquid chromatography (cromatografía líquida de alta presión). En la década de los 70 la tecnología empleada experimentó grandes avances, con bombas capaces de generar hasta 6 000 psi, mejores inyectores y detectores, y columnas con partículas más pequeñas, en ese momento se mantuvo el acrónimo de HPLC; pero el nombre pasó a ser high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución). En la actualidad para incrementar la resolución, la velocidad y la sensibilidad en la

cromatografía líquida se han introducido columnas con partículas más pequeñas e instrumentos adecuados para bombear la fase móvil a presiones del orden de 15 000 psi, o incluso 100 000 psi, recibiendo esta tecnología el nombre de UPLC, ultra performance liquid chromatography (cromatografía líquida de ultra alta resolución) (Alfonso, 2008).

Los componentes de un equipo de cromatografía líquida incluyen:

- Sistema de bombeo: La función de un sistema de bombeo en cromatografía líquida es la de generar elevadas presiones, producir un flujo libre de pulsaciones, conseguir un amplio intervalo de caudales con elevada reproducibilidad y estar dotado de componentes resistentes a la corrosión.  
Las bombas empleadas pueden ser de distintos tipos, siendo las más comunes las recíprocas, las de desplazamiento y las neumáticas.
- Sistema de inyección de la muestra: Los sistemas de inyección de la muestra realizan la introducción de la muestra sin despresurizar el sistema y sin sobrecargar la columna.
- Detectores: Un detector es un instrumento con la capacidad de percibir la presencia de un compuesto y enviar la señal eléctrica correspondiente a un ordenador de registro.
- Columnas: Es el elemento esencial donde se efectúa la separación cromatográfica. La fase estacionaria está contenida en un tubo con terminaciones, aislada por ambos lados, que debe ser capaz de contener la presión generada en su interior tanto durante su fabricación como durante su uso. Las columnas deben proporcionar un camino controlado y adecuado para la entrada y la salida de la muestra, sin fugas, con el mínimo volumen posible y sin volúmenes muertos. Además, deben ser químicamente inertes respecto al sistema de separación (muestra, fase móvil y fase estacionaria) (Alfonso, 2008).



#### 4.4. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que sirve tanto para proporcionar información sobre la composición cualitativa y cuantitativa de una mezcla compleja de moléculas (Alfonso, 2008).

Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide las masas de moléculas individuales que han sido convertidas en iones. Un espectrómetro de masas no mide la masa molecular directamente, pero mide la relación masa/carga de los iones formados de las moléculas.

##### 4.4.1. Formación del espectro de masas.

Las funciones básicas de un espectrómetro de masas son:

1. Introducir un analito químico en un alto vacío del instrumento.
2. Producir iones a partir de ese analito.
3. Separar los iones de acuerdo a sus masas moleculares.
4. Medir la abundancia de dichos iones.

El proceso de análisis por espectrometría de masas provee especificidad y alta sensibilidad para la identificación y cuantificación de compuestos debido a la selección de iones con respecto a su relación masa/carga ( $m/z$ ).

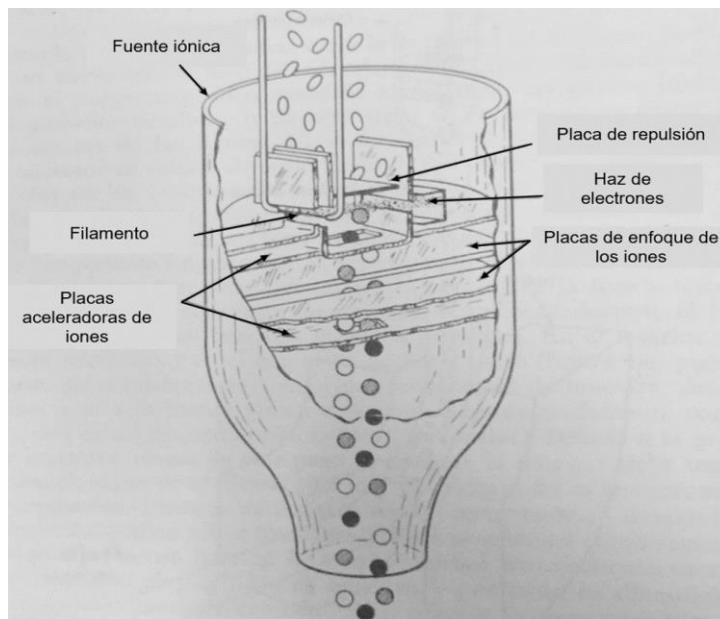
La espectrometría de masas se basa en la ionización de moléculas, las cuales ingresan al instrumento atraídas por un campo electromagnético. La especificidad del instrumento se debe a que sólo puede cuantificar moléculas cargadas, es decir, iones con carga positiva (cationes) o carga negativa (aniones), que son atraídos por dicho campo electromagnético por su relación  $m/z$ .

En esta detección, específicamente los electrones, que actúan como proyectiles, son expulsados por un filamento incandescente y atraviesan la cámara iónica en dirección de un ánodo situado en el lado opuesto. La corriente de moléculas del analito vaporizadas que entran en la fuente iónica interaccionan con el haz de electrones formando una variedad de productos, entre los cuales hay iones positivos. Estos se ven obligados a salir de la fuente iónica por un potencial de "repulsión" (o de "extracción") relativamente pequeño, y entonces son acelerados por la gran diferencia de potencial

existente entre los dos electrodos. A las placas de "repulsión" o "enfoco de iones" pueden aplicarse potenciales bajos para producir un haz bien definido de iones positivos, de la misma forma que se enfoca el rayo de luz en un espectrofotómetro. La mayor parte de moléculas del analito y de los productos de los impactos electrónicos es eliminada continuamente por bombas de vacío conectadas en la envoltura de la fuente iónica (Figura 4).

**Figura 4.**

**Esquema de la fuente iónica de un espectrómetro de masas. Imagen tomada del libro "Interpretación de los espectros de masas" de Juan María Salietti Vinué.**

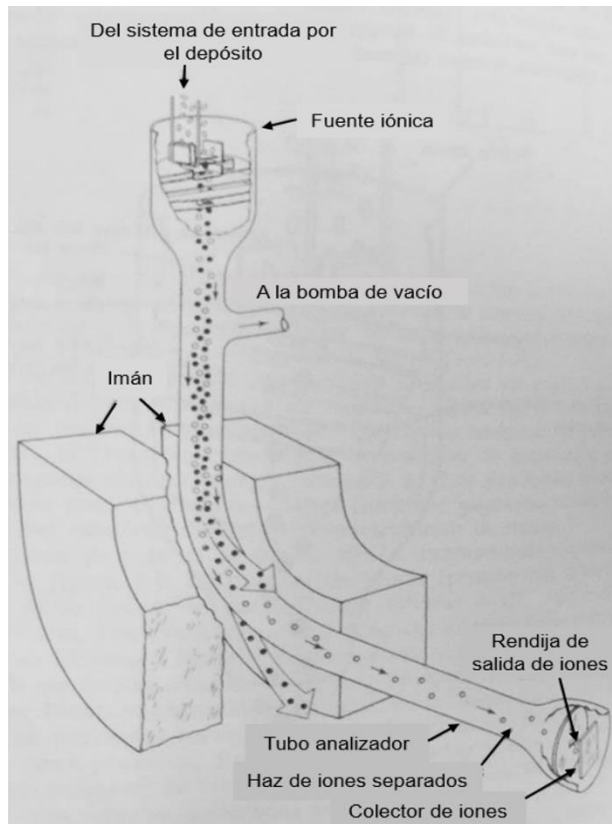


El haz iónico que sale colimado de ésta, puede dividirse según las masas respectivas (en realidad, relación de masa a carga,  $m/z$ ) de los iones por una variedad de técnicas, que reciben nombres diversos: deflexión magnética, tiempo de vuelo, radiofrecuencia, resonancia en ciclotrón, y enfoque cicloidal.

Los iones positivos que chocan con el colector producen una corriente de electrones proporcional a la abundancia iónica, y esta corriente puede medirse con gran precisión y sensibilidad por técnicas electrónicas modernas. La amplificación de la señal iónica de un multiplicador puede permitir la detección de un solo ión llegando al colector (Figura 5).

Así, aunque la eficacia de la ionización y transmisión del espectrómetro de masas es de un sólo ión llegando al colector por cada  $10^6$  moléculas de muestra, pueden obtenerse excelentes espectros partiendo de submicrogramos de muestra. Por esto, el método

puede utilizarse en una gran variedad de problemas de investigación donde las herramientas estructurales corrientes no tienen suficiente sensibilidad (Vinué, 1969).



**Figura 5.**

**Separación del haz iónico por deflexión en un campo magnético.**

**Imagen tomada del libro "Interpretación de los espectros de masas" de Juan María Saliotti Vinué.**

Los espectrómetros de masas tienen siete componentes principales: un sistema de entrada, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío, un sistema de control y un sistema de datos.

#### 4.4.2. Tipos de Ionización.

Se han desarrollado diferentes técnicas para efectuar la producción de iones. (Shraed, 2014). Las principales se enlistan a continuación:

- Ionización electrónica.
- Ionización química.
- Ionización de campo.
- Desorción de campo.
- Fotoionización.
- Electrospray.
- Bombardeo con átomos rápidos.
- Ionización química a presión atmosférica.

El tipo de ionización que se empleó en este proyecto fue ionización por electrospray, el cual se describe a profundidad en el siguiente punto.

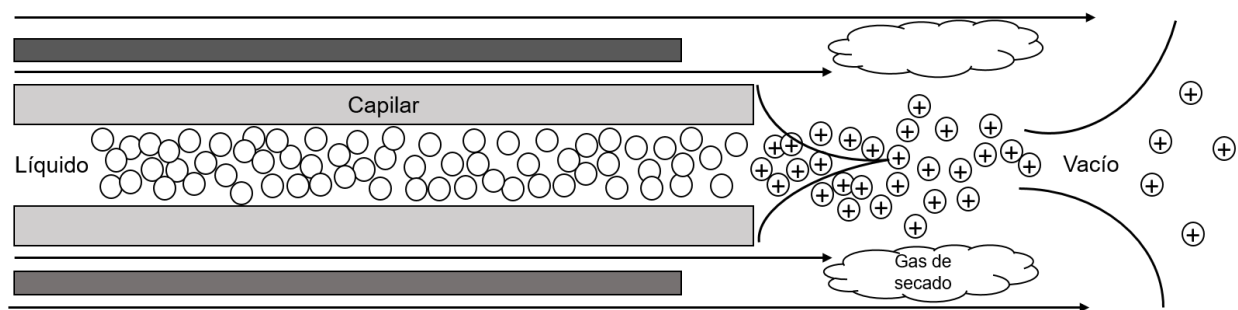
##### 4.4.2.1. Ionización por electrospray.

