



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS
DE VORICONAZOL MEDIANTE HPLC Y ESTANDARIZACIÓN DE
LA TÉCNICA PCR – RFLP PARA LA DETECCIÓN DEL
POLIMORFISMO *CYP2C19*17*

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

JOAN ALEJANDRO GALDAMES BRICEÑO

Director de Tesis: Dr. Mauricio Farfán Urzúa

Co-directores de Tesis:

Mg. Carolina Salas Palma

Dra. Caroline Weinstein Oppenheimer

2014

**(...) Llegar a la meta no es vencer. Lo importante es el camino y en él
caer, levantarse, insistir, aprender.
(Txus)**

AGRADECIMIENTOS

Durante su limitada existencia, el ser humano debe tomar y abatirse entre muchas decisiones importantes, que, con conocimiento de causa y raciocinio o por simple albedrío, imprimen un sello en él, un estilo, una forma de ver y desenvolverse en este mundo, usualmente ajeno a la realidad del prójimo. A través de esta travesía llamada “vida”, sin embargo, muchos actores han sido, son y serán parte importante del metrónomo que comanda el inexorable paso del tiempo junto a todos esos momentos cargados de emoción y tristezas, de fracasos y éxitos, pues sabes que en ellos podrás confiar; de alguna u otra forma marcando la diferencia entre el tú de ayer, hoy y mañana... A todos ellos, este merecido homenaje.

A mis padres, por el apoyo necesario para permitirme llegar a este magno momento. Por depositar en mí su confianza, ser ese pilar inagotable de paciencia y entrega por sus hijos e impregnar mi ser con el afán de ser siempre más, pero ante todo, enseñarme que lo mejor de esta vida está en ser feliz.

A mi hermana, Camila Galdames. Por lejos una niña que embelesa siempre por su inteligencia y gracia. Aún te falta mucho por recorrer, pero desde que llegaste, mi vida tomó un revés que hasta hoy me hacen sentir orgulloso y agradecido de tener cerca de mí a un personita tan importante como tú.

Soy un fiel creyente del refrán: “detrás de un gran hombre, siempre hay una gran mujer”. Palabras siempre faltarán para dedicar y agradecer a ella, la mujer que hace más o menos ya siete años osó cruzarse en mi camino y optó por aceptar en su vida a este personaje, quizá de qué reputación pensará ella. Mi compañera, colega, mi ex amiga, mi apoyo y hasta el día de hoy, mi novia. La vida simplemente me sonrío todos los días al saber que a mi lado tengo a quien siempre entrega en todas sus formas y expresiones posibles, aquel grandioso sentimiento y que de manera magistral me enseñaste, denominado *Amor*. A ti, Roxana Varela, estas palabras.

Conocidos muchos, amigos pocos. A ellos por aportar esos momentos, días y noches de confraternidad, consejos, música, proyectos y sueños. Gracias por aceptar a este actor como parte de su vida.

A la Dra. Caroline Weinstein, una persona que siempre ha enseñado tanto en las aulas como fuera de ellas no sólo conocimientos científicos; en la vida siempre se puede ser más y no podemos estancarnos sumidos en la pereza de lo meramente conocido. Los agradecimientos además por el entusiasmo e interés mostrados en el desarrollo de la tesis y el aporte que significó en muchas de las ideas ilustradas durante el proceso desarrollado.

Al personal del Centro de Estudios Moleculares de la Universidad de Chile, por toda la ayuda prestada durante mi estadía en él y, en especial a Iván Gajardo, por ser mi guía de trabajo y supervisor con un admirable espíritu pedagógico.

La ayuda siempre es bienvenida, pero lo es aún más cuando proviene de la persona indicada y en el momento perfecto. Por enseñarme que es posible mezclar 5 moles de tranquilidad con 5 moles de responsabilidad, por la sinceridad y sabiduría de sus palabras y por estar siempre presto a compartir sus conocimientos al momento de acudir con dudas a su persona. Los honores respectivos a usted, maestro Daniel Navea.

Realizar un trabajo de tesis no es una tarea sencilla y se requiere probablemente de una virtud que no es común en muchos, la paciencia, indispensable para proveer al alumno de herramientas que le permitan amalgamar los difusos conocimientos que trae de su formación. A mis directores de tesis, Dr. Mauricio Farfán y Mg. Carolina Salas, que decidieron depositar su confianza en mi persona y permitir mi arribo al Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, acompañándome durante todo el proceso y demostrando preocupación y compromiso. Sencillamente gracias por aprobar mi estadía en la institución, ayudarme cuando fue requerido y encausarme de la mejor forma para conseguir este logro.

ABREVIATURAS

%R	: Porcentaje de recuperación
\bar{X}	: Promedio
°C	: Grados Celsius
μg	: microgramos
μL	: microlitro
μm	: micrometro
ABC	: Área bajo la curva
BD	: Biodisponibilidad
bp	: Pares de bases
<i>DS</i>	: Desviación estándar
<i>EEI</i>	: Error estándar del intercepto
HLCM	: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna
HPLC	: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IFIs	: Infecciones fúngicas invasoras
L.C.	: Límite de cuantificación
L.D.	: Límite de detección
<i>m</i>	: Pendiente
mL	: mililitro
mUA	: mili unidades de absorbancia
ng	: nanogramo
nm	: nanometro
PCR – RFLP	: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR	: Polymerase Chain Reaction / Reacción en cadena de la polimerasa.
<i>r</i>	: Coeficiente de correlación
<i>r</i> ²	: Coeficiente de determinación
<i>RSD</i>	: Desviación estándar residual
SNPs	: Polimorfismos de nucleótido simple

t_{calc} : Valor t calculado

t_{tab} : Valor t tabulado

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Antecedentes	1
I.2 Voriconazol: Aspectos generales y uso en clínica	1
I.3 Metabolismo del voriconazol	2
I.4 Tratamiento con voriconazol en pediatría	3
I.5 Medición de concentraciones plasmáticas de voriconazol	4
I.6 Polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del voriconazol	5
I.7 SNP <i>CYP2C19*17</i>	6
I.8 Detección del SNP <i>CYP2C19*17</i>	7
II. HIPÓTESIS	8
III. OBJETIVOS	9
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Optimización de condiciones analíticas para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC	10
2. Determinación de parámetros de calidad	10
2.1 Especificidad	10
2.2 Límite de Detección (L.D.) y Límite de Cuantificación (L.C.)	11
2.3 Linealidad	11
2.4 Exactitud	12
2.5 Precisión	13
2.6 Robustez	14

3. Correlación de resultados con otros centros asistenciales	15
4. Estandarización de la técnica de detección del SNP <i>CYP2C19*17</i> mediante la técnica de PCR – RFLP	16
4.1 Extracción del material genético	16
4.2 PCR	16
4.3 Digestión enzimática	17
4.4 Límite de detección	18
V. RESULTADOS	19
1. Optimización de condiciones analíticas para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC	19
1.1 Preparación de calibradores y controles de calidad	19
1.2 Preparación del estándar interno	20
1.3 Extracción del analito (voriconazol) a partir de los calibradores, controles y muestras problema	20
1.4 Cuantificación del voriconazol	20
2. Determinación de parámetros de calidad	21
2.1 Especificidad	21
2.2 Límite de Detección y Límite de Cuantificación	23
2.3 Linealidad	24
2.4 Exactitud	25
2.5 Precisión	25
2.6 Robustez	27
3. Correlación de resultados con otros centros asistenciales	29
4. Estandarización de la técnica de detección del SNP <i>CYP2C19*17</i> mediante la técnica de PCR – RFLP	31
4.1 PCR	31
4.2 Digestión enzimática	32
4.3 Límite de detección	33

VI. DISCUSIÓN	34
VII. CONCLUSIONES	38
VIII. PROYECCIONES	39
IX. BIBLIOGRAFÍA	40
X. ANEXOS	45
Anexo 1: Regresión de Passing y Bablok para comparación con el método 1	45
Anexo 2: Regresión de Passing y Bablok para comparación con el método 2	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estructura química de la molécula de voriconazol	2
Figura 2: Principales enzimas metabolizadoras de voriconazol	3
Figura 3: Curva de calibración representativa para determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol	19
Figura 4: Cromatograma representativo de una solución blanco	22
Figura 5: Cromatograma representativo de una solución de voriconazol de concentración 1.0 µg/mL	22
Figura 6: Cromatograma representativo de una solución de voriconazol de concentración 5.0 µg/mL	23
Figura 7: Prueba de temperatura de alineamiento en gel de agarosa	31
Figura 8: Esquema de cortes enzimáticos para la detección del SNP <i>CYP2C19*17</i>	32
Figura 9: Resultados de la digestión enzimática en gel de poliacrilamida	33
Figura 10: Prueba del límite de detección para PCR en gel de agarosa	33

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Principales alelos polimórficos del gen <i>CYP2C19</i> relacionados a variabilidad farmacocinética	6
Tabla 2: Frecuencias del genotipo enzimático <i>CYP2C19*17</i> en diferentes poblaciones	6
Tabla 3: Frecuencia del alelos <i>CYP2C19*17</i> según etnias en población brasileña	7
Tabla 4: Modelo de prueba de robustez de Younden y Steiner	14
Tabla 5: Combinación de variables para ensayo de robustez	14
Tabla 6: Protocolo final utilizado para la realización de la PCR	16
Tabla 7: Programa de ciclos para la PCR	17
Tabla 8: Protocolo para preparación de gel de poliacrilamida	17
Tabla 9: Protocolo final para preparación de la digestión enzimática	18
Tabla 10: Condiciones cromatográficas para cuantificación de niveles plasmáticos de voriconazol	21
Tabla 11: Límites de detección y de cuantificación para voriconazol	23
Tabla 12: Resultados de curva de calibración global	24
Tabla 13: Valores estadísticos de la curva de calibración global	24
Tabla 14: Porcentaje de recuperación por cada nivel de concentración	25
Tabla 15: Parámetros estadísticos a partir de los valores del %R	25
Tabla 16: Áreas obtenidas para la determinación de repetibilidad	26
Tabla 17: Parámetros estadísticos a partir de las áreas obtenidas para la prueba de repetibilidad	26
Tabla 18: Áreas obtenidas por dos analistas distintos para la prueba de precisión intermedia	27
Tabla 19: Parámetros estadísticos a partir de las áreas obtenidas para la prueba de precisión intermedia	27
Tabla 20: Condiciones y áreas obtenidas para la prueba de robustez	28
Tabla 21: Resumen de valores obtenidos para validación de la robustez	28

Tabla 22: Comparación entre metodología HLCCM versus Comparación 1	29
Tabla 23: Parámetros estadísticos de la correlación de Passing y Bablok y test de linealidad para el método de Comparación 1	30
Tabla 24: Comparación entre metodología HLCCM versus Comparación 2	30
Tabla 25: Parámetros estadísticos de la correlación de Passing y Bablok y test de linealidad para el método de Comparación 2	30

RESUMEN

El voriconazol es un antifúngico de amplio espectro, con efectividad sobre microorganismos como *Aspergillus* y *Cándida*. En la práctica clínica, se ha observado que el tratamiento con voriconazol presenta una farmacocinética variable intra e interindividual encontrándose que un alto porcentaje de los niños, tratados con dosis estándar, presentan niveles plasmáticos sub-terapéuticos, requiriendo de un aumento de las dosis para alcanzar concentraciones terapéuticas. Este fenómeno se ha asociado a la presencia de polimorfismos genéticos implicados en el metabolismo de fármacos. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) en el gen que codifica para la enzima metabolizadora CYP2C19 (*CYP2C19*1*), se han asociado a variaciones en la farmacocinética del voriconazol. Para estudiar estas variaciones es necesario implementar técnicas de última generación, que permitan realizar un monitoreo terapéutico desde el punto de vista farmacocinético y farmacogenético. Para los estudios de farmacocinética, la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es la técnica de referencia para determinar los niveles plasmáticos de voriconazol, capaz de entregar resultados confiables y precisos. Para el caso de la farmacogenética, la técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length polymorphism*), es la técnica de elección para la detección de SNPs. En este trabajo de tesis, en el hospital Dr. Luis Calvo Mackenna se implementaron las técnicas de HPLC y PCR-RFLP para determinar los niveles plasmáticos de voriconazol y polimorfismos genéticos asociados al metabolismo de este fármaco, respectivamente. Para la técnica HPLC, se realizó la validación analítica incluyendo los parámetros de especificidad, límite de detección (0.03 µg/mL), límite de cuantificación (0.09 µg/mL),

linealidad ($r^2 = 0.9988$), exactitud (recuperación = 101.6%), precisión (coeficiente de variación $\leq 2\%$) y robustez. Además, se implementó la técnica de PCR-RFLP para la detección del SNP *CYP2C19*17*, un SNP asociado a concentraciones sub-terapéuticas de voriconazol. La implementación de estas dos técnicas permitirá en el futuro realizar estudios de farmacocinética y farmacogenética destinados optimizar el tratamiento con voriconazol.

