

# Dried Blood Spot (DBS): Desarrollo de un método válido para evaluar cinética de voriconazol "in vitro" e "in vivo"

Macarena Cuadros Núñez<sup>1,2\*</sup>, Alicia Gómez López<sup>2</sup>

**1** Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. **2** Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología (CNM); Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, 28220, Madrid, España.

## Resumen

Voriconazol (VRC) es un triazol sintético de segunda generación recomendado como agente de primera línea en el tratamiento de la aspergilosis invasora, una de las infecciones fúngicas más frecuentes en pacientes inmunodeprimidos. Dado las especiales características farmacocinéticas y su estrecho margen terapéutico los expertos recomiendan monitorizar la exposición (concentraciones plasmáticas) en el paciente de una forma sistemática. Una de las metodologías más utilizadas para el seguimiento rutinario de la exposición de un fármaco en muestras clínicas es la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). El parámetro por excelencia que mejor refleja la cantidad total de fármaco (exposición) en un organismo vivo es el Área Bajo la Curva (ABC, o AUC), y en consecuencia éste constituiría el parámetro de mayor validez para predecir respuesta terapéutica. El ABC es una función de la concentración sanguínea frente al tiempo y para su evaluación son necesarios varios tiempos de muestreo, que implicarían extracciones continuas y frecuentes en un tipo de pacientes, los que sufren enfermedades fúngicas invasivas, inestables y complicados. Como alternativa a la clásica venopunción la posibilidad de utilizar la técnica Dried Blood Spot (DBS) para la monitorización de voriconazol puede aportar interesantes ventajas y permitir evaluar la exposición en cada paciente de forma individualizada. El proyecto realizado ha permitido establecer una metodología válida para cuantificar voriconazol a partir de una gota seca procedente de una matriz de suero comercial. Además, se ha iniciado el proceso de validación "in vivo" de la técnica desarrollada utilizando un modelo experimental de invertebrado, larvas de *Galleria mellonella*, a las que se administra una dosis única de voriconazol y se evalúa el comportamiento cinético de este azol mediante la técnica convencional de monitorización de concentraciones y la técnica DBS. Los resultados obtenidos demuestran que la técnica desarrollada es válida y reproducible para estudiar la exposición a voriconazol.

**Palabras clave:** voriconazol; antifúngicos; monitorización; farmacocinética; DBS; *Galleria mellonella*.

**Cita:** Macarena Cuadros Núñez, Otros Autores, Alicia Gómez López (2015) Dried Blood Spot (DBS): Desarrollo de un método válido para evaluar cinética de voriconazol "in vitro" e "in vivo". *Dianas* 4(1): e20150905. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150905. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

**Editores:** María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

**Recibido:** 25 de junio de 2015

**Copyright:** © 2015 Macarena Cuadros Núñez et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

\*E-mail: [macunu4@hotmail.com](mailto:macunu4@hotmail.com); [aliciagl@isciii.es](mailto:aliciagl@isciii.es)



## Introducción

Las enfermedades fúngicas invasivas (EFIs) afectan a pacientes inmunodeprimidos con una tasa de mortalidad que puede llegar hasta un 90%. Se ha estimado que anualmente se producen 1,4 millones de muertes por EFIs [1]. La gravedad de estas enfermedades se traduce también en hospitalizaciones prolongadas y un aumento del coste sanitario. Una de las EFIs más importantes es la aspergilosis invasora, causada por *Aspergillus fumigatus*. Su incidencia es difícil de estimar, dado que depende de varios factores, entre ellos de la enfermedad de base del paciente. Para un manejo adecuado de esta enfermedad es imprescindible hacer un diagnóstico rápido y administrar un tratamiento antifúngico conveniente, precoz y temprano, en la dosis precisa [2].

El tratamiento de primera elección para la aspergilosis invasora, a criterio de los expertos y según las más recientes evidencias clínicas, consiste en la administración de voriconazol, (oral o IV en función de la situación clínica del paciente).

Voriconazol es un fármaco antifúngico de amplio espectro. Se trata de un triazol de segunda generación derivado de fluconazol pero con mayor liposolubilidad y espectro antifúngico. Su estructura se muestra en la figura 1.

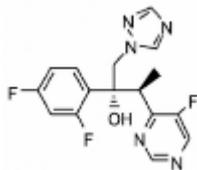


Figura 1.- Estructura química de VRC.

Se emplea para el tratamiento de *Aspergillus spp.*, *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.* y *Cryptococcus spp.*. Muestra también actividad frente cepas de *Candida spp.* resistentes a fluconazol [3] (anexo 1).

Sin embargo, voriconazol presenta un perfil farmacocinético complejo, con gran variabilidad interindividual. Por esta razón los expertos recomiendan monitorizar sistemáticamente la exposición de este azol en aquellos pacientes tratados, para evitar situaciones de sobreexposición que con frecuencia implican desarrollo de toxicidad o situaciones de subexposición más relacionadas con fracaso terapéutico y negativas consecuencias para la vida del paciente [4].