La ionización por electrospray es un proceso por el cual se forman los iones de un analito en el estado líquido y luego se transfieren rápidamente a la fase de gas de un espectrómetro de masas. Esto es particularmente útil para sustancias de alto peso molecular y para el análisis del eluyente de un cromatógrafo de líquidos. El proceso es iniciado por la aplicación de un campo eléctrico a la punta de un capilar que contiene la solución del analito. Los iones formados, de esta manera, pueden poseer carga positiva o negativa, dependiendo de la polaridad de la tensión aplicada. El alto campo eléctrico en la punta del capilar provoca que la solución que emerge del mismo, asuma la forma de un cono (llamado cono de Taylor). Al mismo tiempo, el gas de nebulización comienza el proceso de evaporación del disolvente. La evaporación es favorecida, además, por una segunda corriente de gas, llamado gas de secado. Esta corriente de cada vez más pequeñas gotitas se dirige hacia una pequeña abertura en el vacío del espectrómetro de masas, donde se completa la evaporación, dejando iones que pueden ser enfocados y separados según su masa, produciendo el espectro de masas. Puesto que la ionización se produce en el estado líquido, el ión específico

formado es altamente dependiente no sólo del analito, sino también del disolvente y otras especies presentes en el líquido (Figura 6). Se debe recordar que el disolvente se ioniza, así como cualquier analito que está presente (Shraed, 2014).

**Figura 6.**

**Esquema del proceso de ionización por electrospray.**  
Imagen adaptada del libro “Introductory mass spectrometry” de Stephen Shrader.



#### 4.4.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) consiste en el acoplamiento en serie de dos analizadores de masas y presenta cada vez un mayor número de aplicaciones. En el primer analizador se identifican una serie de iones moleculares (llamados iones padre), que pasan a una cámara de colisión en la que se bombea un gas (helio, argón, nitrógeno) que colisiona con los iones padre dando lugar a numerosos iones hijo. En el segundo analizador se obtiene el espectro de estos iones hijo.

Existen distintos modos de operación en un espectrómetro de masas en tándem, útiles para diferentes aplicaciones:

a) Espectro de ión hijo (product ion scan): en este caso en el primer analizador se selecciona una única masa/carga (ión padre), que es la que se permite pasar a la cámara de colisión. En el segundo analizador se realiza un barrido por todas las relaciones  $m/z$  detectables, determinando cuáles son las masas de los iones hijo producidos en la cámara de colisión. Este modo de funcionamiento resulta útil para caracterizar la

estructura de los iones padre, así como para determinar las condiciones adecuadas que consiguen maximizar la cantidad de cada uno de los iones hijo formados.

b) Espectro de ión precursor (precursor ion scan): en este modo de operación se selecciona una única masa/carga (ion hijo) en el segundo analizador, mientras que en el primero se realiza un barrido para determinar todos los iones padre presentes en la muestra que puedan dar lugar al ión hijo seleccionado. Este modo sirve para proporcionar información estructural, así como para confirmar datos procedentes del espectro de ión hijo.

c) Monitorización de múltiples reacciones (MRM, multiple reaction monitoring): en este caso, en el primer analizador se permite el paso de una única masa/carga (ión padre) y en el segundo se detecta la presencia de una única masa/carga (ión hijo).

d) Espectro de pérdida constante de fragmentos neutros (neutral loss scan): en este modo se realiza en ambos analizadores un barrido de manera sincronizada para detectar las parejas padre/hijo debidas a la pérdida de un fragmento o grupo funcional neutro. Este modo resulta útil para detectar en una mezcla compleja compuestos de un mismo tipo que presenten un patrón de fragmentación común (Alfonso, 2008).

#### 4.5. Cromatografía líquida-espectrometría de masas.

La combinación cromatografía líquida y espectrometría de masas fue imposible durante muchos años debido a la dificultad que representaba la eliminación del disolvente antes de que el analito de interés entrara en el alto vacío del espectrómetro de masas. Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de ionización a presión atmosférica, la combinación de ambos instrumentos ha dado lugar a una técnica relativamente nueva. El eluyente proveniente del equipo de cromatografía líquida, pasa a una fuente de iones que se encuentra a presión atmosférica, donde se generan los iones del analito y la mayor parte del disolvente se evapora rápidamente. A continuación, la nube de iones generada pasa a través de una pequeña abertura al vacío del espectrómetro de masas, lugar donde se elimina totalmente el disolvente, y finalmente los iones pueden concentrarse y sus masas moleculares pueden ser analizadas (Shraed, 2014).

#### 4.6. Dried blood spot.

El interés por la toma de muestra por dried blood spot (DBS o gota de sangre seca) ha ido en crecimiento debido a que, en comparación con la toma de muestra sanguínea venosa convencional, resulta ser un método mínimamente invasivo, de muestreo simple y cómodo para los pacientes.

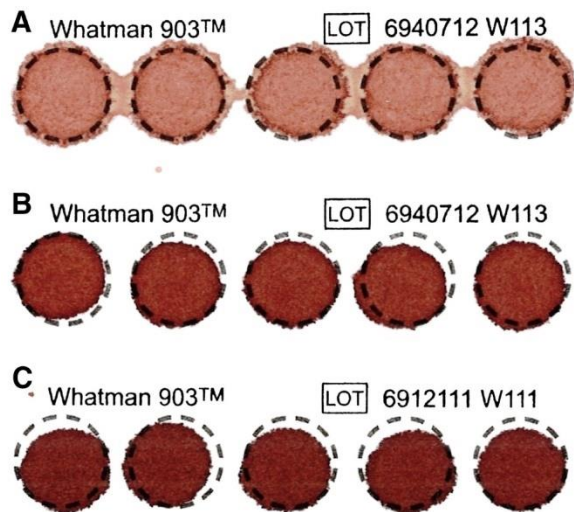
Es un método que consiste en la toma de apenas algunas gotas de sangre, obtenidas mediante la punción de un dedo o en algunos casos del talón; dichas gotas se depositan en tarjetas.

También se ha reportado que la mayoría de los analitos presentan más estabilidad en DBS que en las muestras que se someten a congelación. El almacenamiento y transporte de las muestras tomadas por DBS son convenientes, pueden ser enviadas o transportadas sin expectativas razonables de exposición para quien las manipula.

Por otro lado, contar con pequeños volúmenes de muestra, el requerimiento de una técnica de análisis lo suficientemente sensible, el hecho de que el muestreo no siempre tenga éxito, y que por lo general sólo pueda realizarse un ensayo por cada gota de sangre extraída, son algunas de las desventajas que se debaten para este método. A su vez, debe contemplarse el impacto de las variaciones de los valores de hematocrito sobre el tamaño (extensión) y homogeneidad del punto de sangre; cualquier cambio en el fabricante y/o el tipo de papel donde se depositan las muestras sanguíneas, requiere de la realización de una validación parcial (Wilhelm, 2014).

#### 4.7. Efecto del hematocrito.

Algunos autores como De Kesel, han descrito acerca del efecto del hematocrito (HCT) en análisis cualitativos en DBS (De Kesel, 2013). El hematocrito es el porcentaje en volumen de glóbulos rojos en sangre, el cual tiene un efecto considerable en la viscosidad de la sangre. Esto puede tener una influencia directa en la exactitud y la precisión en el análisis de fármacos. Este efecto es resultado de un complejo fenómeno. Las variaciones en el hematocrito causan diferente difusión de la muestra de sangre en el papel de recolección de muestra, lo que puede afectar la validez de los resultados generados por los métodos de DBS al afectar el tamaño de punto de la muestra, el tiempo que tarda en secar la muestra, la homogeneidad (Figura 7) y, en última instancia, la robustez y la reproducibilidad de los ensayos (Wilhelm, 2014).



**Figura 7.**

**Apariencia de manchas de sangre seca a diferentes porcentajes de hematocrito.**

- A. HCT = 18 %
- B. HCT = 35 %
- C. HCT = 50 %

**Imagen tomada del artículo Therapeutic drug monitoring by dried blood spot: progress to date and future directions.**



#### 4.8. Validación de métodos analíticos.

La norma oficial vigente NOM-177-SSA1-2013 define validación como “la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado”. En el apartado 9.1, donde se hace referencia a la validación de métodos analíticos, se enumeran los parámetros que deben cumplirse para que los resultados que se emitan puedan considerarse precisos, exactos, reproducibles y con todo lo anterior confiables. A continuación, se enlistan y definen los parámetros contemplados en este proyecto:

**Linealidad:** puede definirse como la capacidad que tiene un método analítico para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo definido.

**Selectividad:** se define como la capacidad que tiene un método analítico para diferenciar y cuantificar un analito específico en presencia de otros compuestos en una muestra. La norma oficial vigente establece la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. Evaluar el método contra posibles interferencias (metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

**Precisión:** se define como el grado de concordancia que existe entre los resultados que se obtienen de un método cuando éste se aplica de manera repetida. Se determina como repetibilidad y reproducibilidad:

- a. **Repetibilidad:** es la precisión de un método analítico que expresa la variación que existe en un mismo laboratorio, obtenida de determinaciones independientes y realizadas bajo las mismas condiciones de operación. La norma oficial exige analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: muestra control baja, media y alta (MCB, MCM y MCA, respectivamente) del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de

calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor del 15%.

- b. Reproducibilidad intralaboratorio: es la precisión de un método analítico que expresa la variación de un mismo laboratorio obtenida de determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipos y analista. La exigencia de la norma oficial es analizar por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos dos días, las muestras control MCB, MCM y MCA. El coeficiente de variación obtenido no debe ser mayor del 15%.

Exactitud: se trata del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, los cuales deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

Límite inferior de cuantificación: es la concentración más baja que puede cuantificarse de un determinado analito. La norma oficial exige analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

Estabilidad: son las condiciones de temperatura y tiempo en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. En este parámetro, la norma oficial vigente establece que debe evaluarse la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando los siguientes puntos:

- a. Condiciones de almacenamiento: se evalúa la estabilidad del o los compuestos presentes en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.
- b. Ciclos de congelación-descongelación: se evalúa la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente

muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras.

## 5. Desarrollo experimental.

### 5.1. Reactivos.

Estándar de ifosfamida adquirido de Sigma-Aldrich Co® (St. Louis MO, USA); estándares de monohidrato de ciclofosfamida, sulfato de vincristina, etopósido y carboplatino adquiridos de MP Biomedicals® (Fountain Pkwy, Solon OH, USA). Estándar de ondansetrón proveniente de Toronto Research Chemicals Inc® (Toronto, Canada).

Metanol y acetonitrilo grado LC-MS, obtenidos de EMD Millipore Co® (Venezuela). Propanol proveniente de J.T. Baker® (Xalostoc, Mexico). Acetato de etilo grado HPLC, acetato de amonio, cloroformo y ácido fórmico de Merck® (Darmstat, Germany). Formiato de amonio, adquirido de Sigma Adrich® (St. Louis MO, USA). Ácido fórmico

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

## 5.2. Desarrollo del método.

En primera instancia, se realizó la consulta literaria a cerca de las condiciones cromatográficas ya probadas en estudios previos de cuantificación de ifosfamida o sus metabolitos, buscando así las condiciones cromatográficas óptimas para el desarrollo del método (Tabla 5).