ABSTRACT

Voriconazole is a broad-spectrum antifungal, effective on microorganisms such as *Aspergillus* and *Candida*. In clinical practice, it has been observed that voriconazole has a variable intra and inter individual pharmacokinetics. A high percentage of children treated with standard doses of voriconazole have sub-therapeutic plasma levels, requiring a dose increase to achieve therapeutic levels. This phenomenon has been associated to the presence of genetic polymorphisms involved in drug metabolism. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene encoding CYP2C19 metabolizing enzymes (*CYP2C19*1*), have been associated with changes in the pharmacokinetics of voriconazole. To study these drugs variations is necessary to implement cutting edge techniques for therapeutic drug monitoring considering pharmacokinetic and pharmacogenetic perspectives. For pharmacokinetic studies, the High Resolution Liquid Chromatography (HPLC) is the gold standard to determine plasma levels of voriconazole in a reliable and accurate manner. In the case of pharmacogenetics, PCR-RFLP is the technique of choice for the detection of SNPs. In this thesis, HPLC and PCR-RFLP techniques were implemented at Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital to determine plasma voriconazole levels and genetic polymorphisms associated with the metabolism of this drug, respectively. For the HPLC technique, analytical validation parameters including specificity, limit of detection (0.03 µg/mL), limit of quantification (0.09 µg/mL), linearity ($r^2 = 0.9988$), accuracy (recovery = 101.6 %), precision (coefficient of variation $\leq 2\%$) and robustness was performed. In addition, PCR-RFLP for the detection of *CYP2C19*17* polymorphism, a SNP associated with sub-therapeutic concentrations of voriconazole was implemented. The

implementation of these two techniques will allow to conduct pharmacokinetics and pharmagenetics studies for voriconazole treatment optimization.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Antecedentes

Entre las enfermedades producidas por microorganismos, se encuentran las infecciones fúngicas invasoras (IFIs), las que, dependiendo de las características del agente infeccioso, el sitio afectado y las condiciones de salud del hospedero, pueden ser una causa de mortalidad al no tratarse de manera apropiada. Las IFIs han tenido un progresivo aumento en su incidencia durante las dos últimas décadas, especialmente a nivel nosocomial¹, haciendo necesario el desarrollo de nuevos conocimientos y terapias para su tratamiento. Los hongos *Cándida* y *Aspergillus* se identifican como los principales patógenos causantes de estas enfermedades. A pesar de la aplicación de una terapia antifúngica oportuna, la tasa de mortalidad varía entre un 30 a 80% en pacientes pediátricos².

En el contexto de la farmacología, las principales líneas de tratamiento para las IFIs incluyen a los polienos, triazoles, análogos de pirimidina y equinocandinas, tales como la anfotericina B, 5-fluorocitosina, fluconazol y caspofungina, respectivamente, siendo prescritos con mayor frecuencia dentro de los antifúngicos triazoles el fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol².

I.2 Voriconazol: Aspectos generales y uso en clínica

El voriconazol es un antimicrobiano fungistático con potente actividad contra un amplio espectro de patógenos fúngicos, entre ellos del género *Aspergillus*, *Cándida*, *Cryptococcus* y patógenos emergentes como *Scedosporium* y *Fusarium*³⁻⁵. Su acción antifúngica se debe a la inhibición del citocromo P-450 fúngico dependiente de la enzima 14- α -esteroldemetilasa, la cual es vital para la síntesis funcional de pared celular en el hongo⁴. Su biodisponibilidad (BD) presenta una alta variabilidad, siendo en niños cercana al 44,6%, a diferencia de los adultos, donde presenta valores cercanos al 96%⁶. Dentro de las principales reacciones adversas notificadas en clínica, se describen mayoritariamente las

alteraciones visuales y la elevación de las enzimas hepáticas, asociadas a altas concentraciones plasmáticas⁷.

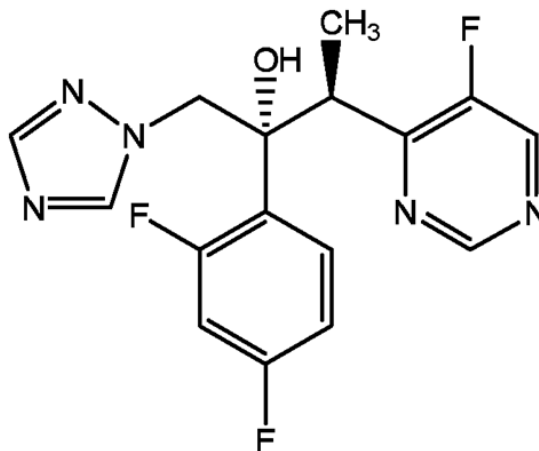


Figura 1: Estructura química de la molécula de voriconazol. El voriconazol posee en su estructura un grupo α -metilo y un flúor en posición 4 de la pirimidina, lo cual otorga a la molécula una mayor afinidad que su predecesor fluconazol a microorganismos del género *Aspergillus*, *Cándida* y *Fusarium*^{4,8}.

I.3 Metabolismo del voriconazol

El voriconazol se metaboliza principalmente a nivel hepático por acción del citocromo P-450, siendo biotransformado en un 72% a voriconazol N-óxido, principalmente a través de la isoforma CYP2C19, seguido de la enzima CYP3A4, mientras que el 28% restante es convertido a otros metabolitos inactivos, principalmente el 4-hidroxivoriconazol (Figura 2)⁹, excretándose sólo un 5% inalterado a través de la orina¹⁰. Este fármaco, además presenta una cinética lineal y un metabolismo más rápido en niños en comparación con los adultos, siendo necesario utilizar mayores dosis que las administradas a pacientes adultos¹¹. Su baja BD en pacientes pediátricos sugiere un importante metabolismo de primer paso en el organismo, a diferencia de los pacientes adultos¹². Además, se ha estudiado y evidenciado que la expresión del gen *CYP2C19* es más alta en niños que en adultos, lo que demuestra la importancia de la enzima CYP2C19 en el metabolismo hepático de voriconazol.¹²

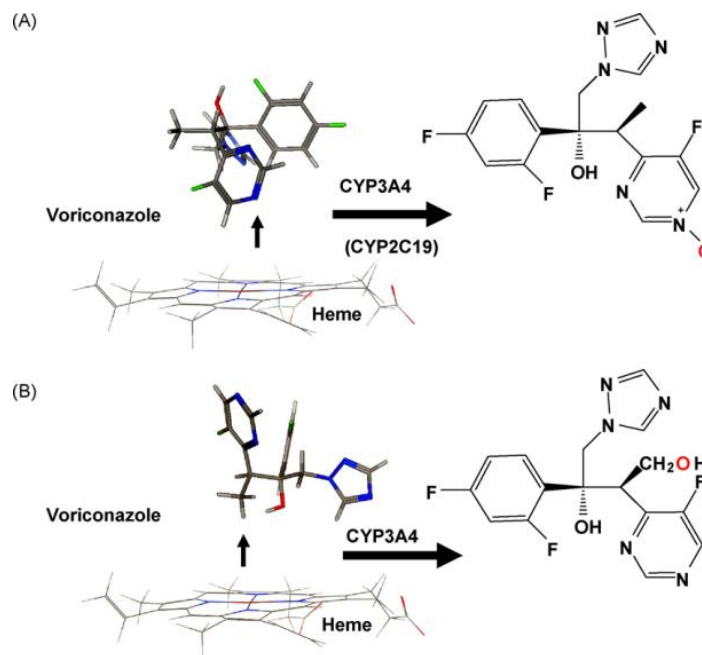


Figura 2: Principales enzimas metabolizadoras de voriconazol. En la figura se muestra la molécula de voriconazol y las principales enzimas del citocromo P450 encargadas de formar los metabolitos mayoritarios del fármaco, el N-óxido (A) y el 4-hidroxivoriconazol (B)⁹.

I.4 Tratamiento con voriconazol en pediatría

El Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna (HLCM) es un hospital pediátrico de alta complejidad, que forma parte de la red asistencial pública del Servicio de Salud Metropolitano Oriente del Ministerio de Salud, centro de referencia nacional para un gran número de patologías, entre las que destacan los trasplantes de médula ósea y de órganos sólidos, como riñón, hígado y corazón¹³. Si bien los procedimientos médicos se han perfeccionado a través del tiempo, los pacientes que se someten a estas intervenciones pueden presentar uno o varios factores de riesgo que alteran su inmunidad, dejándolos expuestos a enfermedades infecciosas de diferente tipo, siendo las IFIs una importante causa de morbilidad, lo cual genera desafíos diagnósticos y terapéuticos para su tratamiento, trayendo consigo elevación de los costos de manejo y elevada mortalidad¹⁴.

En el HLCM, el voriconazol es utilizado como antifúngico de segunda línea de uso restringido, empleado principalmente para profilaxis y tratamiento de aspergilosis invasiva. A los pacientes que utilizan este medicamento se les realiza un seguimiento

farmacoterapéutico estricto, lo cual incluye la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol para asegurar la efectividad de la terapia.

Las concentraciones plasmáticas de voriconazol presentan una alta variabilidad intra e interindividual a causa de múltiples factores y/o condiciones propias del paciente como la edad, enfermedad hepática, interacciones medicamentosas y factores genéticos, los cuales influyen directamente sobre su metabolismo. Se consideran valores terapéuticos de concentraciones plasmáticas entre 1,0 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para profilaxis y entre 2,0 a 5,5 $\mu\text{g/mL}$ para tratamiento de aspergilosis^{15,16}. El hecho de poder lograr una concentración plasmática adecuada es crítico sobre el potencial éxito de la terapia, ya que concentraciones plasmáticas que arrojen valores por debajo del margen terapéutico se asocian a falla en el tratamiento, mientras que aquellas sobre el rango se relacionan con la aparición de reacciones adversas¹⁶, por lo que clínicamente se recomienda realizar un monitoreo terapéutico del fármaco, a través de la determinación de sus concentraciones plasmáticas¹⁶.

I.5 Medición de concentraciones plasmáticas de voriconazol

La determinación de niveles plasmáticos de voriconazol requiere de un método confiable, preciso, sensible y reproducible, que pueda realizarse de manera rutinaria en un laboratorio clínico, con tiempos de respuesta oportunos y útiles para su aplicación clínica.

Según la evidencia¹⁷, se han desarrollado y puesto a prueba diversas técnicas y métodos para medir concentraciones plasmáticas de voriconazol, siendo la más utilizada la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección UV o acoplado a un detector de espectrofotometría de masa¹⁷, siendo considerada como la metodología de referencia (*Gold standard*).

La validación de un método, según el *Instituto de Salud Pública de Chile*, es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados sean confiables¹⁸. En tanto, la NCh-ISO 17025. Of2005 indica que la validación de un método analítico se define como la confirmación mediante un examen que entrega una evidencia objetiva¹⁹.

La implementación de una metodología para la determinación de niveles plasmáticos de voriconazol se realizó utilizando como guía los procedimientos instaurados para el mismo propósito por el laboratorio de Farmacocinética Clínica del St. Jude Research Hospital, Memphis, Estados Unidos²⁰.

I.6 Polimorfismos genéticos involucrados en el metabolismo del voriconazol

Un polimorfismo genético se describe como un cambio en un gen presente en una población con una frecuencia mayor o igual al 1%. Su origen radica en la ocurrencia de mutaciones, siendo la forma más común de variación genética en los seres humanos los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), los cuales representan una diferencia en un solo nucleótido en una región del ADN²¹. En general, los SNPs no generan efectos sobre la salud o el desarrollo. Su importancia en farmacología radica en poder asociarlos con el riesgo de susceptibilidad a toxinas o su influencia en la respuesta de un individuo a ciertos fármacos²¹. Para el caso del voriconazol se han descrito varios SNPs en el gen *CYP2C19* asociados a variaciones en el metabolismo de este fármaco, evidenciado por alteraciones en las concentraciones plasmáticas esperadas frente a un tratamiento determinado.