Voriconazol se metaboliza en el hígado mediante el sistema enzimático del citocromo P450. La enzima encargada del metabolismo de este fármaco es CYP2C19, y, en menor medida, CYP3A4 y CYP2C9, todas ellas enzimas encargadas de la transformación de fármacos y compuestos internos, por lo que este proceso presenta multitud de interacciones farmacológicas [5]. Su principal metabolito es voriconazol N-óxido, formado en su mayoría por CYP2C19 (anexo 2). La enzima CYP3A4, en condiciones normales, juega un papel menos importante en la metabolización de voriconazol, dando como metabolito hidroximetil voriconazol. En tercer lugar y con mucha menos participación metabólica, la isoforma CYP2C9 convierte a voriconazol en hidroxivoriconazol. La información genética que codifica cada una de estas enzimas (genotipos) es muy variable en la población dando lugar a distintos fenotipos en función de la actividad de la enzima generada. En este aspecto en la población se distinguen metabolizadores lentos, normales, rápidos y ultrarrápidos, contribuyendo a la variabilidad encontrada en el comportamiento cinético de este azol en el individuo [6].

Este metabolismo variable y condicionado hace que voriconazol presente una farmacocinética no lineal [7]. Además presenta un estrecho margen terapéutico (intervalo de concentración comprendido entre la concentración mínima eficaz y la concentración máxima tolerada). Por consenso se ha establecido que el intervalo de concentraciones plasmáticas relacionado con eficacia está comprendido entre 1 µg/mL y 5.5 µg/mL [8]. Niveles superiores a la concentración máxima tolerada (CMT) produciría toxicidad, sobre todo en el SNC, en la visión y afecciones dérmicas. Mientras que niveles subterapéuticos (inferiores a la concentración mínima eficaz (CME)) conlleva a ausencia de eficacia del tratamiento. Las causas que explican este hecho se han relacionado con aumento del aclaramiento del fármaco por una inducción enzimática debida a tratamientos concomitantes, así como a polimorfismos genéticos que se traducen en enzimas con actividad incrementada (metabolizadores ultrarrápidos). La subexposición a voriconazol también puede explicarse por falta de adherencia a la terapia establecida [9]. Los niveles alcanzados en sangre del azol depende, además de la variabilidad genética implicada en el metabolismo hepático, de factores como el sexo (C<sub>máx</sub> y ABC en hombres es mayor que en mujeres), edad (los niños tienen una actividad superior de la isoforma CYP2C19 en comparación al adulto, por lo que lo metabolizan más rápidamente [6]), peso, raza y la dieta [10]. Esto se traduce a una significativa variabilidad inter- e intraindividual, lo que dificulta establecer una dosis adecuada que se relacione con eficacia de forma general en todos los pacientes tratados. Por esta razón, la EMA (European Medicines Agency) y la FDA (Food and Drug Administration) recomiendan la monitorización individual de pacientes tratados con voriconazol, con el fin de optimizar la respuesta y reducir así efectos adversos.

En la práctica clínica, la monitorización de la exposición a voriconazol en cada paciente se realiza en el momento valle (C<sub>cv</sub>), justo antes de la siguiente administración. La muestra requerida suele ser suero o plasma de paciente, obtenido a partir de una venopunción. Es común encontrar en estas medidas concentraciones subterapéuticas de voriconazol (en el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología se detectaron en un 45% de pacientes tratados niveles subterapéuticos).

La C<sub>cv</sub> constituye una concentración que por consenso se ha definido como válida para establecer relaciones exposición-respuesta, aunque el parámetro por excelencia que refleja la cantidad total de un fármaco en un organismo vivo es el Área Bajo la Curva (ABC), y en consecuencia constituiría el parámetro de mayor validez para predecir respuesta terapéutica (figura 2). El ABC es una función de la concentración sanguínea frente al tiempo y para su evaluación son necesarios varios tiempos de muestreo, que implicarían extracciones continuas y frecuentes en un tipo de pacientes, los que sufren EFI inestables y complicados.



su vida útil, no comprometiendo ni alterando la resolución analítica. La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo-agua (pH=5,3-9,3).