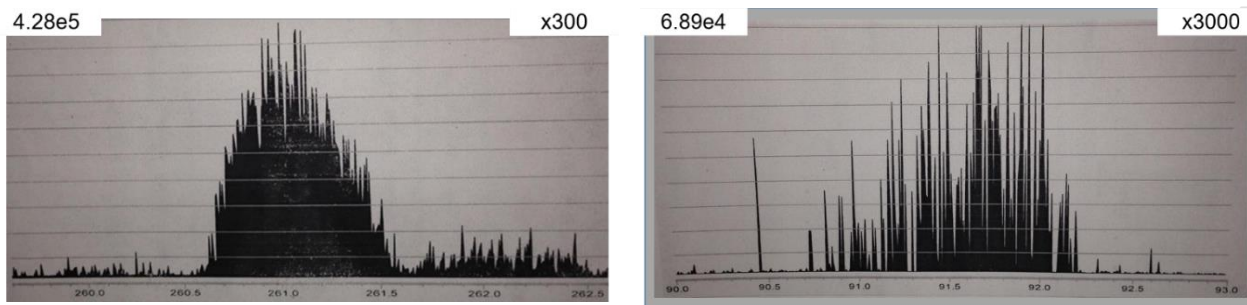
**Tabla 5.**

Autores.	Título del artículo.	Año.	Especificaciones.
Kerbusch, T., Huitema, A. D. R., Jeuken, M.-J. J., Derraz, J., Tibben, M. M., Beijnen, J. H.	Simultaneous determination of ifosfamide and its metabolite ifosforamide mustard in human plasma by high performance liquid chromatography.	2000	Detección: UV, $\lambda=276.0$ nm. Columna: Prodigy 5 C8, $5.0 \mu\text{m}$ , $250.0 \mu\text{m} \times 40.0$ mm. Fase móvil: Acetonitrilo : Solución reguladora de pH $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH=8.0), 32 : 68 v/v.
Larson, R. R., Khzaeli, M.B., Dillon, H. K.	Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents.	2003	Detección: UV-Visible, $\lambda=207.0$ nm. Columna: Waters Symmetry C8, $3.5 \mu\text{m}$ , $150.0$ mm x $4.6$ mm. Fase móvil: Acetonitrilo : Solución reguladora de pH $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH=6.0), 22.75 : 77.25 v/v.
Storme, T., Mercier, L., Deroussent, A., Re, M., Martens, T., Royer, J., Bourges, P., Vassal, G., Paci, A.,	Liquid chromatography–mass spectrometry assay for quantitation of ifosfamide and its <i>N</i> -deschloroethylated metabolites in rat microsomal medium.	2005	Columna: Nucleosil C18, $5.0 \mu\text{m}$ , $125.0$ mm x $4.0$ mm. Fase móvil: Formiato de amonio acuoso $2.0$ mM (pH=5.7) : metanol, 80 : 20 v/v.
Aleksa, K., Nava-Ocampo, A., Koren, G.	Detection and quantification of (R) and (S) Dechloroethylifosfamide Metabolites in Plasma from Children by Enantioselective LC/MS/MS.	2009	Columna: CHIRAL-AGP, $5.0 \mu\text{m}$ , $150.0$ mm x $4.0$ mm. Fase móvil: Acetato de amonio acuoso $10.0$ mM (pH=7.0) y acetato de amonio acuoso $30.0$ mM (pH=4.0).
Li, F., Patterson, A.D., Höfer, C. C., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J., Idle, J. R.	Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC–ESI-QTOFMS-based metabolomics.	2010	Columna: Acquity UPLC BEH C18 (Waters). Fase móvil: Ácido fórmico $0.1\%$ y acetonitrilo con ácido fórmico $0.1\%$ .
Lima-Sanson, A., Rennó Silva, S. C., Gonçalves, Martins, M. C., Giusti-Paiva, A., Penido Maia, P., Martins, I.	Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography–diode array–ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma.	2011	Detección: UV, $\lambda=195$ y $265$ nm. Columna: C18, $5.0 \mu\text{m}$ , $250.0$ mm x $4.6$ mm (Shimadzu). Fase móvil: Agua (pH=4.0) : Acetonitrilo : Metanol, 68 : 19 : 13 v/v/v.
Deroussent, A., Rodríguez. S., Martelli. S., Seck, A., Dubus-Daudigeos, E., Didier, D., Vassal, G., Paci, A.	Quantification of dimethyl-ifosfamide and its <i>N</i> -deschloropropylated metabolite in mouse plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry.	2011	Columna: C18, $5.0 \mu\text{m}$ , $100.0$ mm x $2.1$ mm. Fase móvil: Metanol : Formiato de amonio $5.0$ mM (pH=5.5), 60 : 40 v/v.

Teniendo como antecedente los artículos anteriores, se probaron diferentes fases móviles y diferentes proporciones de las mismas, contemplando al ácido fórmico 0.1% v/v y 1.0% v/v en solución acuosa, acetato de amonio 5.0 mM, formiato de amonio 5.0 mM, cada uno en combinación con acetonitrilo y metanol de manera individual y en diferentes proporciones. La elección de los componentes de la fase móvil se realizó durante la optimización de la ionización (“tunning”), obteniendo la mejor ionización con formiato de amonio 5.0 mM en combinación con metanol en proporción 40 : 60 v/v, tal como se muestra en las figuras 10 y 11 al compararlas con las figuras 8 y 9. Para realizar la extracción, se probó la precipitación directa con metanol y acetonitrilo, la extracción liquido-líquido con acetato de etilo y cloroformo (80 : 20 v/v), cloroformo (como único agente de extracción) y acetato de etilo. Se observó que la extracción más eficiente y limpia se obtuvo empleando acetato de etilo. Sin embargo, también se observó que el acetonitrilo mejoraba aún más la limpieza de la muestra, siendo ésta combinación la elección para realizarla.

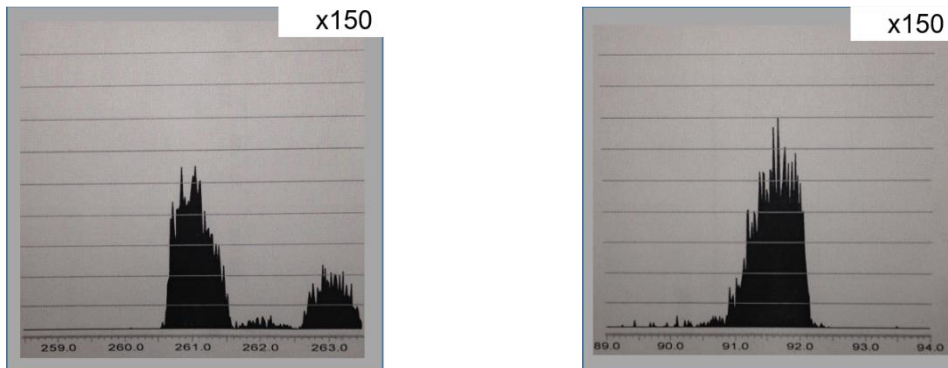
**Figuras 8 y 9.**

**Espectrogramas del “tunning” (lón padre e lón hijo, respectivamente) empleando como fase móvil acetato de amonio 5.0 mM y acetonitrilo 50 : 50 v/v.**



**Figuras 10 y 11.**

**Espectrogramas del “tunning” (lón padre e lón hijo, respectivamente) empleando como fase móvil formiato de amonio 5.0 mM y metanol, proporción 40:60 v/v.**



### 5.3. Condiciones espectrométricas.

El equipo de UPLC se acopló a un espectrómetro de masas Micromass Quattro Micro en tandem (Waters Micromass®, Manchester, UK), el cual operó en modo de ionización positiva por electrospray (ESI+). La detección de los analitos de interés se realizó empleando la modalidad de monitorización de reacción múltiple; la transición de iones optimizada de ifosfamida fue de  $m/z1+ 260.99 > 91.63$  Th y para ciclofosfamida  $m/z1+ 261.00 > 139.90$  Th. Las condiciones espectrométricas fueron:

\* Voltage del cono: 25.0 V, en ambos analitos.

\* Energía de colisión para ifosfamida: 25.0 V.

\* Energía de colisión para ciclofosfamida: 20.0 V.

Los datos obtenidos fueron procesados mediante el software MassLynx® 4.1 (Waters Micromass, Beverly, MA, USA).

#### 5.4. Condiciones cromatográficas.

La separación de los compuestos se llevó a cabo en un equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC) modelo AcQuity (Waters Co.®, Milford MA, USA), empleando una columna Acquity UPLC BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 2.1 mm, (Waters Co.®, Milford MA, USA), cuyas condiciones cromatográficas fueron:

\* Temperatura de la columna: 40.0 °C.

\* Temperatura del inyector automático: 15.0 °C.

\* Flujo: 220.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

\* Velocidad de infusión: 10.0  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

\* Tiempo de corrida analítica: 3.5 min.

\* Tiempo de retención de ifosfamida: 1.96 min.

\* Tiempo de retención de ciclofosfamida: 2.0 min.

\* Fase móvil: Conformada por una fracción A): Formiato de amonio (5.0 mM) y una fracción B): metanol y acetonitrilo en una proporción de 80 : 20 v/v. Las fracciones A:B guardan una relación 40 : 60 v/v, de modo que la relación final de formiato de amonio:metanol:acetonitrilo es 40 : 48 : 12 v/v/v.

Con estas condiciones se obtuvieron los picos característicos de ifosfamida (Figura 12).

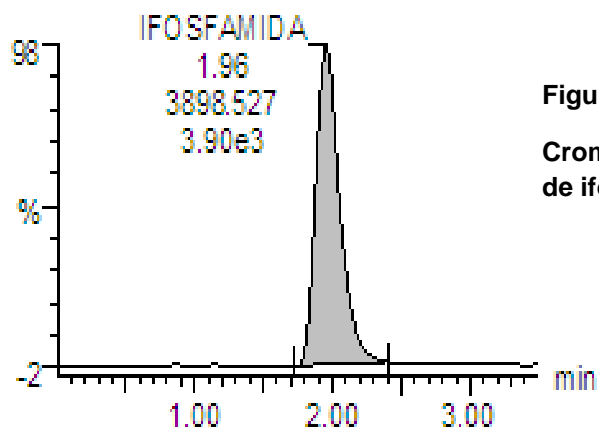


Figura 12.  
Cromatograma  
de ifosfamida.



### 5.5. Elaboración de estándares y controles.

Inicialmente, se prepararon de forma individual las soluciones stock de ifosfamida (solución A) de concentración 1.0 mg/mL y ciclofosfamida de concentración 1.0 mg/mL en metanol 100%. De la solución A de ifosfamida se prepararon las disoluciones de trabajo 20 X en metanol 70%, para obtener las soluciones de los calibradores de concentraciones de 2.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100.0, 150.0 y 200.0 µg/mL.