El gen *CYP2C19* se localiza en el cromosoma 10 y posee 9 exones, que codifican para una proteína de 490 aminoácidos²². Los polimorfismos en este gen dan lugar a la presencia de distintos alelos, los cuales se asocian a diferentes grados de actividad metabólica de la enzima *CYP2C19*.

Hasta la fecha se han identificado 34 SNPs del gen *CYP2C19*, sin embargo, principalmente tres presentan una influencia sobre la farmacocinética del voriconazol, siendo los alelos *CYP2C19*2* y *CYP2C19*3* aquellos que codifican para una enzima *CYP2C19* truncada con actividad nula y el *CYP2C19*17*, que codifica para una enzima con actividad incrementada (Tabla 1)²³.

Tabla 1: Principales alelos polimórficos del gen *CYP2C19* relacionados a variabilidad farmacocinética

Alelo	Cambio de nucleótido	Efecto	Actividad Enzimática
<i>CYP2C19*1</i>	-----	-----	Normal
<i>CYP2C19*2</i>	A681G (exón 5)	Splicing aberrante	Nula
<i>CYP2C19*3</i>	G636A (exón 4)	Codón de stop prematuro	Nula
<i>CYP2C19*17</i>	C806T	Cambio en región flanqueante 5' del gen	Incrementada

Fuente: Hirota, Eguchi & Ieiri, 2013. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28(1):28–37.

I.7 SNP *CYP2C19*17*

En el año 2006, se describió la variante alélica *CYP2C19*17*, la que se caracteriza por la presencia de un SNP –806C>T (rs12248560) en la región promotora del gen *CYP2C19*²⁴, que aumenta la expresión de este gen y la proteína que codifica. Este polimorfismo se asocia a un fenotipo metabolizador ultra rápido, con incremento de la actividad enzimática^{3,22}. Estudios recientes han demostrado que la presencia de este SNP se asocia a concentraciones plasmáticas sub-terapéuticas de voriconazol, con el consiguiente riesgo de fracaso terapéutico y la necesidad de incrementar las dosis para conseguir concentraciones plasmáticas efectivas²⁵.

A nivel mundial se han realizado varios estudios de prevalencia de este SNP, en donde es posible visualizar una distribución heterogénea en la frecuencia del alelo *CYP2C19*17* (Tabla 2)²³.

Tabla 2: Frecuencias del genotipo enzimático *CYP2C19*17* en diferentes poblaciones

Alelo	Población	Frecuencia (%)
<i>CYP2C19*17</i>	Asiáticos	0,15 – 0,44
	Caucásicos	18 – 27
	Africanos	10 – 26

Fuente: Hirota, Eguchi & Ieiri, 2013. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28(1):28–37.

En Chile aún no existen estudios relacionados con el tema. No obstante, en Sudamérica se han realizado algunos estudios que determinan la prevalencia del alelo *CYP2C19*17*. Uno de ellos se realizó en Brasil²⁶, destacando uno donde diferencian los distintos alelos según los grupos étnicos que habitan en ese país (Tabla 3).

Tabla 3: Frecuencia del alelo *CYP2C19*17* según etnias en población brasileña

Alelo	Grupo étnico	%
<i>CYP2C19*17</i>	Amerindios	20,8
	Descendientes caucásicos	24,4
	Mulatos	29,8
	Descendientes africanos	32,3

Fuente: Santos & cols, 2011. *BMC Med Genet.* 12(1):13.

I.8 Detección del SNP *CYP2C19*17*

La detección del SNP *CYP2C19*17* requiere la implementación de una técnica molecular que sea sensible, rápida y de bajo costo. Estas características las reúne la PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), una técnica que combina la amplificación de un segmento de ADN mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y la digestión enzimática de estos fragmentos amplificados utilizando una enzima de restricción específica para el polimorfismo en estudio. Esta técnica cualitativa requiere de una estandarización y optimización de las condiciones analíticas, con el fin de asegurar una amplificación y digestión enzimática. Dadas sus ventajas, la PCR-RFLP ha demostrado ser útil para la detección de mutaciones puntuales causadas por el cambio de una base nitrogenada, así como pequeñas deleciones o inserciones²⁷.

Considerando lo anterior, la implementación de las técnicas de PCR-RFLP y HPLC en un laboratorio clínico, es de vital importancia para realizar el monitoreo terapéutico del medicamento en los pacientes tratados con voriconazol, así como el reconocimiento de la presencia del SNP *CYP2C19*17* y su eventual influencia sobre los niveles plasmáticos de voriconazol, siendo posible a largo plazo establecer una asociación entre los niveles subterapéuticos y la presencia del SNP, lo cual permitirá aportar desde la farmacogenética con un pronóstico de la posible respuesta terapéutica del paciente al medicamento.

II. HIPÓTESIS

La validación de un método analítico para la determinación de niveles plasmáticos de voriconazol y polimorfismos en el gen *CYP2C19* proporcionan datos precisos, reproducibles y confiables para futuros usos en la práctica clínica.

III. OBJETIVOS

General:

- Implementar una metodología para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante la técnica de HPLC e implementar la técnica de PCR-RFLP para la detección de polimorfismos del SNP *CYP2C19*17*.

Específicos:

- Optimizar las condiciones analíticas para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC.
- Determinar parámetros de calidad: especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, exactitud, precisión y robustez del método para determinar concentraciones plasmáticas de voriconazol.
- Determinar condiciones óptimas para la detección del SNP *CYP2C19*17* mediante la técnica de PCR – RFLP.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Optimización de condiciones analíticas para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC.

Para dar cumplimiento a este objetivo se tomó como referencia la metodología descrita por *Rose, 2010*²⁰, basada en la extracción líquido – líquido del analito con solvente orgánico en medio básico y posterior reconstitución con fase móvil, utilizando como estándar interno ketoconazol.

La técnica montada se realizó en un equipo HPLC Agilent, Infinity serie 1260, equipado con los siguientes módulos: Inyector manual (G1328C), bomba cuaternaria con desgasificador en línea (G1311B), compartimento de temperatura de la columna (G1316A), detector de arreglo de diodos (VL G1315D).

El método HPLC para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol fue optimizado y validado en las dependencias del Laboratorio de Bioquímica y Urgencia del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

2. Determinación de parámetros de calidad.

A continuación se explica la determinación de los parámetros utilizados en la validación del método para cuantificar concentraciones plasmáticas de voriconazol.

2.1 Especificidad

La especificidad es la capacidad de medir exacta y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes que pudieran estar presentes en la muestra²⁸.

Para fines de identificación, se determinó la especificidad del método mediante evaluación visual del cromatograma²⁸, comparando la señal obtenida al medir una solución blanco con soluciones de concentración conocida preparadas a partir de la misma matriz del blanco.

2.2 Límite de Detección (L.D.) y Límite de Cuantificación (L.C.)

El L.D. se define como la más baja concentración de un analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, mientras que el L.C. corresponde a la más baja concentración de un analito en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables en las condiciones operativas indicadas del método²⁸.

Se realizó una curva de calibración a bajas concentraciones con 6 niveles (excluyendo el punto cero). Mediante la estimación del error estándar del intercepto-y (**EEI**) y la pendiente (**m**) de la curva de calibración se determinó tanto el límite de detección, como el de cuantificación, utilizando las ecuaciones (1) y (2)²⁸.

$$L.D. = 3.3 * \frac{EEI}{m} \quad \text{ecuación (1)}$$

$$L.C. = 10 * \frac{EEI}{m} \quad \text{ecuación (2)}$$

Tanto los valores **EEI** como la pendiente **m** fueron determinados con el software Origin 6.0.

2.3 Linealidad

Se define como la capacidad del método de entregar una respuesta o resultados instrumentales directamente proporcionales a la concentración de analito, dentro de un rango dado^{18,28}.

Para determinar si las concentraciones y la señales analíticas presentan un comportamiento lineal, se realizó una evaluación de curva de calibración global, construida a partir de tres curvas de calibración de características similares¹⁸, utilizando 6 niveles de concentración. Con los datos obtenidos se aplicaron las estadísticas del coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y una evaluación estadística mediante la prueba t de Student utilizando la ecuación (3)¹⁸.

$$t_{\text{calc}} = \frac{|r| \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad \text{ecuación (3)}$$

En donde t_{calc} corresponde al valor del estimador t de Student obtenido para el coeficiente de correlación, r al promedio del coeficiente de correlación, r^2 al coeficiente de determinación y $n-2$ al número de grados de libertad.

2.4 Exactitud

Corresponde al grado de concordancia entre el valor de referencia aceptado y el valor encontrado en una muestra²⁸.

Se midió el porcentaje de recuperación (%R) del analito, mediante la recolección de datos a partir de nueve determinaciones en total (tres concentraciones distintas y por triplicado), utilizando la ecuación (4)²⁸.

$$\%R = \frac{Ce}{Ca} * 100 \quad \text{ecuación (4)}$$

Donde Ce corresponde a la concentración del analito en la muestra y Ca es la concentración del analito agregada.

De los datos obtenidos se calculó el promedio (\bar{X}) del porcentaje de recuperación, la desviación estándar (DS) y la desviación estándar residual (RSD) para el total de muestras. Se consideran los criterios de aceptación para la determinación de la exactitud, un valor promedio total %R entre 98 y 102 %, con una $RSD \leq 2$ %. La RSD se calculó utilizando la ecuación (5)²⁸.

$$RSD = \frac{DS}{\bar{X}} * 100 \quad \text{ecuación (5)}$$

2.5 Precisión

La precisión de un método analítico se define como el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales, producto de los análisis repetidos de una muestra homogénea. Normalmente la precisión del método se evalúa a nivel de la repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad²⁸.

Se procedió a evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia del método, según se explica a continuación:

- ❖ Repetibilidad: Es la capacidad del método de generar los mismos resultados en un intervalo corto de tiempo y bajo las mismas condiciones. Se determinó midiendo la señal de una solución de voriconazol de una concentración estándar 6 veces durante el mismo día, manteniendo las condiciones experimentales establecidas²⁸.

- ❖ Precisión Intermedia: Corresponde a la concordancia de los resultados del laboratorio dentro de variaciones que ocurren al azar al cambiar alguna condición experimental, por ejemplo, cambio de laboratorio y/o de analista, uso de otro equipo, utilización de nuevos reactivos, entre otros. En este caso, dos analistas prepararon y analizaron 10 réplicas de una solución de concentración conocida, bajo las condiciones experimentales establecidas^{18,28}.

Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia fueron validadas mediante la determinación de la desviación estándar residual (RSD), la cual se calcula según la ecuación (5), en donde DS corresponde a la desviación estándar de las lecturas y \bar{X} al promedio de estas. El criterio de aceptación utilizado para las dos pruebas fue una $RSD \leq 2$ % para todos los analistas²⁸.

2.6 Robustez

Se define como la capacidad del método de resistir pequeños cambios en las condiciones analíticas del mismo¹⁸.

Se realizó la prueba de robustez de Younden y Steiner¹⁸, en donde se evaluó el efecto de siete variables a través de 8 análisis de una sola muestra,.

Las variables modificadas fueron asignadas con un valor alto (X) y un valor bajo (x) respecto al valor nominal del método (Tabla 4).

Tabla 4: Modelo de prueba de robustez de Younden y Steiner

Condición Variable	Clave (X,x)	Valor alto (X)	Valor nominal	Valor bajo (x)
Tiempo agitación (s)	A,a	40	30	20
Número de extracciones	B,b	3	2	1
pH Buffer	C,c	4,4	4,7	5
Temperatura columna (°C)	D,d	38	35	32
Velocidad de flujo (mL/min)	E,e	1,2	1	0,8
Longitud de onda (nm)	F,f	256	254	252
% buffer en fase móvil	G,g	51	49	47

Cada variable fue medida combinando los valores dentro de los 8 ensayos correspondientes (Tabla 5).