Las concentraciones de las soluciones para los puntos de control bajo (PC1), medio (PC2) y alto (PC3) fueron de 6.0, 80.0 y 160.0 µg/mL, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6.

No.	Volumen de la solución stock (µL de solución A)	Volumen final (mL) con metanol 70% v/v	Concentración de la disolución de trabajo 20 X (µg/mL)
1	20.0	10.0	2.0
2	100.0	10.0	10.0
3	200.0	10.0	20.0
4	500.0	10.0	50.0
5	1 000.0	10.0	100.0
6	1 500.0	10.0	150.0
7	2 000.0	10.0	200.0
8	60.0	10.0	6.0
9	80.0	10.0	80.0
10	1 600.0	10.0	160.0

Solución A: Ifosfamida [1.0 mg/mL] en metanol 70% v/v

A continuación, se prepararon las disoluciones correspondientes a cada uno de los puntos de la curva de calibración (CC1-CC7), empleando la matriz biológica sangre a dos concentraciones de hematocrito (30% o 45%), colocando 475.0 µL de sangre total (HTC 30% o 45% según el caso), y 25.0 µL de la disolución de trabajo 20 X de ifosfamida correspondiente, de modo que se obtuvieran concentraciones de 100.0, 500.0, 1 000.0, 2 500.0, 5 000.0, 7 500.0 y 10 000.0 ng/mL para los calibradores, y concentraciones de 300.0, 4 000.0 y 8 000 ng/mL para los puntos control (Tabla 7).

**Tabla 7.**

No.	Nivel	Volumen de la solución de trabajo 20 X (μL)	Volumen de sangre con HTC de 30% o 45% (μL)	Concentración final (ng/mL)
1	CC1	25.0	475.0	<b>100.0</b>
2	CC2	25.0	475.0	<b>500.0</b>
3	CC3	25.0	475.0	<b>1 000.0</b>
4	CC4	25.0	475.0	<b>2 500.0</b>
5	CC5	25.0	475.0	<b>5 000.0</b>
6	CC6	25.0	475.0	<b>7 500.0</b>
7	CC7	25.0	475.0	<b>10 000.0</b>
8	PC1	25.0	475.0	<b>300.0</b>
9	PC2	25.0	475.0	<b>4 000.0</b>
10	PC3	25.0	475.0	<b>8 000.0</b>

Posteriormente, 40.0 μL de disolución de cada punto de las curvas de calibración se depositaron por separado en tarjetas Whatman 903<sup>®</sup> (tarjetas Guthrie). Las tarjetas se dejaron secar en posición horizontal por 6 horas a temperatura ambiente. Una vez secas, se almacenaron debidamente etiquetadas en bolsas de plástico de baja permeabilidad, acompañadas de material secante, a temperatura ambiente, a 4.0 °C y -80.0 °C, hasta el momento de analizarse. Los puntos control bajo, medio y alto (300.0, 4 000.0 y 8 000.0 ng/mL, respectivamente) se prepararon de la misma forma que la curva de calibración, empleando las respectivas soluciones iniciales 20 X.

## 5.6. Procesamiento de las muestras (extracción).

De las tarjetas Whatman 903<sup>®</sup> (tarjetas Guthrie) anteriormente mencionadas, se cortaron 5 discos de 3.0 mm de diámetro de cada círculo de la tarjeta impregnado con la muestra de sangre seca, empleando una perforadora manual McGill, Inc<sup>®</sup>. Los discos se colocaron en un microtubo con capacidad de un volumen de 1.5 mL y posteriormente se agregaron 20.0  $\mu$ L de solución de ciclofosfamida de concentración 3000.0 ng/mL en metanol al 70% v/v como estándar interno. El contenido del microtubo se agitó por 10 segundos y luego se adicionaron 100.0  $\mu$ L de acetonitrilo y 200.0  $\mu$ L de acetato de etilo; nuevamente se sometió a agitación durante 2 minutos en un agitador vórtex y posteriormente se sometió a sonicación por 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se sometieron a centrifugaron a 12 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La fase orgánica se decantó y el remanente se evaporó a 40.0 °C bajo corriente de oxígeno en otro tubo. La muestra extraída y seca se reconstituyó con 200.0  $\mu$ L de una solución de agua : metanol : acetonitrilo, solución que guarda una proporción 40 : 48 : 12 v/v/v. Finalmente, se inyectaron 8.0  $\mu$ L de la muestra anterior al sistema cromatográfico.

## 6. Resultados.

### 6.1. Variación de hematocrito.

Se realizó por triplicado la determinación del efecto de la densidad de hematíes mediante la cuantificación de una misma concentración de ifosfamida (5000.0 ng/mL), preparada en diferentes porcentajes de hematocrito: 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50% y 55%; primero, las muestras fueron cuantificadas con la curva de HTC 30% y, posteriormente, con la curva de HTC 45%. Como puede observarse en las Tablas 8 y 9, cuando se cuantifican las muestras con un HTC del 20% al 30% con la curva correspondiente a HTC de 30%, los valores obtenidos presentan una desviación del valor nominal menor al 10% y un %CV menor a 15%, mientras que, si dichas muestras se cuantifican con la curva de HTC de 45%, se sobreestiman las concentraciones nominales hasta por un 26%, aun cuando sus %CV son inferiores al 10%. Para las muestras de HTC del 30% al 55%, cuando se cuantificaron con la curva de HTC de 30%, se encontraron valores inferiores al valor nominal (subestimación) de hasta del 26% con %CV los Protocolos Técnicos Cáncer en Niños menor al 10%; estas muestras cuantificadas con la curva 45% presentaron valores de %CV menores al 5% y desviaciones del valor nominal de menos del 5%.

De lo anterior se puede concluir que muestras que tengan un hematocrito entre 20% y 35% se deben cuantificar con una curva de calibración preparada con hematocrito de 30%, mientras que muestras con un hematocrito entre 30% y 45% deben cuantificarse con una curva de calibración preparada con hematocrito de 45%. Cabe señalar que muestras que tengan 30% y 35% de hematocrito, pueden ser cuantificadas ya sea con la curva preparada de HTC de 30% o 45%, ya que en estos rangos los coeficientes de variación son bajos respecto al valor nominal.

Este ensayo fue relevante dado que demostró que para cuantificar ifosfamida es necesario conocer el valor del porcentaje de hematocrito de la muestra de un paciente, pues la variación de la densidad de los hematíes afecta la determinación de la concentración de ifosfamida presente en la muestra.

**Tabla 8. Determinación de ifosfamida a diferentes porcentajes de hematocrito respecto a un hematocrito de 30%**

Ensayo	Porcentaje de hematocrito en muestra (%)						
	20	25	30	35	40	45	50
	Concentración de ifosfamida (ng/mL)						
1	4 535.3	4 823.0	4 980.7	5 184.5	6 365.3	6 055.9	6 289.9
2	4 579.3	4 796.3	5 013.9	5 161.9	6 437.8	6 603.1	7 210.4
3	4 472.0	4 871.2	4 984.9	5 140.9	5 944.4	6 679.9	6 767.3
Promedio ± D.S.	4 528.9 ± 53.9	4 830.2 ± 38.0	4 993.2 ± 18.0	5 162.4 ± 21.8	6 249.2 ± 266.4	6 446.3 ± 340.3	6 755.9 ± 460.4
%CV	1.2	0.8	0.4	0.4	4.3	5.3	6.8
%Desviación	10.4	3.5	0.1	-3.1	-20.0	-22.4	-26.0

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

**Tabla 9. Determinación de ifosfamida a diferentes porcentajes de hematocrito respecto a un hematocrito de 45%**

Ensayo	Porcentaje de hematocrito en muestra (%)						
	20	25	30	35	40	45	50
	Concentración de ifosfamida (ng/mL)						
1	3 536.9	3 736.0	4 175.8	4 806.5	4 953.1	5 063.3	4 985.4
2	3 849.9	3 836.1	4 476.9	4 765.1	4 908.7	4 925.0	5 192.2
3	3 683.4	4 011.9	4 292.9	4 915.9	4 835.9	4 990.8	5 181.8
Promedio ± D.S.	3 690.1 ± 156.6	3 861.3 ± 139.7	4 315.2 ± 151.8	4 829.2 ± 77.9	4 899.2 ± 59.2	4 993.0 ± 69.2	5 119.8 ± 116.5
%CV	4.2	3.6	3.5	1.6	1.2	1.4	2.3
%Desviación	26.2	22.8	13.7	3.4	2.0	0.1	-2.4

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

## 6.2. Linealidad del método.

Con base a los resultados obtenidos, se logró determinar que el método tiene un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones de 100.0 a 10000.0 ng/mL, valores que se determinaron construyendo tres curvas de calibración por tres días consecutivos, para ambos hematocritos (Tabla 10 y 11).

**Tabla 10. Linealidad del método en hematocrito de 30%.**

Día	Ensayo	Concentración nominal de ifosfamida (ng/mL)						
		100.0	500.0	1000.0	2500.0	5000.0	7500.0	10000.0
		Concentración de ifosfamida en hematocrito 30% (ng/mL)						
1	1	95.3	505.0	1212.9	2803.6	4428.5	7678.2	10189.3
	2	93.2	553.8	929.5	2748.7	4540.7	7821.0	10234.0
	3	96.4	505.2	1014.7	2818.4	4795.0	7422.2	10147.1
2	4	96.8	479.2	1000.4	2855.4	4740.1	7208.3	10221.9
	5	106.0	518.6	973.8	2348.4	4774.6	7531.8	10350.7
	6	98.5	508.6	1018.4	2581.9	4651.9	7453.9	10306.8
3	7	109.1	531.4	980.5	2280.3	4493.0	7030.4	11175.3
	8	82.8	549.2	1078.1	2596.3	4502.9	8314.1	9474.7
	9	94.7	556.3	966.8	2508.8	4664.2	7471.6	10287.1
	Promedio ± D.S.	97.0 ± 7.5	523.0 ± 26.5	1019.5 ± 83.5	2615.8 ± 208.7	4621.2 ± 134.5	7547.9 ± 369.5	10265.2 ± 430.9
	%CV	7.8	5.1	8.2	8.0	2.9	4.9	4.2
	%Desviación	3.0	-4.6	-1.9	-4.6	7.6	-0.6	-2.7

D.S.: Desviación estándar, %CV: Coeficiente de variación = (Desviación estándar/Promedio) (100)

%Desviación = ((Concentración nominal – Concentración obtenida) / Concentración nominal) (100)

**Tabla 11. Linealidad del método en hematocrito de 45%.**

		Concentración nominal de ifosfamida (ng/mL)						
		100.0	500.0	1000.0	2500.0	5000.0	7500.0	10000.0
Día	Ensayo	Concentración de ifosfamida en hematocrito 45% (ng/mL)						
1	1	95.2	479.3	1095.3	2445.9	5167.3	7494.4	9821.8
	2	96.4	514.8	981.1	2511.6	5447.8	8779.0	10289.4
	3	89.9	490.4	1120.7	2492.1	5183.7	7299.5	9923.7
2	4	101.9	478.3	1025.5	2457.7	5145.1	7426.8	9964.7
	5	93.4	519.5	1018.5	2293.8	5662.8	7711.3	8300.6
	6	92.4	476.1	1062.6	2658.8	5312.8	6968.7	10017.8
3	7	101.9	478.3	1025.5	2457.7	5145.1	7426.6	9964.7
	8	93.4	519.5	1018.5	2593.8	5662.8	7711.3	9300.8
	9	96.4	476.1	1062.6	2669.8	5312.8	6968.7	10017.8
Promedio ± D.S.		95.7 ± 4.1	492.5 ± 19.6	1045.6 ± 43.5	2509.2 ± 118.0	5337.8 ± 209.7	7531.8 ± 539.9	9733.5 ± 598.1
%CV		4.3	4.0	4.2	4.7	3.9	7.2	6.1
%Desviación		4.3	1.5	-4.6	-0.4	-6.8	-0.4	2.7

D.S.: Desviación estándar, %CV: Coeficiente de variación = (Desviación estándar/Promedio) (100)

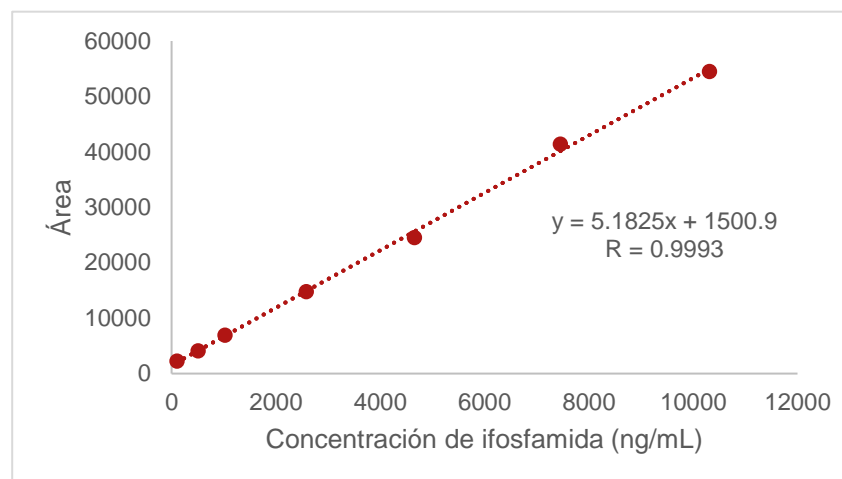
%Desviación = ((Concentración nominal – Concentración obtenida) / Concentración nominal) (100)

Al analizar de manera individual dos ensayos (Tabla 12 y 13), puede observarse que los coeficientes de correlación lineal (r) son mayores de 0.99, criterio que permite aseverar que el método tiene un buen comportamiento lineal.

**Tabla 12. Linealidad del ensayo 6 en hematocrito al 30%.**

Concentración nominal de ifosfamida	Concentración de ifosfamida en hematocrito 30% (ng/mL)	Área
100.0	98.5	2 262.4
500.0	508.6	4 088.4
1 000.0	1 018.4	6 903.0
2 500.0	2 581.9	14 788.8
5 000.0	4 651.9	24 532.9
7 500.0	7 451.9	41 368.0
10 000.0	10 306.8	54 510.8

Ecuación de la recta:  $y = 5.1825x + 1500.9$  ;  $r = 0.9993$

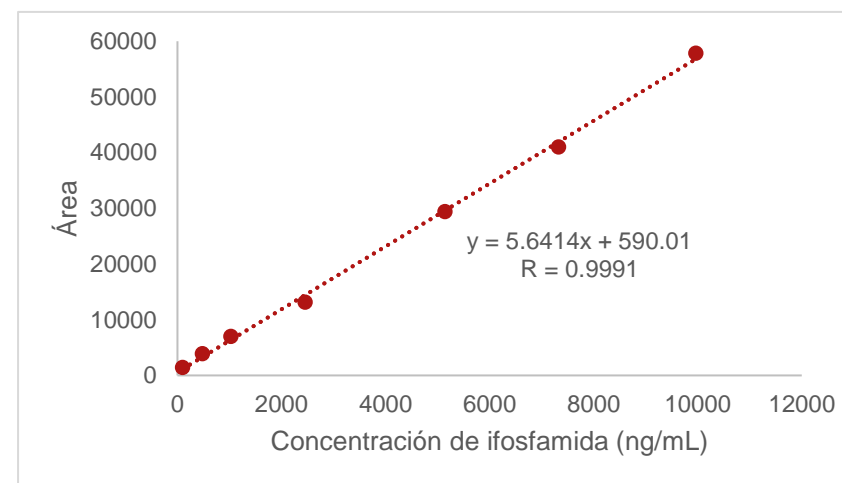


**Figura 13. Linealidad del ensayo 6 en hematocrito al 30%.**

**Tabla 13. Linealidad del ensayo 4 en hematocrito al 45%.**

Concentración nominal de ifosfamida	Concentración de ifosfamida en hematocrito 45% (ng/mL)	Área
100.0	101.9	1 409.1
500.0	478.3	3 870.8
1 000.0	1 025.5	6 975.7
2 500.0	2 457.7	13 143.6
5 000.0	5 145.1	29 414.0
7 500.0	7 326.8	40 981.7
10 000.0	9 964.7	57 833.2

Ecuación de la recta:  $y = 5.6414x + 590.01$  ;  $r = 0.9991$



**Figura 14. Linealidad del ensayo 4 en hematocrito al 45%.**



### 6.3. Precisión y exactitud.

Los resultados que se exponen en las Tablas 14 a 17, muestran que el método desarrollado cumple con los criterios de precisión y exactitud. La precisión del método se determinó mediante el análisis por quintuplicado de las concentraciones baja, media y alta de los puntos control PC1, PC2 y PC3 (300.0, 4 000.0 y 8 000.0 ng/mL, respectivamente) en un solo día (repetibilidad del método). Las mismas concentraciones fueron determinadas por quintuplicado durante dos días más (una corrida analítica por día), de manera que, finalmente, se cuentan con 3 corridas analíticas diferentes determinadas durante tres días consecutivos (reproducibilidad). Lo anterior se aplicó para ambos hematocritos, 30% y 45%. Los ensayos realizados en ambos hematocritos cumplen con el criterio de exactitud que establece la norma oficial vigente, ya que el valor promedio de las determinaciones de cada concentración en los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad (% Desviación), están dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

**Tabla 14. Repetibilidad del método en hematocrito al 30%.**

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	271.2	3 668.6	7 820.3
	276.9	4 028.6	7 789.8
	342.6	3 835.2	7 957.0
	257.7	3 635.6	7 268.2
	271.7	3 927.2	7 553.6
Promedio $\pm$ D.S.	284.0 $\pm$ 33.5	3 819.0 $\pm$ 167.4	7 677.8 $\pm$ 271.1
%CV	11.8	4.4	3.5
%Desviación	5.3	4.5	4.0

**Tabla 15. Repetibilidad del método en hematocrito al 45%.**

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	308.8	3 858.0	7 000.2
	295.6	3 782.0	7 128.7
	331.3	3 842.7	7 042.8
	315.1	3 643.2	6 848.0
	339.5	3 786.9	6 888.4
Promedio $\pm$ D.S.	318.1 $\pm$ 17.6	3 782.6 $\pm$ 84.8	6 981.6 $\pm$ 114.3
%CV	5.5	2.2	1.6
%Desviación	-6.0	5.4	12.7

**Tabla 16. Reproducibilidad del método en hematocrito al 30%.**

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
Día 1	271.2	3 668.6	7 820.3
	276.9	4 028.6	7 789.8
	342.6	3 835.2	7 957.0
	257.7	3 635.6	7 268.2
	271.7	3 927.2	7 553.6
Día 2	327.6	4 343.2	7 439.6
	327.0	4 251.5	7 089.8
	333.1	4 154.2	7 772.4
	313.9	3 725.2	7 296.0
	334.6	4 202.8	7 800.5
Día3	314.3	3 889.2	7 515.1
	326.4	3 816.5	7 146.6
	317.0	3 757.7	7 690.6
	307.7	3 798.4	7 118.0
	331.0	3 892.4	6 998.9
Promedio ± D.S.	310.2 ± 27.3	3 929.4 ± 220.0	7 483.8 ± 314.5
%CV	8.8	5.6	4.2
%Desviación	-3.3	1.8	6.5

**Tabla 17. Reproducibilidad del método en hematocrito al 45%.**

	PC1 (ng/mL)	PC2 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
Día 1	308.8	3 858.0	7 000.2
	295.6	3 782.0	7 128.7
	331.3	3 842.7	7 042.8
	315.1	3 643.2	6 848.0
	339.5	3 786.9	6 888.4
Día 2	313.6	4 161.3	7 439.6
	317.2	4 006.4	7 089.8
	286.0	3 943.3	7 772.4
	308.3	4 002.6	7 296.0
	314.5	3 908.3	7 800.5
Día3	335.2	4 293.6	8 121.9
	336.6	4 033.1	7 811.5
	330.8	4 555.7	7 273.1
	330.6	4 512.8	7 330.6
	311.9	3 768.1	7 031.3
Promedio ± D.S.	318.3 ± 15.5	4 006.5 ± 269.3	7 325.0 ± 387.1
%CV	4.9	6.7	5.3
%Desviación	-5.8	-0.2	8.4

#### 6.4. Límite de cuantificación.

La exactitud del límite de cuantificación fue determinada analizando la concentración más baja de la curva CC1 (100.0 ng/mL), durante tres días consecutivos y por quintuplicado. Se aplicó para ambos hematocritos, 30% y 45%.

**Tabla 18. Evaluación del límite de cuantificación en hematocrito al 30%.**

HTC 30%	CC1 (ng/mL)
Día 1	106.5
	114.9
	107.9
	107.0
	110.0
Día 2	106.0
	92.1
	94.7
	95.6
	95.5
Día 3	103.6
	110.5
	98.2
	103.1
	89.3
Promedio ± D.S.	102.3 ± 7.6
%CV	7.4
%Desviación	-2.3

**Tabla 19. Evaluación del límite de cuantificación en hematocrito al 45%.**

HTC 45%	CC1 (ng/mL)
Día 1	105.5
	95.3
	110.6
	109.0
	102.8
Día 2	101.6
	101.6
	108.6
	105.3
	101.4
Día 3	96.1
	97.1
	95.2
	98.4
	101.9
Promedio ± D.S.	102.0 ± 5.0
%CV	4.9
%Desviación	-2.0

### 6.5. Efecto de matriz.

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

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

El FMN del hematocrito 30.0% para la muestra control baja fue de  $1.004 \pm 0.05$ , mostrando un %CV de 5.4%, mientras que para la muestra control alta fue de  $0.9020 \pm 0.01$  con un %CV de 0.95%. Por otro lado, para hematocrito 45%, el FMN del control bajo fue de  $1.020 \pm 0.03$  y  $0.9162 \pm 0.02$  para la muestra de control alto, mostrando %CV de 3.6 y 2.2, respectivamente. Los resultados mostraron que el coeficiente de variación del FMN calculado de la matriz biológica no fue mayor al 15%, criterio aplicado para determinar el efecto de matriz.