Tabla 5: Combinación de variables para ensayo de robustez

Valor de la condición variable	ENSAYO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	A	A	A	A	a	a	a	a
B,b	B	B	B	b	B	b	b	b
C,c	C	c	C	c	C	c	C	c
D,d	D	D	D	d	d	d	d	D
E,e	E	e	E	e	e	E	e	E
F,f	F	f	f	F	F	f	f	F
G,g	G	g	g	G	g	G	G	g
	SEÑAL (mUA)							
	s	t	u	v	w	x	y	z

De las señales obtenidas en cada ensayo se obtuvo la desviación estándar y se calculó el efecto de cada variable. Como criterio de aceptación para cada parámetro, se estableció la condición dada por la ecuación (6)¹⁸.

$$\Delta < \sqrt{2} * DS \quad \text{ecuación (6)}$$

En donde Δ corresponde a la diferencia entre el promedio obtenido de las señales de valor alto, menos el promedio de las señales de valor bajo para cada variable y DS es la desviación estándar de las señales obtenidas de los 8 ensayos (s, t, u, v, w, x, y, z).

3. Correlación de resultados con otros centros asistenciales.

Se realizaron comparaciones entre los resultados del laboratorio del HLCCM y los obtenidos por otros establecimientos que utilizan la misma metodología. La correlación entre nuestro método y los de comparación se comprobó mediante el análisis de Passing y Bablok, en el cual tomando en consideración una probabilidad de un 95 %, se considera como criterio de aceptación un intervalo de confianza para la pendiente que contiene el número 1, mientras que el intervalo del intercepto debe contener el número 0, lo cual demuestra que no existe error sistemático ni diferencias proporcionales entre ambos métodos²⁹.

Para que el test de Passing y Bablok sea válido, es necesario además verificar que la relación entre ambos métodos de medición sea estable en el intervalo de estudio²⁹. Para comprobarlo, se aplica un test de linealidad de dos colas³⁰. La hipótesis nula (H_0) afirma que la relación entre las dos variables es lineal, mientras que la hipótesis alternativa (H_1) afirma lo contrario. Como criterio de aceptación de H_0 , el valor p calculado debe ser mayor que el nivel de significación $\alpha = 0.05$. Sólo una vez que la linealidad está demostrada estadísticamente, es posible determinar la correlación entre ambos métodos.

Los cálculos de la pendiente y el intercepto de la correlación, así como el valor p calculado para el test de linealidad fueron determinados mediante el programa XLSTAT 2014.3.04.

4. Estandarización de la técnica de detección del SNP *CYP2C19*17* mediante la técnica de PCR-RFLP.

4.1 Extracción del material genético

El ADN utilizado se extrajo a partir de 0.2 mL de sangre con el sistema comercial QiAamp® DNA blood Mini Kit (250), según las instrucciones entregadas por el proveedor. Posteriormente, el ADN extraído se resuspendió en 100 µL de agua grado biología molecular y se almacenó a -20 °C hasta el momento del análisis (esta etapa no fue considerada como parte de la realización de esta tesis, debido a que se contó con las muestras de ADN previamente extraídas).

4.2 PCR

Se amplificó un fragmento de 470 bp en termociclador EPPENDORF Mastercycler® nexus, utilizando los partidores 5'-GCCCTTAGCACCAAATCTTC-3' y 5'-TTTAACCCCCTAAAAAACACG-3', descritos por *Dai y cols, 2012*²⁴. Se estandarizaron y optimizaron las condiciones analíticas del procedimiento: concentración de ADN y de reactivos (Tabla 6), temperatura de denaturación del material genético, extensión y ciclos de amplificación necesarios para la reacción (Tabla 7).

Tabla 6: Protocolo final utilizado para la realización de la PCR

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Agua	11	-----
Buffer (GoTaq®)	5	1X
MgCl ₂	2	2 mM
dNTP's	0.5	0.2 mM
Partidor 1	0.5	0.2 µM
Partidor 2	0.5	0.2 µM
Taq polimerasa (GoTaq®)	0.5	1 U
Templado de ADN	5	-----
Volumen final	25	

Tabla 7: Programa de ciclos para la PCR

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)	Número de ciclos
Denaturación inicial	95	7:00	1
Denaturación	95	0:30	40
Alineamiento	54	0:40	
Extensión	72	1:30	
Extensión final	72	10:00	1
Reposo	10	Indefinido	1

Para visualizar los fragmentos amplificados, los productos de la PCR se sometieron a electroforesis (BIO – RAD PowerPac™ Basic) durante 40 minutos a 80 Voltios, en gel de agarosa al 2% y visualizados con luz UV. Como agente de tinción del material genético se utilizó *Gel Red* (Biotium, 10,000 X en DMSO).

4.3 Digestión enzimática

Los productos de la PCR se digirieron con la enzima *Lwe I* (SfaNI), a 37 °C durante 3 horas²⁴ bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio (Tabla 8). Posteriormente los fragmentos de la digestión se separaron en geles de poliacrilamida al 10% (Tabla 9).

Tabla 8: Protocolo para preparación de gel de poliacrilamida

Reactivo	Volumen
Agua	5 mL
Acilamida:Bisacilamida 29:1 (30% v/v. Winkler)	2.2 mL
Buffer TAE (pH 8.3. Merck)	296 µL
Persulfato de amonio (98.7% pureza. Winkler)	73.5 µL
TEMED (grado ultra puro. Amresco)	7.35 µL

Tabla 9: Protocolo final para preparación de la digestión enzimática

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración final
Agua	3.75	-----
Buffer Tango (Thermo Scientific)	2	1X
Enzima	0.25	2.5 U
Productos de PCR	14	-----

4.4 Límite de detección

Se determinó la concentración mínima de ADN templado para la reacción de PCR., realizando diluciones sucesivas a partir de una muestra de ADN de concentración conocida. Las diluciones se sometieron a PCR según las condiciones del método, en búsqueda de aquella concentración que no mostrara el fragmento de amplificación de 470 bp en el gel de agarosa.

V. RESULTADOS

En esta sección se presentan los resultados logrados en base a los objetivos específicos y descritos según las condiciones estipuladas en la unidad de materiales y métodos.

1. Optimización de condiciones analíticas para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC.

1.1 Preparación de calibradores y controles de calidad

Se realizó una curva de calibración de 6 niveles con concentraciones de 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 15.0 $\mu\text{g/mL}$ (figura 3) a partir de una solución madre de voriconazol (Pfizer, 100% de pureza) de concentración 15 $\mu\text{g/mL}$, además de 2 niveles de control de calidad de concentración 1 y 5 $\mu\text{g/mL}$.

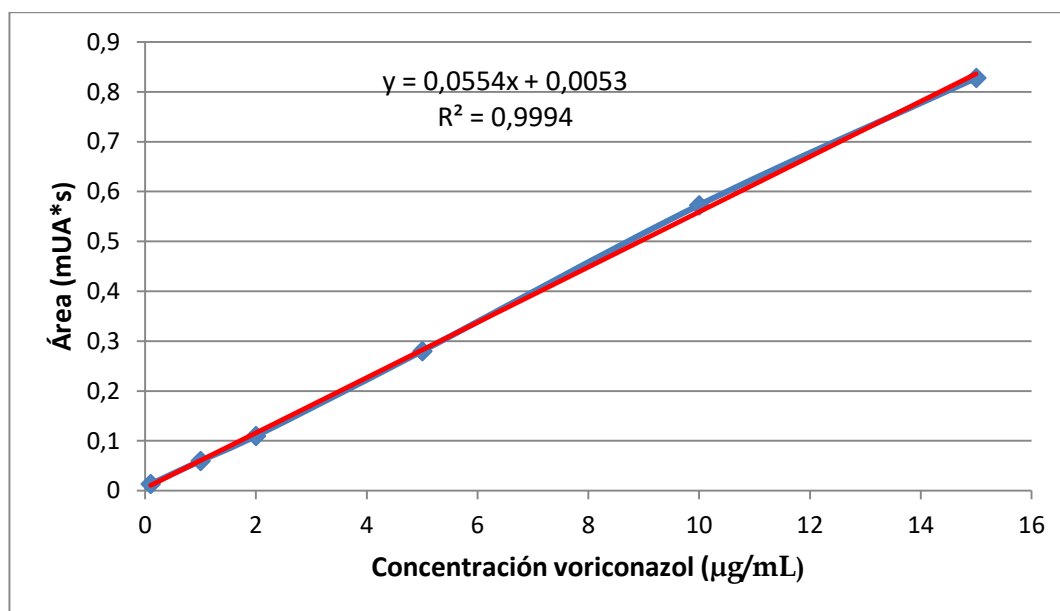


Figura 3: Curva de calibración representativa para determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol. La curva se compone de 6 niveles con concentraciones de 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 15.0 $\mu\text{g/mL}$. En el eje y se grafica el área obtenida para cada concentración del analito.

1.2 Preparación del estándar interno

Se preparó una solución madre de ketoconazol (Sigma, $\geq 98\%$ de pureza) a una concentración de 2 mg/mL utilizando como solvente metanol grado HPLC (Merck, 99.9% de pureza) al 75% v/v, a partir de la cual se preparó una solución de trabajo de concentración 200 $\mu\text{g/mL}$.

1.3 Extracción del analito (voriconazol) a partir de los calibradores, controles y muestras problemas

Con el propósito de aislar el voriconazol y el estándar interno de las muestras problema, calibradores y controles, se realizó una extracción líquido – líquido, según el siguiente protocolo:

En tubos de vidrio tapa rosca debidamente rotulados se agregaron consecutivamente 200 μL de muestras, calibradores y/o controles, 20 μL de estándar interno y 200 μL de NaOH 0.05 M. Luego la mezcla se agitó en vortex durante 20 segundos y posteriormente se adicionó bajo campana de extracción 1 mL de tert-butil metil éter grado HPLC (Merck, 99.8% de pureza). A continuación se taparon los tubos, se agitó durante 20 segundos y centrifugaron entre 4 y 6 $^{\circ}\text{C}$ (Centrífuga Sorval *RT*) a 3500 rpm por 5 minutos. Se extrajo la fase orgánica (superior) y se llevó a sequedad en baño termostático a 80 $^{\circ}\text{C}$.

Posterior a la extracción, todas las muestras se reconstituyeron con 100 μL de fase móvil.

1.4 Cuantificación del voriconazol

La medición se realizó a partir del cociente resultante del área bajo la curva (ABC) obtenida por el analito y el ABC del estándar interno, siendo las condiciones del método para el equipo las indicadas en la Tabla 10.

Tabla 10: Condiciones cromatográficas para cuantificación de niveles plasmáticos de voriconazol

Parámetro	Condiciones
Modo de elución	Isocrático
Columna	SHODEX 5C8 4D. 4.6 x 150 mm x 5 µm
Temperatura de la columna	35 °C
Fase móvil	Acetonitrilo:buffer acetato de sodio = 51:49 (v/v)
Flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	50 µL
Longitud de onda de detección	254 nm

2. Determinación de parámetros de calidad.

A continuación se detallan los resultados correspondientes a la determinación de los parámetros utilizados en la validación del método para cuantificar concentraciones plasmáticas de voriconazol

2.1 Especificidad

Se compararon visualmente los cromatogramas obtenidos a partir de la determinación de una solución blanco y a las concentraciones de 1.0 y 5.0 µg/mL de voriconazol más la señal del estándar interno (Figuras 4, 5 y 6).