## 6.6. Acarreo.

Al analizar tres muestras blanco, una antes y dos después del análisis de la muestra correspondiente al límite superior de cuantificación (10 000.0 ng/mL), se determinó que no hay efecto de acarreo (Figura 15). Esta prueba se realizó por triplicado.

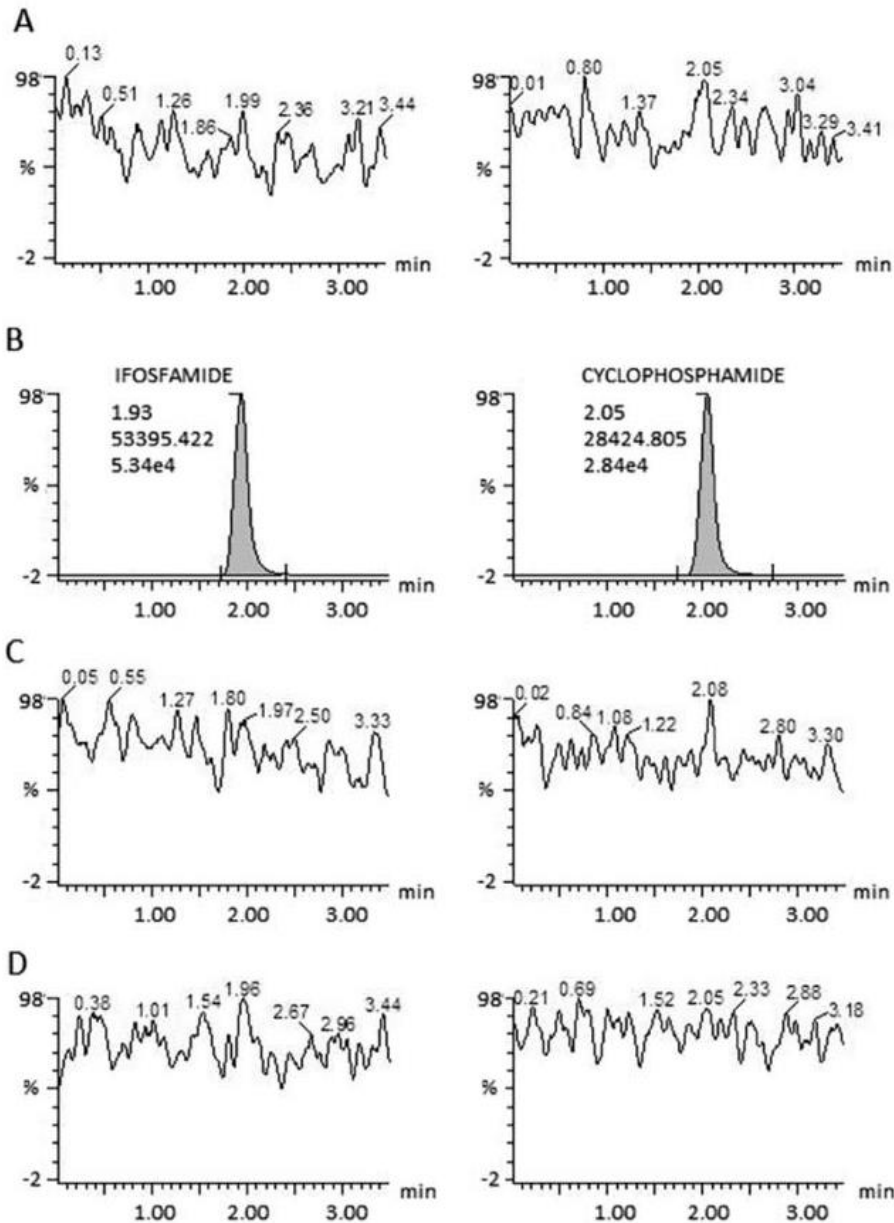


Figura 15. Evaluación de acarreo del sistema.

**A.** Cromatogramas de la primera muestra blanco después de la determinación de una muestra con ifosfamida y ciclofosfamida, respectivamente.

**B.** Cromatogramas de una muestra con ifosfamida y ciclofosfamida con una concentración de 10 000.0 ng/mL.

**C.** Cromatogramas de la segunda muestra blanco, realizada después de la determinación de ifosfamida y ciclofosfamida de concentración 10 000.0 ng/mL.

**D.** Cromatogramas de la tercera muestra blanco, realizada después de la segunda muestra blanco.

### 6.7. Estabilidad.

Los ensayos de estabilidad se realizaron determinando las concentraciones de los puntos control baja (PC1) y alta (PC3) (300.0 y 8 000.0 ng/mL, respectivamente). Ifosfamida en solución con metanol (concentración 1.0 mg/mL), fue estable al menos 30 días a una temperatura de 4.0 °C. Fue estable al menos 4 horas (tiempo de procesamiento) a una temperatura de 25.0 °C (Tabla 20 y 25), al menos 8 horas a 15 °C en automuestreador (Tabla 21), y como muestra procesada (muestra extraída, pero no resuspendida) al menos 20 horas a 4.0 °C (Tabla 22).

Ifosfamida fue estable a los ciclos de congelación y descongelación (Tabla 23) y presentó una estabilidad de al menos 52 días a una temperatura de -80.0 °C (Tabla 24 y 26).

La estabilidad de muestras con HTC de 45%, sólo fue determinada a corto y largo plazo, ya que se asume que el comportamiento de las demás pruebas de estabilidad será igual que una muestra con HTC de 30%.

#### Ensayos de estabilidad. HTC 30%.

**Tabla 20. Estabilidad sobre la mesa o estabilidad a corto plazo. 4 horas / 25.0 °C.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	305.2	8 272.2
	305.4	7 708.2
	292.7	7 923.8
	317.2	7 446.9
	302.8	8 262.4
Promedio ± D.S.	304.7 ± 8.7	7 922.7 ± 357.1
%CV	2.9	4.5
%Desviación	-1.5	1.0

**Tabla 21. Estabilidad en automuestreador. 8 horas.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	310.5	7 132.5
	308.1	7 035.5
	329.6	7 101.7
	284.7	7 452.7
	317.9	7 191.6
Promedio $\pm$ D.S.	310.2 $\pm$ 16.5	7 182.8 $\pm$ 161.0
%CV	5.3	2.2
%Desviación	-3.4	10.2

**Tabla 22. Estabilidad de muestra procesada. 20 horas.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	318.3	6 985.9
	336.8	8 182.6
	299.9	7 169.8
	308.9	7 171.3
	296.0	7 132.0
Promedio $\pm$ D.S.	311.98 $\pm$ 16.3	7 328.3 $\pm$ 483.6
%CV	5.2	6.6
%Desviación	-4.0	8.4

**Tabla 23. Estabilidad ciclos congelación-descongelación (3 ciclos).**

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

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	281.1	7 088.7
	290.9	6 916.5
	269.5	7 220.8
	276.9	7 186.9
	283.8	7 190.2
Promedio $\pm$ D.S.	280.4 $\pm$ 8.0	7 120.6 $\pm$ 124.4
%CV	2.8	1.7
%Desviación	6.5	11.0

**Tabla 24. Estabilidad a largo plazo. 52 días / -80.0 °C.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	319.31	7 873.83
	285.42	7 405.43
	290.78	7 902.45
	289.06	7 521.39
	284.2	8 119.19
Promedio ± D.S.	293.8 ± 14.5	7 764.5 ± 293.6
%CV	4.9	3.8
%Desviación	2.1	2.9

**Ensayos de estabilidad. HTC 45%.**

**Tabla 25. Estabilidad sobre la mesa o estabilidad a corto plazo. 4 horas / 25.0 °C.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	305.2	8 272.2
	305.4	7 708.2
	292.7	7 923.8
	317.2	7 446.7
	302.8	8 262.4
Promedio ± D.S.	304.7 ± 8.7	7 922.7 ± 357.1
%CV	2.9	4.5
%Desviación	-1.6	1.0

**Tabla 26. Estabilidad a largo plazo. 52 días / -80.0 °C.**

	PC1 (ng/mL)	PC3 (ng/mL)
	298.0	7 909.4
	336.9	7 675.5
	306.3	7 805.4
	314.3	7 688.8
	302.5	8 119.1
Promedio ± D.S.	311.6 ± 15.4	7 839.6 ± 182.9
%CV	4.9	2.3
%Desviación	-3.9	2.0



### 6.8. Selectividad.

El método fue selectivo a fármacos administrados en concomitancia durante los ciclos de tratamiento con ifosfamida, en pacientes pediátricos, los fármacos probados fueron: etopósido, carboplatino, vincristina, y ondansetrón. La prueba se llevó a cabo preparando muestras con la concentración del calibrador intermedio (2500.0 ng/mL con porcentajes de hematocrito de 30% o 45%), a las cuales se adicionaron 20.0 µL de soluciones descritas en la segunda columna de la Tabla 27. Se prepararon soluciones de cada fármaco por triplicado. Se obtuvieron los cromatogramas de cada fármaco contando con sus respectivas transiciones (Figuras 16 a 21). En el caso de etopósido, se extrajo con el mismo método, sin embargo, no interfiere la cuantificación de ifosfamida.

**Tabla 27. Evaluación de la selectividad del método.**

Fármaco administrado	Concentración (mg/mL)	Relación m/z del ion molecular	Relación m/z del ion fragmento	Hematocrito 30% Promedio (ng/mL) ± D.S., %CV	Hematocrito 45% Promedio (ng/mL) ± D.S., %CV
Etopósido	0.24	589.0	229.0	2 502.30 ± 177.9, 7.1	2 524.50 ± 87.6, 3.4
Carboplatino	10.00	372.1	335.0	2 513.10 ± 200.0, 7.9	2 460.80 ± 45.1, 1.8
Vincristina	0.10	825.6	138.0	2 364.87 ± 152.2, 6.4	2 501.80 ± 40.1, 1.6
Ondansetrón	0.25	294.2	169.7	2 594.10 ± 175.9, 6.7	2 627.70 ± 126.0, 4.8

Figura 16. Cromatograma de ifosfamida (2 500.0 ng/mL).

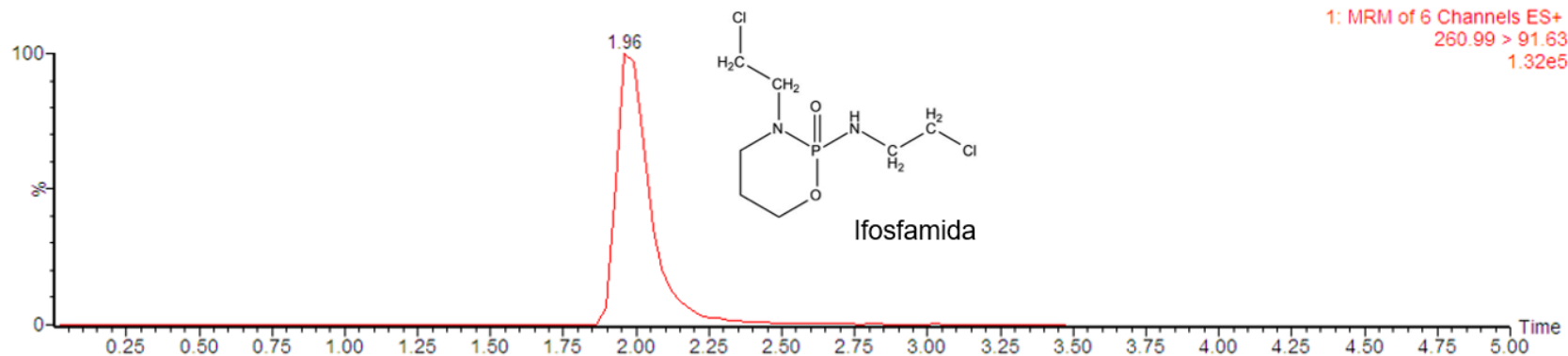


Figura 17. Cromatograma de ciclofosfamida (2 500.0 ng/mL).

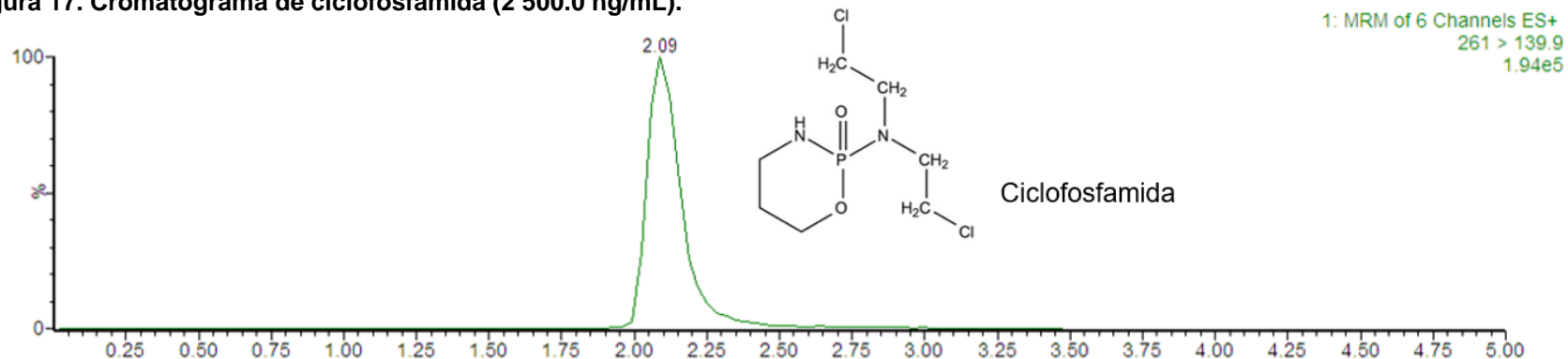


Figura 18. Cromatograma de etopósido (2 500.0 ng/mL).

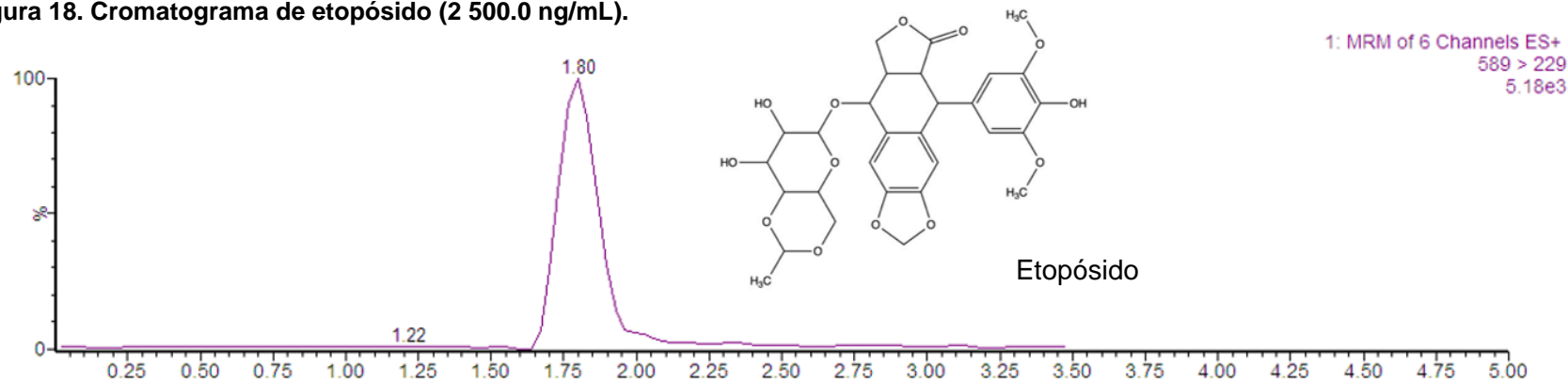


Figura 19. Cromatograma de carboplatino (2 500.0 ng/mL).

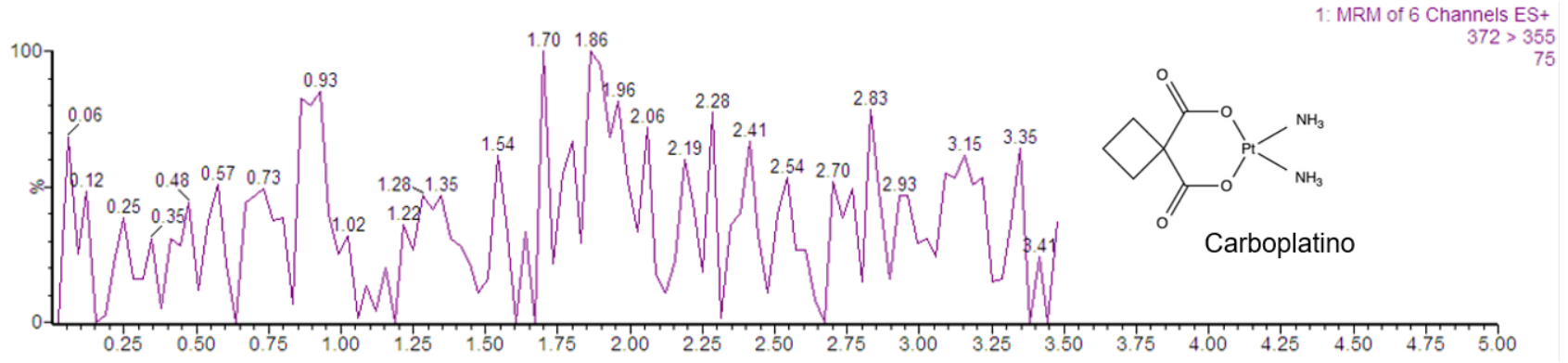


Figura 20. Cromatograma de vincristina (2 500.0 ng/mL).

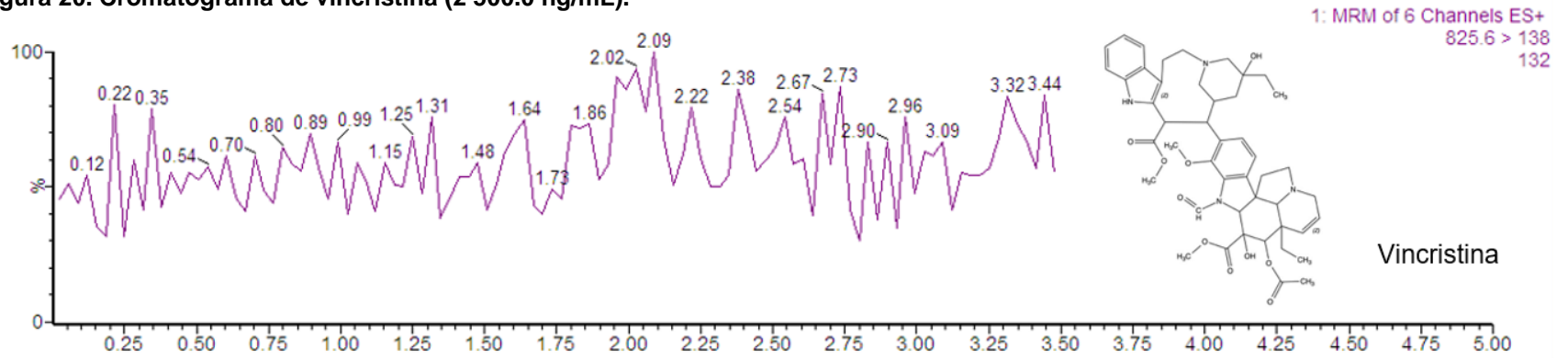
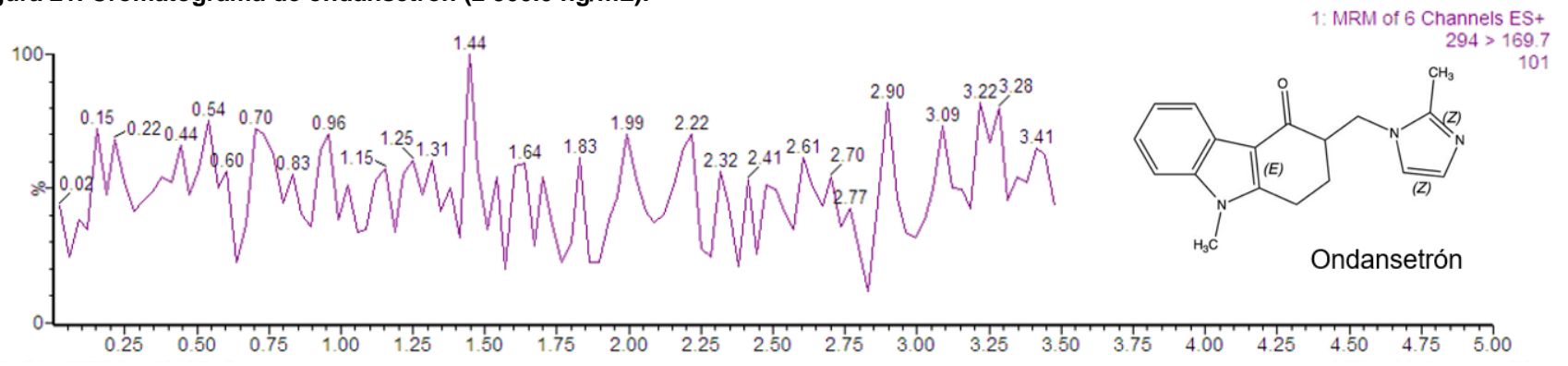


Figura 21. Cromatograma de ondansetrón (2 500.0 ng/mL).