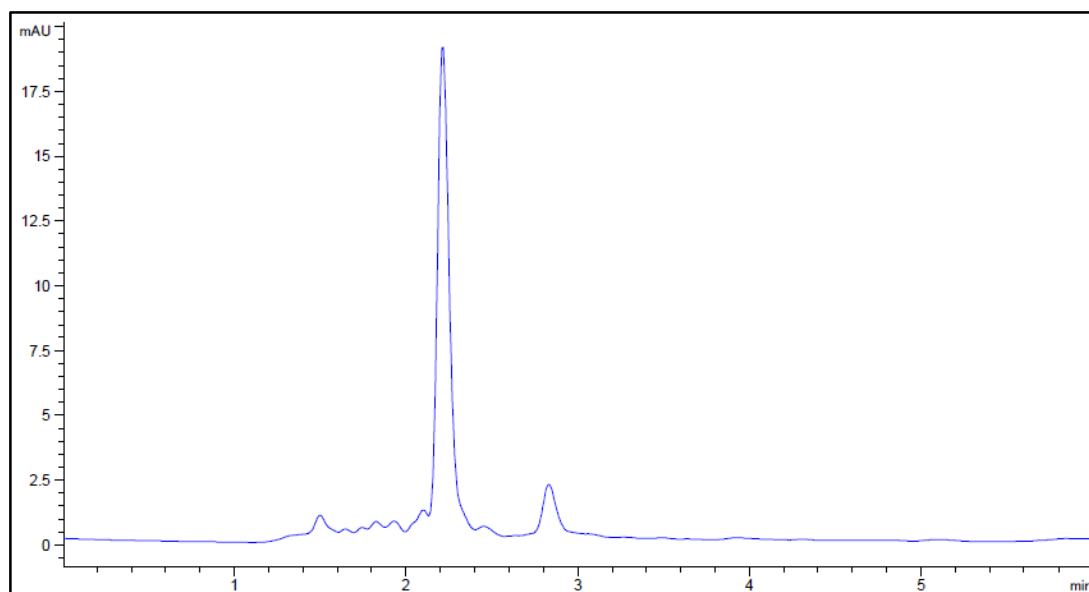


Figura 4: Cromatograma representativo de una solución blanco. El cromatograma muestra las señales generadas por una solución blanco, con ausencia de picos cromatográficos tanto para el voriconazol como el estándar interno.

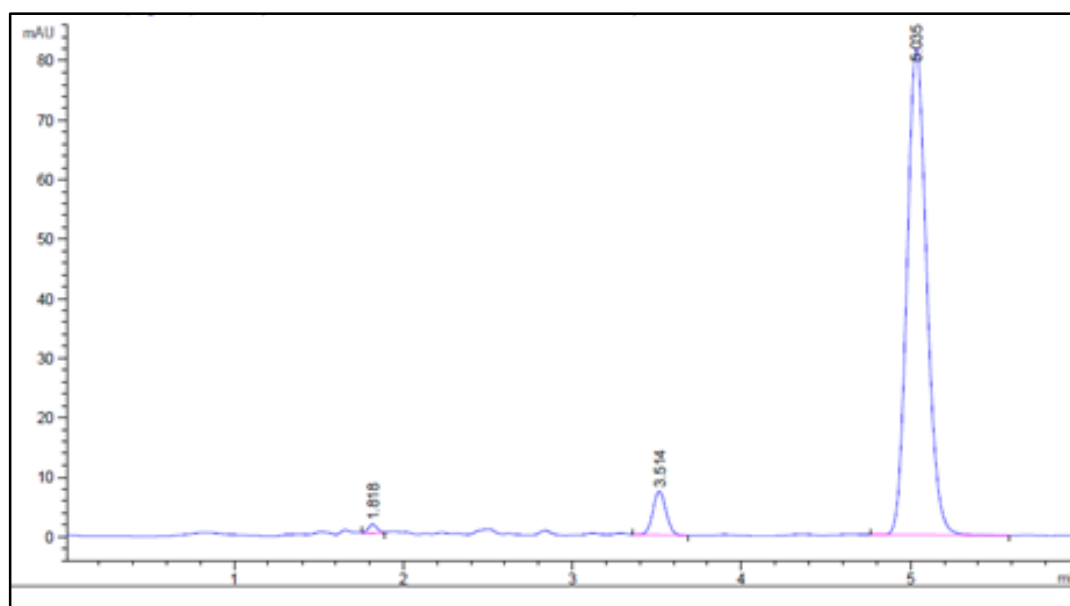


Figura 5: Cromatograma representativo de una solución de voriconazol de concentración 1.0 µg/mL. El cromatograma muestra las señales generadas por el voriconazol a los 3.5 minutos a una concentración nominal de 1.0 µg/mL y el estándar interno a los 5.1 minutos aproximadamente.

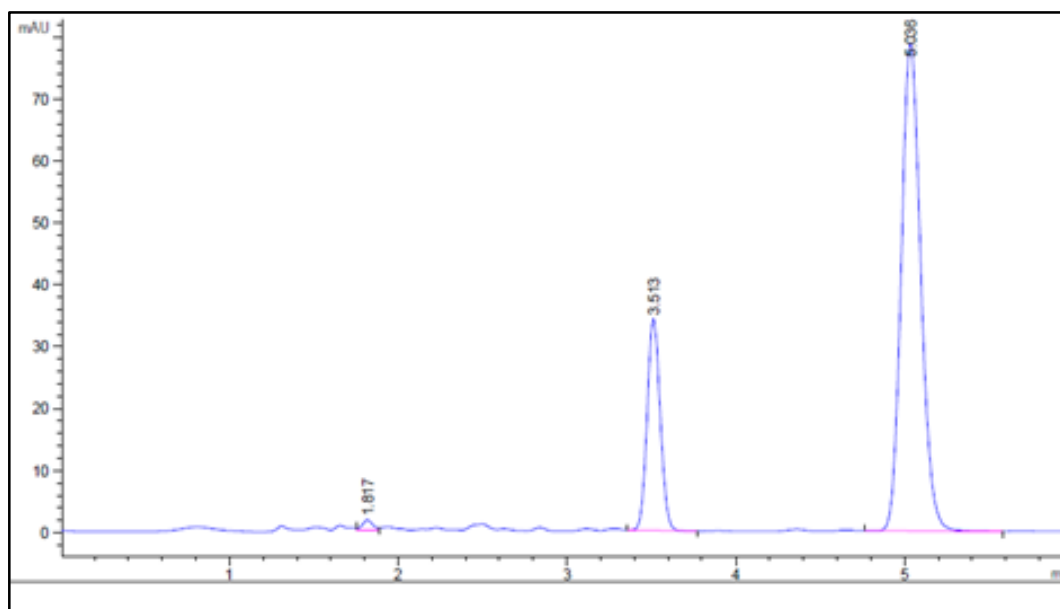


Figura 6: Cromatograma representativo de una solución de voriconazol de concentración 5.0 µg/mL. El cromatograma muestra las señales generadas por el voriconazol a los 3.5 minutos a una concentración nominal de 5 µg/mL y el estándar interno a los 5.1 minutos aproximadamente.

2.2 Límite de detección y límite de cuantificación

Se realizó una curva de calibración a bajas concentraciones con 6 niveles: 0.025, 0.1, 0.25, 1.0, 2.0 y 2.25 µg/mL, respectivamente. De los datos de la curva se obtuvieron los valores del *EEI* y la pendiente *m*, mientras que el L.D y L.C. fueron calculados a partir de las ecuaciones 1 y 2 (Tabla 11).

Tabla 11: Límites de detección y de cuantificación para voriconazol

Parámetro	Valor
<i>EEI</i>	5.97×10^{-4}
<i>m</i>	0.0642
L.D.	0.03 µg/mL
L.C.	0.09 µg/mL

Los valores tanto del L.D. como del L.C. son suficientes para los fines previstos en el laboratorio, en función del rango de concentraciones útiles en el ámbito clínico. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

2.3 Linealidad

Se realizó una evaluación de curva de calibración global, realizando la medición por triplicado de 6 niveles a las concentraciones de 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 15.0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 12).

Tabla 12: Resultados de curva de calibración global

Nivel (n)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Área 1	Área 2	Área 3	Área promedio	Desv. Estándar	RSD
1	0,1	0,0133	0,0121	0,0112	0,0122	0,0011	8,7325
2	1	0,0600	0,0739	0,0711	0,0683	0,0074	10,7691
3	2	0,1101	0,1153	0,1140	0,1131	0,0028	2,4334
4	5	0,2801	0,2561	0,2807	0,2723	0,0140	5,1465
5	10	0,5729	0,5675	0,6356	0,5920	0,0379	6,4006
6	15	0,8280	0,8077	0,9288	0,8549	0,0649	7,5861

Se obtuvieron las áreas a partir de las curvas de calibración medidas por triplicado. Se calcularon las áreas promedio, la desviación estándar y la RSD, respectivamente. Los valores de área promedio se utilizaron para correlacionar con las concentraciones del analito y confeccionar la curva de calibración global.

De los valores resultantes se determinaron los parámetros estadísticos del promedio del coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación. Para realizar la evaluación estadística se utilizó la prueba t de Student según la ecuación (3), contrastando el valor del t calculado (t_{calc}) versus el t tabulado (t_{tab}) (Tabla 13). Si el valor de t calculado es mayor que el valor t tabulado, con un 95% de probabilidad y $n - 2$ grados de libertad, se rechaza la hipótesis nula H_0 y se puede concluir que existe correlación lineal significativa

Tabla 13: Valores estadísticos de la curva de calibración global

Parámetro	Valor
$n - 2$	4
r	0.9994
r^2	0.9988
t_{calc}	57.700
t_{tab}	2.776

A partir de la curva de calibración global se determinaron los parámetros estadísticos necesarios para realizar el contraste de hipótesis, del cual se obtiene que el valor t_{calc} es mayor al valor del t_{tab} , permitiendo en este caso rechazar la hipótesis nula H_0 . Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

2.4 Exactitud

Fue determinada a partir de 3 niveles analizados por triplicado y a las concentraciones 1.0, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando la ecuación (4) se calculó el porcentaje de recuperación (%R) para cada determinación (Tabla 14). De estos se calculó el promedio (\bar{X}), la desviación estándar (DS) y la desviación estándar residual (RSD), la que se determinó con la ecuación 5 (Tabla 15).

Tabla 14: Porcentaje de recuperación por cada nivel de concentración

Nivel 1 (1 $\mu\text{g/mL}$)	Nivel 2 (2 $\mu\text{g/mL}$)	Nivel 3 (3 $\mu\text{g/mL}$)
103.90	98.82	99.00
103.08	102.74	102.76
103.21	99.70	101.04

Tabla 15: Parámetros estadísticos a partir de los valores del %R

Parámetro	Valor
\bar{X}	101.6
DS	2.0
RSD	1.9

El valor promedio para el total de los %R obtenidos y el valor de la RSD se encuentran dentro del rango estipulado como criterio de aceptación. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

2.5 Precisión

Se presentan los resultados de la prueba de precisión del método, evaluada a través de los dos niveles que se detallan a continuación

❖ Repetibilidad

Fue determinada midiendo 6 veces en el mismo día una solución de voriconazol de concentración 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 16), sin variar las condiciones experimentales. Se calculó a partir de ellas el promedio (\bar{X}) de las áreas, la desviación estándar (DS) y la desviación estándar residual (RSD) (Tabla 17).

Tabla 16: Áreas obtenidas para la prueba de repetibilidad

Inyección	Área (mUA*s)
1	0.0599
2	0.0596
3	0.0597
4	0.0589
5	0.0590
6	0.0605

Tabla 17: Parámetros estadísticos a partir de las áreas obtenidas para la prueba de repetibilidad

Parámetro	Valor
\bar{X}	0.0596
DS	0.0006
RSD	0.97

De los datos tabulados, se obtiene que el valor de la RSD cumple con el criterio de aceptación estipulado para este parámetro. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

❖ Precisión intermedia

Para su determinación se utilizó una solución de concentración 2 µg/mL, la que fue medida 10 veces por dos analistas (Tabla 18), manteniendo las demás condiciones experimentales, mientras que los parámetros estadísticos del promedio (\bar{X}), desviación estándar (DS) y desviación estándar residual (RSD) calculados a partir de las áreas obtenidas (Tabla 19).

Tabla 18: Áreas obtenidas por dos analistas distintos para la prueba de precisión intermedia

Inyección	Analista 1 (mUA*s)	Analista 2 (mUA*s)
1	0.1082	0.1180
2	0.1076	0.1203
3	0.1092	0.1196
4	0.1109	0.1230
5	0.1089	0.1195
6	0.1082	0.1180
7	0.1118	0.1209
8	0.1112	0.1244
9	0.1062	0.1224
10	0.1069	0.1222

Tabla 19: Parámetros estadísticos a partir de las áreas obtenidas para la prueba de precisión intermedia

Parámetro	Analista 1	Analista 2
\bar{X}	0.1089	0.1208
DS	0.0019	0.0021
RSD	1.73	1.77

De los datos tabulados, se obtiene que los valores de la RSD de los analistas 1 y 2 cumplen con el criterio de aceptación estipulado para este parámetro. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

2.6 Robustez

Se realizaron 8 determinaciones a distintas condiciones (Tabla 20). De las áreas obtenidas se calcularon los parámetros necesarios para utilizar la ecuación 6, a partir de la cual se obtienen los valores necesarios para evaluar el criterio de aceptación (Tabla 21).