## 7. Aplicabilidad del método.

Se realizó el monitoreo de las concentraciones sanguíneas de ifosfamida en 13 pacientes pediátricos (8 hombres y 5 mujeres) con diagnóstico de un tipo de tumor sólido embrionario. Las concentraciones se encontraron en el intervalo de 11.1 a 63.4  $\mu\text{mol/L}$  en las muestras obtenidas a las 12 horas, mientras que a las 24 horas el intervalo fue de 0.13 a 19.75  $\mu\text{mol/L}$ , como se muestra en la Tabla 28.

**Tabla 28. Determinación de ifosfamida por DBS en pacientes pediátricos.**

Paciente	Edad (años)	Género	Peso (Kg)	Diagnóstico	Curso	Muestra de 12 horas		Muestra de 24 horas	
						ng/mL	$\mu\text{mol/L}$	ng/mL	$\mu\text{mol/L}$
1	5	M	18.0	Retinoblastoma	6	3 380.4	12.9	244.3	0.94
2	17	M	55.0	Tumor de células germinales	1	2 903.8	11.1	34.8	0.13
3	3	M	13.0	Sarcoma	4	5 813.5	22.2	212.7	0.81
4	14	M	49.0	Sarcoma	2	16 558.0*	63.4*	3 644.3*	13.95*
5	15	F	44.6	Astrocitoma	1	9 218.0	35.3	999.1	3.82
6	12	F	55.0	Astrocitoma	1	6 706.1	25.6	2 915.5	11.16
7	15	M	93.0	Sarcoma	3	7 870.4	30.1	5 157.5	19.75
8	11	F	51.7	Sarcoma de Ewing	2	5 103.1	19.5	773.1	2.96
9	3	F	13.3	Sarcoma	3	4 134.5	15.8	519.4	1.99
10	0.9	M	8.0	Retinoblastoma	1	4 075.8	15.6	1 150.4	4.41
11	2	F	12.6	Tumor de células germinales	1	4 084.6	15.6	187.4	0.72
12	0.3	M	4.7	Sarcoma	1	10 337.9	39.7	2 291.6	8.77
13	9	M	32.3	Hepatoblastoma	4	3 477.5	13.3	689.8	2.64

\*Resultado obtenido por extrapolación.

## 8. Análisis de resultados.

La creciente incidencia de enfermedades crónicas como el cáncer no sólo demanda esquemas de tratamiento efectivos, sino también métodos analíticos lo suficientemente sensibles, y de ser posible sencillos, que permitan dar seguimiento a la respuesta farmacológica que los pacientes tienen a lo largo del tratamiento.

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

El desarrollo y validación de este nuevo método para cuantificar ifosfamida, ofrece ventajas sobre los ya existentes, tales como el requerimiento de volúmenes muy pequeños de muestra (apenas unas gotas), la facilidad con la que se obtienen las muestras sanguíneas, ya que la técnica de DBS al ser muy poco invasiva tiene mayor aceptación por parte de los pacientes y sus tutores, que una muestra obtenida por venocentesis. Otra ventaja del método desarrollado, es referida a la técnica de extracción de ifosfamida de la matriz biológica, pues su procesamiento es sencillo, la cantidad de disolventes empleados es menor con respecto a los reportados previamente, así mismo, la rapidez del análisis reduce significativamente el costo del estudio.

La trascendencia de este método analítico validado, reside en que podrá darse un seguimiento más detallado a los pacientes pediátricos diagnosticados con algún tipo de tumor sólido, puesto que al determinar las concentraciones sanguíneas de ifosfamida, puede determinarse el intervalo terapéutico de este antineoplásico en dicha población. Por lo que en un futuro se podrá contar con las concentraciones a partir de las cuales comienzan a observarse los efectos adversos y tóxicos que se le asocian.

## 9. Conclusiones.

Se desarrolló y validó con éxito un método analítico por UPLC-MS/MS empleando la técnica de DBS, método que resulta ser lineal, reproducible, exacto, y lo suficientemente sensible y selectivo para realizar la cuantificación de ifosfamida en pacientes pediátricos.

Al cumplir con los criterios establecidos en el apartado 9.1 de la NOM-177-SSAI-2013, el cual describe las características de desempeño para la validación de métodos analíticos, el método desarrollado en este proyecto puede aplicarse de manera rutinaria para realizar la determinación de concentraciones de ifosfamida en sangre de pacientes pediátricos, y de esta forma fungir como una útil herramienta que permita generar evidencia que pueda ayudar a redefinir un intervalo terapéutico de ifosfamida en los esquemas de quimioterapia pediátricos ya existentes.

## 10. Referencias.

### 10.1. Revistas científicas.

Aleksa, K., Nava-Ocampo, A., Koren, G., 2009. Detection and quantification of (R) and (S)-Dechloroethylifosfamide metabolites in plasma from children by enantioselective LS/MS/MS. *Chirality*, Vol. 21, pp. 674-680.

Deroussent, A., Rodríguez. S., Martelli. S., Seck, A., Dubus-Daudigeos, E., Didier, D., Vassal, G., Paci, A., 2011. Quantification of dimethyl-ifosfamide and its N-deschloropropylated metabolites in mouse plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, pp. 743-750.

De Kesel, P. M., Sadones, N., Capiou, S., Lambert, W.E., Stove, C.P., 2013 Hematocritical issues in quantitative analysis of dried blood spots: challenges and solutions. *Bioanalysis*, Vol. 5, pp. 2023–2041.

Fleming, R. A., 1997. An Overview of Cyclophosphamide and Ifosfamide Pharmacology. *Pharmacotherapy supplement*, Vol. 17, No. 5, pp. 146S-154S.

Gavhane, Y. N., Shete, A. S., Bhagat, A. K., Shinde, V. R., Bhong, K. K., Khairnar, G. A., Yadav, A. V., 2011. Solid Tumors: Facts, Challenges and Solutions. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*, Vol. 2, pp. 1-12.

Huang, Z., Waxman, D. J., 1999. High-Performance Liquid Chromatographic-Fluorescent Method to Determine Chloroacetaldehyde, a Neurotoxic Metabolite of the Anticancer Drug Ifosfamide, in Plasma and in Liver Microsomal Incubations. *Analytical Biochemistry*, pp. 117-125.

Kerbusch, T., Huitema, A. D. R., Jeuken, M.-J. J., Derraz, J., Tibben, M. M., Beijnen, J. H., 2000.a. Simultaneous determination of ifosfamide and its metabolite ifosforamide mustard in human plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, pp. 2991-3010.

Kerbusch, T., Jeuken, M.-J., Derraz, J., van Putten, J. W. G., Huitema, A. D. R., Beijnen, J. H., 2000.b. Determination of Ifosfamide, 2- and 3-Dechloroethyifosfamide Using Gas Chromatography With Nitrogen-Phosphorus or Mass Spectrometry Detection. *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 22, No. 5, pp. 613-620.

Larson, R. R., Khazaeli, M.B., Dillon, H. K., 2003. Development of an HPLC method for simultaneous analysis of five antineoplastic agents. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*, Vol. 18, No. 2, pp. 109-119.

Li, F., Patterson, A.D., Höfer, C. C., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J., Idle, J. R., 2010. Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 80, pp. 1063-1074.

Lima-Sanson, A., Rennó Silva, S. C., Gonçalves, Martins, M. C., Giusti-Paiva. A., Penido Maia, P., Martins, I., 2011. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simultaneous determination of antineoplastic drugs in plasma. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 47, No. 2, pp. 363-371.

Lowenberg, D., Thorn, C. F., Desta, Z., Flockhart, D. A., Altman, R., Klein, T. E., 2014. PharmGKB summary: ifosfamide pathways, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*, pp. 133-138.

Quero-Hernández, A., Coronado Díaz, R., Pérez-Bautista, A., Reyes-Gómez, U., 2006. Neoplasias malignas en niños en dos hospitales del estado de Oaxaca, México (1996-2002). *Acta Pediátrica de México*, Vol. 27, No. 4, pp. 183-189.

Rivera-Luna, R., Correa-González, C., Altamirano-Alvarez, E., Sánchez-Zubieta, F., Cárdenas-Cardós, R., Escamilla-Asian, G., Olaya-Vargas, A., Bautista-Marquez, A., Aguilar-Romo, M., 2012. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International Journal of Cancer*, pp. 1646-1650.



Storme, T., Mercier, L., Deroussent, A., Re, M., Martens, T., Royer, J., Bourges, P., Vassal, G., Paci, A., 2005. Liquid chromatography-mass spectrometry assay for quantitation of ifosfamide and its N-deschloroethylated metabolites in rat microsomal medium. *Journal of chromatography B*, pp. 251-259.

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

## 10.2. Libros.

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

Vinué, J. M. S., 1969. Interpretación de los espectros de masas (6-9), s.l.:Revertré S.A.

Rivera, R. Editor, 2010. Protocolos Técnicos Cáncer en Niños. Consejo Nacional para la prevención y tratamiento del cáncer en la infancia y la adolescencia, México.

Agenda Estadística del Instituto Nacional de Pediatría, 2012.

Agenda Estadística del Instituto Nacional de Pediatría, 2013.

Agenda Estadística del Instituto Nacional de Pediatría, 2014.

Agenda Estadística del Instituto Nacional de Pediatría, 2015.

### 10.3. Recursos electrónicos.

Tesis: Escobar, C. A., 2011. Identificación de los efectos tóxicos producidos por los fármacos antineoplásicos utilizados en el centro radiooncológico del Caribe en la Ciudad de Cartagena, durante el año 2010. Fecha de consulta: 23/05/16.

Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4243/1/598938.2011.pdf>

Tesis: Alfonso, M., 2008. Desarrollo de métodos para el aislamiento y la detección de toxinas marinas en productos de pesca y agricultura. Fecha de consulta: 29/04/16.

Disponible en:

[https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2545/9788498872071\\_content.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2545/9788498872071_content.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Documento: Fernández, S. B., Zimbrón, E. A., León, G., Murguía, P., Torres, M., 2011. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes. Fecha de consulta: 31/05/16.

Disponible en:

[https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p\\_epi\\_del\\_cancer\\_en\\_nic3b1osy\\_adolescentes\\_mexico.pdf](https://epidemiologiatlax.files.wordpress.com/2012/10/p_epi_del_cancer_en_nic3b1osy_adolescentes_mexico.pdf)

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. Fecha de consulta: 07/09/15.

Disponible en:

[http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013)

Ficha técnica de ifosfamida. Fecha de consulta: 01/02/16.

Disponible en:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ifosfamide#section=EC-Number>