Tabla 20: Condiciones y áreas obtenidas para la prueba de robustez

Variable	ENSAYO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A,a	40	40	40	40	20	20	20	20
B,b	3	3	3	1	3	1	1	1
C,c	5	4.4	5	4.4	5	4.4	5	4.4
D,d	38	38	32	32	32	32	38	38
E,e	1.2	0.8	1.2	0.8	0.8	1.2	0.8	1.2
F,f	256	252	252	256	256	252	252	256
G,g	51	47	47	51	47	51	51	47
	ÁREA (mUA*s)							
	0.09	0.14	0.13	0.13	0.17	0.12	0.09	0.16

A,a. Tiempo de agitación (s). **B,b.** Número de extracciones. **C,c.** pH del buffer. **D,d.** Temperatura columna (°C). **E,e.** Velocidad de flujo (mL/min). **F,f.** Longitud de onda. **G,g.** % buffer en fase móvil.

Tabla 21: Resumen de valores obtenidos para validación de la robustez

Variable	Promedio	Δ	$\sqrt{2} * DS$
A	0.125	0.012	0.039
a	0.137		
B	0.134	0.007	
b	0.128		
C	0.122	0.017	
c	0.140		
D	0.124	0.015	
d	0.138		
E	0.129	0.005	
e	0.133		
F	0.139	0.016	
f	0.123		
G	0.110	0.042	
g	0.152		

En la tabla se ordenan los datos en función de las variables estudiadas. El promedio en cada celda es el resultado del cálculo de la media de los cuatro análisis que contienen la variable en su valor más alto (letra mayúscula) y aquellas que corresponden al valor más bajo (letra minúscula). Cada valor Δ corresponde a la diferencia entre la variable de mayor valor versus la de menor valor. Finalmente se muestra el producto de la operación $\sqrt{2} * DS$ (0.039), siendo DS la desviación estándar de la precisión del método. Los valores de Δ se contrastan con el valor 0.039, pudiendo apreciar que todas las variables cumplen con el criterio de aceptación, a excepción del % de buffer en la fase móvil. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

3. Correlación de resultados con otros centros asistenciales.

Se compararon los resultados obtenidos por dos laboratorios que utilizan metodologías similares y el laboratorio de HLCM (Tablas 22 y 24). Para la primera comparación (Comparación 1) se consideraron 17 muestras y para la segunda 10 (Comparación 2). En ambos casos fue utilizada la regresión de Passing y Bablok y se determinaron los estadísticos de la prueba de linealidad (Tablas 23 y 25). En los anexos 1 y 2 se muestran los gráficos correspondientes a cada correlación.

Tabla 22: Comparación entre metodología HLCM versus Comparación 1

Muestra	HLCM (µg/mL)	Comparación 1 (µg/mL)
1	0.21	0.2
2	0.31	0.4
3	0.79	0.7
4	1.15	0.8
5	1.03	0.9
6	1.18	1.5
7	1.6	1.9
8	1.76	1.9
9	1.38	1.9
10	1.55	2.1
11	1.67	2.1
12	3.09	2.8
13	3.32	3.3
14	2.73	4.1
15	5.45	5.7
16	7	7.3
17	8.76	7.8

En la tabla se muestran las concentraciones plasmáticas de voriconazol de 17 muestras distintas de pacientes y obtenidas por la metodología validada en el HLCM versus la de un método de comparación 1.

Tabla 23: Parámetros estadísticos de la correlación de Passing y Bablok y test de linealidad para el método de Comparación 1

Parámetro	Estimación	Intervalo de aceptación
Intercepto	- 0.066	- 0.357 – 0.268
Pendiente	0.968	0.746 – 1.114
Valor p calculado	0.625	
Valor alfa	0.05	

La tabla muestra el intercepto y la pendiente de la correlación de Passing y Bablok, además de los intervalos de aceptación para ambos estimadores. En ambos casos los intervalos aprueban el criterio de aceptación de esta prueba. Para la prueba de linealidad aplicada, el valor p calculado cumple con el criterio de aceptación al contrastarse con el valor alfa. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

Tabla 24: Comparación entre metodología HLCM versus Comparación 2

Muestra	HLCM (µg/mL)	Comparación 2 (µg/mL)
1	0,30	0,175
2	0,25	0,205
3	0,76	0,492
4	1,89	0,667
5	1,15	1,105
6	3,86	1,768
7	2,61	2,128
8	0,60	3,310
9	5,12	4,622
10	5,58	5,781

En la tabla se muestran las concentraciones plasmáticas de voriconazol de 10 muestras distintas de pacientes y obtenidas por la metodología validada en el HLCM versus la de un método de comparación 2.

Tabla 25: Parámetros estadísticos de la correlación de Passing y Bablok y test de linealidad para el método de Comparación 2

Parámetro	Estimación	Intervalo de aceptación
Intercepto	0.066	-0.985 – 0.740
Pendiente	1.103	0.722 – 2.429
Valor p calculado	0.819	
Valor Alfa	0.05	

La tabla muestra el intercepto y la pendiente de la correlación de Passing y Bablok, además de los intervalos de aceptación para ambos estimadores. En ambos casos los intervalos aprueban el criterio de aceptación de esta prueba. Para la prueba de linealidad aplicada, el valor p calculado cumple con el criterio de aceptación al contrastarse con el valor alfa. Para mayor detalle refiérase a la discusión de los resultados.

4. Estandarización de la técnica de detección del SNP *CYP2C19*17* mediante la técnica de PCR-RFLP.

4.1 PCR

Se optimizaron las condiciones de la PCR para la obtención de un amplicón de 470 bp. Una muestra se amplificó mediante PCR, utilizando un gradiente de temperaturas de alineamiento entre 52 y 58 °C (Figura 7) para determinar cuál permitió un mejor rendimiento en la reacción, siendo 54 °C la temperatura escogida.

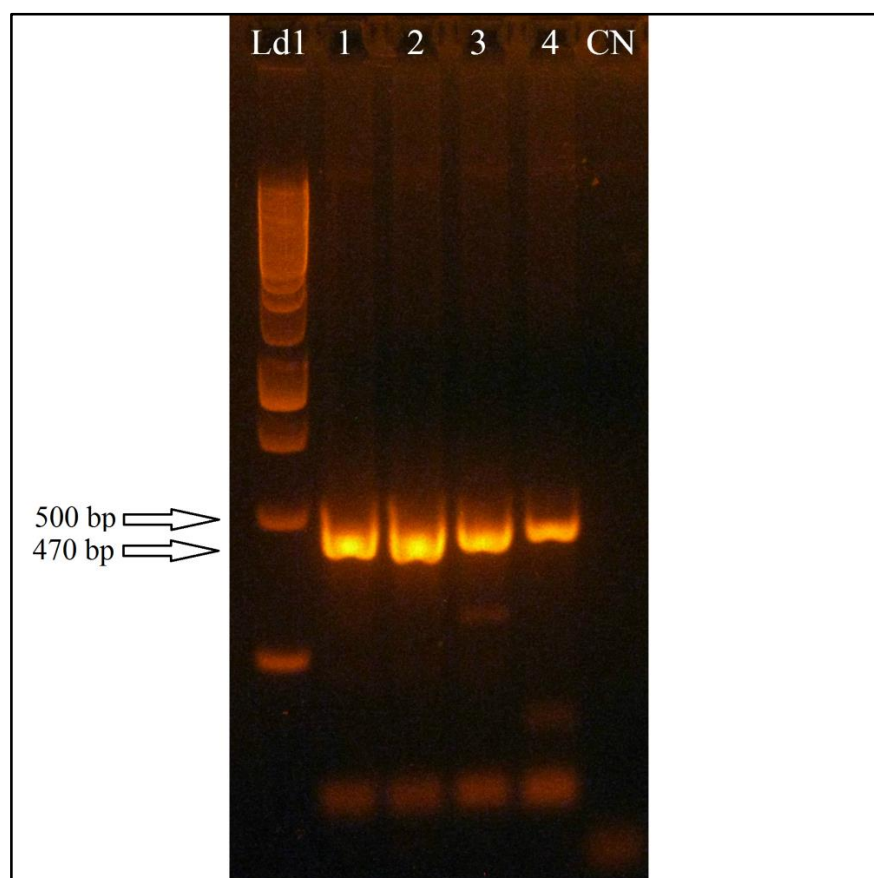


Figura 7: Prueba de temperatura de alineamiento en gel de agarosa. Se muestran los resultados de la PCR en gel de agarosa al 1%. Ld1 corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb. Los carriles 1, 2, 3 y 4 muestran una banda entre 400 y 500 bp, producto de reacciones de PCR de una muestra a distintas temperaturas de alineamiento: 52°, 54°, 56° y 58°C, respectivamente. CN es el control negativo.

4.2 Digestión enzimática

La digestión enzimática de los fragmentos de 470 bp permite el reconocimiento de los genotipos homocigoto *wild type* (*wt/wt*), heterocigoto mutado (*wt/mt*) y homocigoto mutado (*mt/mt*) para el SNP *CYP2C19*17* (La Figura 8 representa los resultados teóricos).

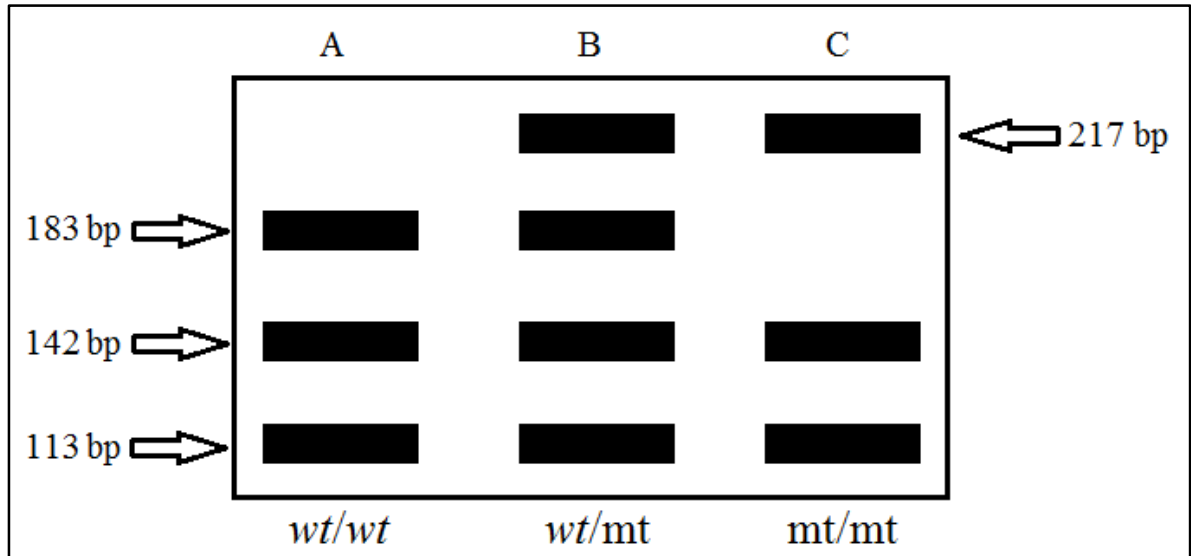


Figura 8: Esquema de cortes enzimáticos para la detección del SNP *CYP2C19*17*. Se visualiza el producto de la digestión enzimática sobre los fragmentos de 470 bp de la PCR, utilizando la enzima de restricción *Lwe I* para el reconocimiento del polimorfismo *CYP2C19*17*. **A.** Presencia de tres bandas (183, 142 y 113 bp), correspondientes al genotipo *wt/wt*. **B.** Presencia de cuatro bandas (217, 183, 142 y 113 bp), correspondientes al genotipo *wt/mt*. **C.** Presencia de tres bandas (217, 142 y 113 bp), correspondientes al genotipo *mt/mt*.

Los resultados de la digestión del fragmento amplificado de 470 bp con la enzima de restricción se visualizaron en geles de poliacrilamida, logrando obtener 3 aparentes bandas de interés de 183, 142 y 113 bp, correspondientes al genotipo *wild type*²⁴ (Figura 9).

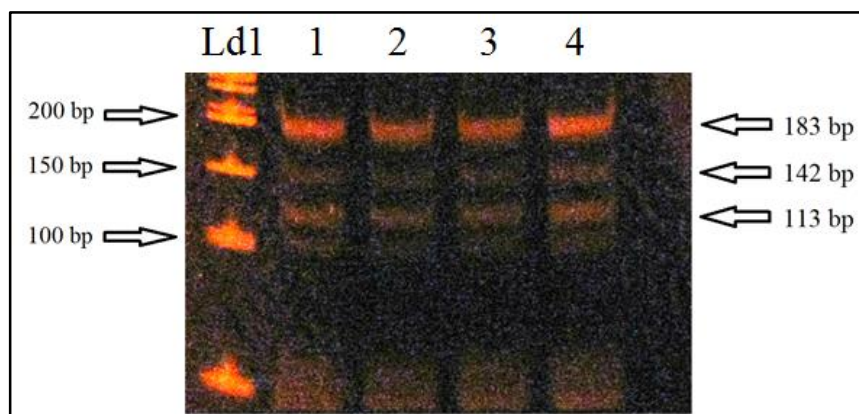


Figura 9: Resultados de la digestión enzimática en gel de poliacrilamida. Ld 1 corresponde al marcador de peso molecular de 50 bp. Los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a los fragmentos producidos por la digestión enzimática de ADN de cuatro muestras diferentes. Se aprecia la presencia de 3 fragmentos de interés de 183, 142 y 113 bp.

4.3 Límite de detección

Una muestra de ADN a una muestra concentración de 100 ng/ μ L, se utilizó para realizar 8 diluciones sucesivas de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 y 0.391 ng/ μ L. Estas diluciones se utilizaron como templado para la reacción por PCR y posterior electroforesis, observándose la amplificación del producto esperado hasta la dilución que contenía 12.5 ng/ μ L (Figura 10).

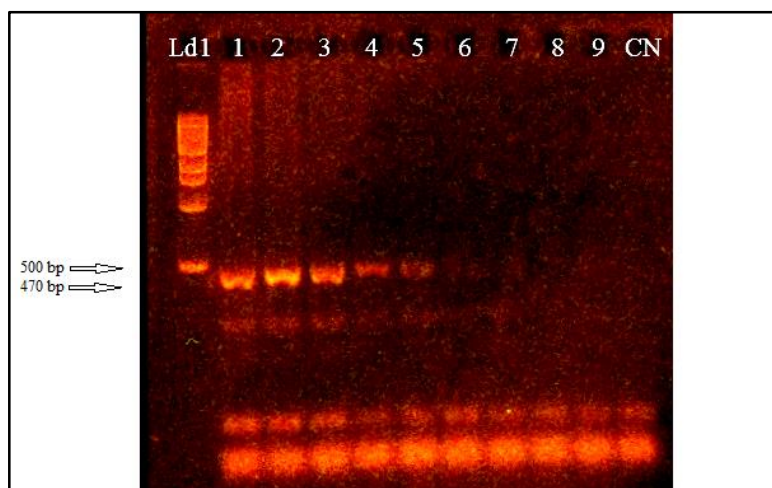


Figura 10: Prueba del límite de detección para PCR en gel de agarosa. Se realizó en gel de agarosa al 2%. Ld1 corresponde al marcador de peso molecular de 1 kb. Los carriles 1 al 9 corresponden a las distintas diluciones a 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.391 y 0.196 ng/ μ L, respectivamente. CN es el carril con el control negativo.

VI. DISCUSIÓN

El desarrollo y la validación de nuevas metodologías analíticas en el laboratorio clínico constituyen un gran aporte a la promoción de la salud, en vista de la creciente demanda de exámenes médicos, tanto para el diagnóstico y seguimiento de patologías, así como también para la optimización de los tratamientos farmacológicos.

El método HPLC demostró tener una buena especificidad para resolver los picos cromatográficos, tanto del voriconazol como del estándar interno, los cuales muestran una buena separación visual entre ellos, con tiempos de retención aproximados de 3.5 minutos para el analito y 5.1 minutos para el estándar interno. Además, al aumentar la concentración de analito en las muestras se visualiza claramente un aumento, tanto en la altura como área del pico cromatográfico. Esto permite comprobar que el tiempo de retención a los 3.5 min corresponde a la señal del voriconazol y no otra sustancia que pudiera interferir con la determinación.

Se calcularon el L.D. y el L.C, obteniéndose valores de 0.03 $\mu\text{g/mL}$ y 0.09 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El L.C. obtenido es mayor comparado al de la metodología descrita por *Rose, 2010*²⁰ (0.025 $\mu\text{g/mL}$), debido probablemente a las diferencias presentes en los equipos HPLC utilizados (Shimadzu vs Agilent), así como las diferencias en las condiciones analíticas en las que se realizó la validación del método. Sin embargo, el L.C. obtenido por nuestro método es suficiente para los fines previstos, ya que esta concentración se encuentra muy por debajo de la concentración 1.0 $\mu\text{g/mL}$, que es el piso terapéutico esperado de las concentraciones de voriconazol para profilaxis, en especial en los niños tratados en el HLCM.

La linealidad del método fue estudiada entre un rango de concentraciones de 0.1 a 15 $\mu\text{g/mL}$. Al contrastar el valor del t_{cal} (57.003) con el t_{tab} (2.776), es posible rechazar la hipótesis nula. Esto quiere decir que existe una correlación lineal entre las señales obtenidas y las concentraciones cuantificadas de analito. Dicho de otra forma, el método es capaz de entregar una señal proporcional a la cantidad de analito en la muestra.

El valor promedio total del porcentaje de recuperación 101.6% se encuentra dentro del rango estipulado como criterio de aceptación de 98 – 102 %, con una RSD 1.9%. Esto permite aprobar el parámetro de exactitud del método, comprobando que nuestro método es capaz de entregar resultados que concuerdan con el valor verdadero de las muestras.

El valor de la RSD obtenido de la prueba de repetibilidad permite validar este parámetro, ya que se encuentra dentro del rango de aceptación $RSD \leq 2\%$. De la prueba de precisión intermedia se obtuvo que la variabilidad asociada a la medición para ambos analistas, demostrada por los valores de la RSD para cada uno de ellos (1.73 y 1.77%) es $\leq 2\%$. Estos valores permiten aprobar el criterio de aceptación descrito para este parámetro de calidad, permitiendo comprobar que el método descrito es reproducible, aun realizándose cambios en las condiciones analíticas originales descritas por *Rose, 2010*²⁰.

En la prueba de robustez, al contrastar los valores de la diferencia del valor alto y bajo de cada variable (Δ) con la raíz cuadrada de la desviación estándar de la precisión del método (0.039) se tiene que tanto el análisis estadístico de: tiempo de agitación, número de extracciones, pH del buffer, temperatura de la columna, velocidad de flujo y longitud de onda dan valores inferiores a 0.039, por lo cual han de considerarse variables no sensibles y, por lo tanto, no afectan significativamente la señal entregada por el equipo al sufrir pequeñas variaciones. En cambio, el valor Δ asociado al porcentaje de la fase móvil (0.042) es mayor a 0.039, razón por la cual se le considera una variable sensible y debe, por lo tanto, mantenerse siempre o dentro de lo posible, el valor nominal de ella, para evitar aumentar significativamente la dispersión de los resultados.

Se comprobó que los resultados obtenidos en nuestro laboratorio el método es correlacionable con los de comparación mediante la correlación de Passing y Bablok, obteniéndose para ambos casos que los intervalos de confianza del intercepto y de la pendiente incluyen el número 0 y 1, respectivamente. De esta forma, se comprueba que no existen diferencias sistemáticas ni proporcionales entre nuestro método y los de comparación.

La prueba de linealidad de dos colas se realizó para probar que las curvas siguen un modelo lineal. Para ambos casos el valor p calculado fue mayor que el valor de $\alpha = 0.05$, por lo tanto, no es posible rechazar la hipótesis nula. Decimos entonces que la relación entre ambas variables, en ambos casos es lineal, por lo tanto la prueba de Passing y Bablok es válida.

Se logró optimizar y estandarizar las condiciones analíticas de la PCR-RFLP para la detección del SNP *CYP2C19*17*, logrando montar una técnica de bajo costo, rápida y simple para el estudio y detección del SNP *CYP2C19*17*. El análisis en gel de agarosa permitió comprobar la amplificación de un fragmento de 470 bp, lo que concuerda con la descripción dada por la metodología de *Dai y cols, 2012*²⁴, aunque también se amplificó otra banda de menor tamaño en todas las muestras, correspondiente probablemente a una amplificación inespecífica. La digestión enzimática permitió el reconocimiento aparente de 2 puntos de corte enzimáticos, sin embargo, los resultados de esta mostraron la presencia de otras bandas contaminantes, posiblemente producto de la amplificación inespecífica en el proceso de PCR, lo cual impide determinar exactamente el genotipo presente en las muestras estudiadas, a pesar de la detección de tres bandas de 183, 142 y 113 bp, lo que indicaría la presencia de un genotipo homocigoto *wild type* en las muestras analizadas. Es recomendable en el futuro realizar una purificación del producto de la PCR o modificar las condiciones, ya sea de la PCR como de la digestión, con el fin de resolver de mejor forma las bandas correspondientes a los cortes enzimáticos buscados y descritos en la bibliografía. Otra opción sería la utilización de partidores distintos a los ya descritos para la realizar la PCR y que hayan sido utilizados en otros estudios o, en su defecto, realizar un diseño de estos mediante algún software de bioinformática, realizando posteriormente una estandarización de la técnica, según las nuevas condiciones.

Por otra parte, se espera poder contar con un mayor número de muestras para la realización de más pruebas con la metodología descrita de PCR-RFLP, en búsqueda de hallar con certeza los genotipos homocigoto *wild type*, heterocigoto y homocigoto mutado. Como sugerencia adicional, es aconsejable realizar en paralelo una secuenciación de los productos de la PCR obtenidos de nuevas muestras, para comprobar la presencia del gen de

interés (*CYP2C19*) y la eventual presencia de SNPs, de tal forma de comparar estos resultados con aquellos obtenidos de la digestión enzimática, como describen varios autores^{24,31-33}. Esto permitiría validar la técnica PCR-RFLP para detectar el polimorfismo *CYP2C19*17*. Sin embargo, se recomienda a futuro perfeccionar las condiciones analíticas del método, en favor de mejorar la calidad e interpretación de los resultados.

La evaluación del límite de detección determinó como valor límite inferior de templado de ADN para amplificación por PCR, una concentración de 12.5 ng/μL, siendo esta una cantidad que normalmente se logra superar con el método de extracción de material genético utilizado. Al observar el patrón visual dejado por las bandas es posible apreciar un amplicón de 470 bp hasta la concentración de 6.25 ng/μL, pero esta no fue tomada como concentración inferior límite, debido a lo débil de la señal visible en el gel.

Las metodologías desarrolladas en esta tesis permitirán realizar en el HLCM estudios de farmacogenética asociados a la farmacocinética del voriconazol en individuos de nuestra población, lo que podría ser de gran utilidad en la administración de una terapia individualizada en los pacientes tratados con este medicamento, especialmente en pacientes pediátricos, ya que hasta el día de hoy no se ha logrado entender completamente la farmacocinética del fármaco en ellos, quedando esto demostrado en el amplio rango de dosis administradas a los pacientes para alcanzar concentraciones terapéuticas efectivas², lo que implica usualmente reajustar las dosis del medicamento. El tema es aún más complejo al tomar en cuenta que, en general, los niños tratados con voriconazol en el HLCM presentan un estado de severa inmunosupresión, por lo que se hace necesario proveer de herramientas, que permitan idealmente asegurar de forma inmediata niveles plasmáticos de voriconazol óptimos para la profilaxis o tratamiento de las enfermedades fúngicas, pues la falta de respuesta al tratamiento está muy asociada al aumento de la tasa de muerte de estos pacientes².

VII. CONCLUSIONES

1. Se logró optimizar las condiciones analíticas de un método cromatográfico para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol, basado en la extracción líquido – líquido del analito y cuantificación mediante HPLC.
2. La metodología para cuantificación de concentraciones plasmáticas de voriconazol mediante HPLC fue validada satisfactoriamente a través de la determinación de los parámetros de calidad: especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión y robustez.
3. El método HPLC implementado para la determinación de concentraciones plasmáticas de voriconazol es robusto en todas las variables evaluadas, con excepción de la composición en la fase móvil.
4. El límite de cuantificación obtenido permite que el método sea aplicable en la determinación de niveles plasmáticos de voriconazol.
5. Se implementó una metodología basada en la técnica molecular de PCR-RFLP para la detección del SNP *CYP2C19*17*.
6. La metodología molecular para detectar el SNP *CYP2C19*17* debe seguir optimizándose y lograr su validación por secuenciación de los amplicones.

VIII. PROYECCIONES

Recientemente, el comité de ética del HLCCM aprobó la ejecución del proyecto “Prevalencia del polimorfismo *CYP2C19*17* y su influencia sobre las concentraciones plasmáticas de niños tratados con dosis estándar de voriconazol”, por lo tanto, la medición de niveles plasmáticos de voriconazol y el estudio de los SNPs del gen *CYP2C19* permitirán realizar un estudio pionero en nuestro país, que asocie la farmacocinética del voriconazol a la farmacogenética, lo que marca un precedente en la administración de dosis individualizadas de fármacos, tomando en cuenta el factor genético.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Bidart TH. 2004. Rol de voriconazol y caspofungina en terapia antifúngica. *Rev Chil Infect.* 21(1):13–19.
2. Stockmann C, Constance JE, Roberts JK, Olson J, Doby EH, Ampofo K, Stiers J, Spigarelli MG, Sherwin CMT. 2014. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antifungals in Children and their Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet.* 53(5):429–454.
3. Narita A, Muramatsu H, Sakaguchi H, Sayoko D, Tanaka M, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Kudo K, Furokawa-Hibi Y, Yamada K, KOjima S. 2013. Correlation of CYP2C19 Phenotype With Voriconazole Plasma Concentration in Children. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35(5):219–223.
4. Gil.Aldea I, Ciria M, Ferrer RM, Sábada B, García-Quetglas E, Azanza JR. 2003. Nuevos medicamentos: Voriconazol. *Rev Med Univ Navarra.* 47(2):39–44.
5. Chen J, Chan C, Colantonio D, Seto W. 2012. Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole in Children. *Ther Drug Monit.* 34(1):77–84.
6. Karlsson MO, Lutsar I y Milligan PA. 2009. Population Pharmacokinetic Analysis of Voriconazole Plasma Concentration Data from Pediatric Studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(3):935–944.
7. Dolton MJ, Ray JE, Chen SCA, Ng K, Pont LG, McLachlan AJ. 2012. Multicenter Study of Voriconazole Pharmacokinetics and Therapeutic Drug Monitoring. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(9):4793–4799.

8. Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H. 2007. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 73(12):2020–2026.
9. Fica A. 2004. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol , itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infect.* 21(1):26–38.
10. Driscoll TA, Frangoul H, Nemecek ER, Murphey DK, Yu LC, Blumer J, Krance RA, Baruch A, Liu P. 2011. Comparison of Pharmacokinetics and Safety of Voriconazole Intravenous-to-Oral Switch in Immunocompromised Adolescents and Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(12):5780–5789.
11. Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Ibrahim JG, Benjamin DK, Thakker DR. 2010. In Vitro Hepatic Metabolism Explains Higher Clearance of Voriconazole in Children Versus Adults: Role of CYP2C19 and Flavin-Containing Monooxygenase 3. *Drug Metab Dispos.* 38(1):25–31.
12. 2012. Hospital de Niños Dr. Luis Calvo Mackenna. <http://www.calvomackenna.cl/> (página visitada el 21 de junio del 2014)
13. Rabagliati R y Santolaya ME. 2012. Profilaxis antifúngica en niños y adultos sometidos a trasplante de órganos sólidos y de precursores hematopoyéticos. *Rev Chil Infect.* 29(1):11–18.
14. Soler-Palacín P, Frick MA, Martín-Nalda A, Lanaspá M, Pou L, Roselló E, Díaz de Heredia C, Figueras C. 2012. Voriconazole drug monitoring in the management of invasive fungal infection in immunocompromised children: a prospective study. *J Antimicrob Chemother.* 67(3):700–706.

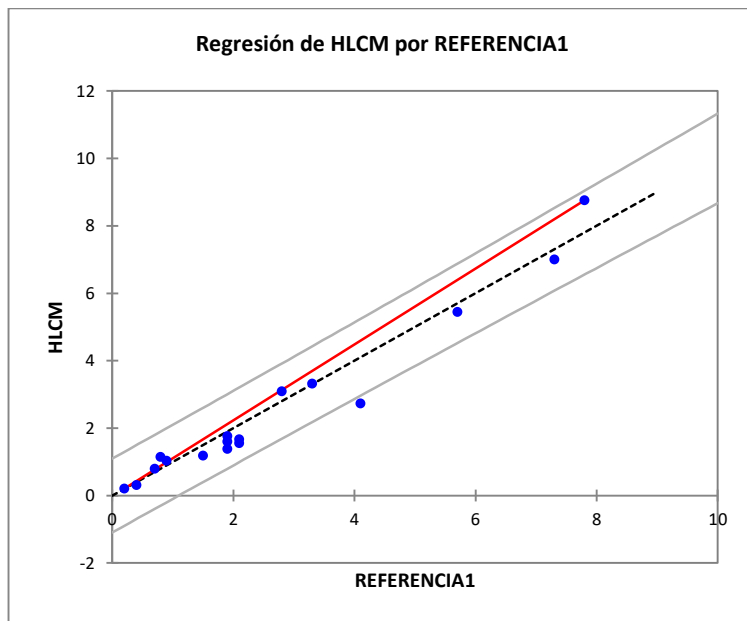
15. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. 2008. Voriconazole Therapeutic Drug Monitoring in Patients with Invasive Mycoses Improves Efficacy and Safety Outcomes. *Clin Infect Dis.* 46:201–211.
16. Obeng AO, Egelund EF, Alsultan A, Peloquin CA, Johnson JA. 2014. CYP2C19 Polymorphisms and Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole: Are We Ready for Clinical Implementation of Pharmacogenomics?. *Pharmacotherapy.* doi:10.1002/phar.1400.
17. Kuo IF y Ensom MHH. 2009. Role of therapeutic drug monitoring of voriconazole in the treatment of invasive fungal infections. *Can J Hosp Pharm.* 62(6):469–482.
18. Instituto de Salud Pública. 2010. Guía Técnica N° 1: Validación de Métodos y Determinación de Incertidumbre en la Medición. Aspectos Generales sobre la Validación de Métodos, Santiago, Chile.
19. Instituto Nacional de Normalización. Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17025. Of 2005. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración.
20. Rose C. 2010. Determination of Voriconazole and Posaconazole in Human Plasma. Memphis, TN, United States of America.
21. Genetics Home Reference. 2013. What are single nucleotide polymorphisms (SNPs)?. <http://ghr.nlm.nih.gov> (página visitada el 01 de julio del 2014).
22. Li-Wan-Po A, Girard T, Farndon P, Cooley C, Lithgow J. 2010. Pharmacogenetics of CYP2C19: functional and clinical implications of a new variant CYP2C19*17. *Br J Clin Pharmacol.* 69(3):222–230.

23. Hirota T, Eguchi S, Ieiri I. 2013. Impact of Genetic Polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the Pharmacokinetics of Clinically Used Drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 28(1):28–37.
24. Dai Z, Chen H, Wu X. 2012. Relationship between cytochrome P450 2C19*17 genotype distribution, platelet aggregation and bleeding risk in patients with blood stasis syndrome of coronary artery disease treated with clopidogrel. *J Chinese Integr Med.* 10(6):647–654.
25. Dolton MJ y McLachlan AJ. 2010 Clinical importance of the CYP2C19*17 variant allele for voriconazole. *Br J Clin Pharmacol.* 71(1):137–138.
26. Santos PCJL, Soares RAG, Santos DBG, Nascimento RM, Coelho GLLM, Nicolau JC, Mill JG, Krieger JE, Pereira AC. 2011. CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms are differently distributed according to ethnicity in the Brazilian general population. *BMC Med Genet.* 12(1):13.
27. Esperón AA, Hechavarría IVN, Navarro L. 2013. Introducción de la técnica PCR-RFLP para el diagnóstico de dos mutaciones en el gen VHL. *Medisur.* 11(3):361–367.
28. Swartz M y Krull I. 2012. *Handbook of Analytical Validation.* CRC Press, United States of America, 206 pp.
29. Bilic-Zulle L. 2011. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Medica.* 21(1):49–52.
30. Running a method comparison with the Passing and Bablok regression with XLSTAT-Life. 2014. XLSTAT. <http://www.xlstat.com/es/> (página visitada el 7 de julio del 2014).

31. Weiguang Y, Dalin L, Lidan X, Yonggang C, Shuang C, Yanhong Liu, Fengyan X, Zhenkun F, Da P, Dianjun L. 2012. Association of OX40L polymorphisms with sporadic breast cancer in northeast Chinese Han population. *PLoS One*. 7(8):e41277.
32. Sharafi H, Pouryasini A, Alavian SM, Behnava B, Keshvari M, Mehrnoush L, Salimi S, Kheradvar O. 2012. Development and Validation of a Simple, Rapid and Inexpensive PCR-RFLP Method for Genotyping of Common IL28B Polymorphisms: A Useful Pharmacogenetic Tool for Prediction of Hepatitis C Treatment Response. *Hepat Mon*. 12(3):190–195.
33. Faur N, Araud L, Laroche-Clary A, Kanno J, Toutain J, Yamori T, Robert J, Le Morvan V. 2009. The association between the T309G polymorphism of the MDM2 gene and sensitivity to anticancer drug is dependent on the p53 mutational status in cellular models. *Br J Cancer*. 101(2):350–356.

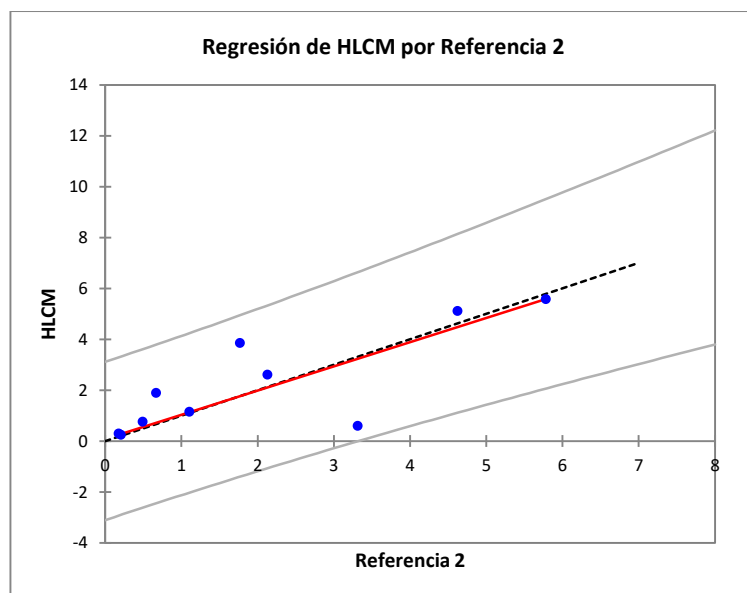
X. ANEXOS

Anexo 1: Regresión de Passing y Bablok para comparación con el método 1



En la figura se muestra la curva formada como resultado de aplicar la regresión de Passing y Bablok, entre las concentraciones plasmáticas de voriconazol cuantificadas con el método implementado (eje Y) sobre las concentraciones obtenidas por el método de comparación 1 (eje X).

Anexo 2: Regresión de Passing y Bablok para comparación con el método 2



La figura muestra la gráfica formada como resultado de aplicar la regresión de Passing y Bablok, entre las concentraciones plasmáticas de voriconazol cuantificadas con nuestro método (eje Y) sobre las concentraciones obtenidas por el método de Comparación 2 (eje X).