#### Linealidad, reproducibilidad y exactitud del método utilizado en muestras de suero

Previamente se estableció la relación entre la concentración de voriconazol y la señal, mediada como área del pico cromatográfico obtenido aplicando el método cromatográfico descrito. Para la preparación de las soluciones estándar se utilizó un stock de concentraciones de voriconazol en DMSO, realizado a partir del polvo valorado (voriconazol, antifúngico, polvo valorado con actividad 100%, marca Pfizer), en las siguientes concentraciones: 16000µg/mL, 800µg/mL, 400µg/mL, 200µg/mL, 100µg/mL, 50µg/mL y 25µg/mL. A partir de estas se prepararon sucesivas soluciones estándar de voriconazol en suero añadiendo 1.5µL en 148.5µL de suero comercial (dilución 1/100) y concentraciones finales comprendidas entre 16 y 0.25µg/mL. Para la inyección en el sistema cromatográfico estas muestras estándar se procesaron para la precipitación de proteínas, añadiendo 150µL de acetonitrilo (ACN) congelado a -20°C (proporción 1:1). Esta mezcla se vorteoó y se centrifugó (Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Refrigerated Microcentrifuge, 24-PI Rotor; 120V), a 12000rpm, 10°C y en dos tandas de 15 minutos cada una. Una vez centrifugado se filtró el sobrenadante con ayuda de una jeringa de 1mL desechables y filtros de PTFE (teflón) de 0,45µm de tamaño de poro. La muestra depositada en viales de inyección tipo Total recovery (Waters) se introdujo en un carrusel del equipo HPLC. Tras el procesado de la muestra se relacionó la concentración nominal con el área del pico cromatográfico determinado.

#### Método DBS para la cuantificación de voriconazol en muestras de suero

Desarrollo de un método DBS para cuantificar antifúngicos: Se utilizaron las mismas soluciones estándar de voriconazol en suero (16 y 0.25µg/mL) descritas en el punto anterior. Gotas de 30µL de cada una de estas soluciones se aplicaron en tarjetas ArrayitWhatman GE Healthcare 903 Protein Saver Cards (figura 3), en la zona delimitada, y se dejaron secar a temperatura ambiente y en oscuridad a distintos tiempos (3 horas, toda la noche (O/N) y 1-2 meses), con el objeto de definir el tiempo de secado óptimo.

Una vez seca la gota, se recortó manualmente en pequeñas porciones la zona acotada con la gota seca de la tarjeta y se depositó en un ependorf de 1.5mL de capacidad. La recuperación de voriconazol se lleva a cabo con un solvente de extracción (SE) que fue una mezcla de metanol y agua, en proporciones 60:40, según indica la bibliografía [8, 14], utilizando volúmenes diferentes (200µL, 400µL y 500µL). Tras 30 minutos de espera se agitaron las muestras en vortex (10s) y posteriormente se sonicaron durante 10 minutos (baño sonicador Arpival S.A). Pasado este tiempo las muestras se agitaron de nuevo (10s) y se centrifugaron (12000 rpm, 10°C) en dos periodos de 15 minutos (Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Refrigerated Microcentrifuge, 24-PI Rotor; 120V). Una vez centrifugado, algunas muestras se inyectaron directamente (con una filtración previa) y otras se concentraron. En estas últimas, todo el sobrenadante se trasfiere un ependorf de 1.5mL limpio (en torno a 500µL) y se evapora (SpeedVac 100 H ISS-ENPROTECH POWER CONCENTRATOR HEATER CENTRIFUGE) hasta un conseguir un volumen final de 100µL (40-60 minutos). Por último, las muestras así concentradas se filtraron utilizando filtros de PTFE (teflón) de 0,45µm de tamaño de poro, jeringas desechables de 1mL y se dispusieron en viales de inyección tipo Total recovery (Waters) para su análisis cromatográfico.



Figura 3.- Tarjetas "Protein Saver 903 Card" para DBS.

#### Validación del método DBS: Ensayos cinéticos en un modelo alternativo de invertebrado (*Galleria mellonella*) [15]

Para la cuantificación de voriconazol en los ensayos cinéticos en *Galleria mellonella* se realizó una estandarización previa de soluciones estándar en hemolinfa. Se utilizaron las mismas soluciones stock en DMSO (1600-25µg/mL) y a partir de ellas se prepararon las correspondientes soluciones estándar de voriconazol en hemolinfa (16 y 0.25µg/mL) como se ha descrito en los puntos anteriores. Para la inyección en el sistema cromatográfico de estas soluciones se precipitaron proteínas, añadiendo 80µL de solución de voriconazol en hemolinfa en 160µL de ACN congelado (proporción 1:3). Esta mezcla se vorteoó y se centrifugó (Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Refrigerated Microcentrifuge, 24-PI Rotor; 120V), a 12000rpm, 10°C y en dos tandas de 15 minutos cada una. Una vez centrifugado se filtró el sobrenadante con ayuda de una jeringa de 1mL desechables y filtros de PTFE (teflón) de 0,45µm de tamaño de poro. La muestra depositada en viales de inyección tipo Total recovery (Waters) para su análisis cromatográfico.

Paralelamente a estos análisis, se cuantificó también el mismo stock de partida de voriconazol en hemolinfa por el método DBS. Se tomaron 30µL de muestra, que se dejaban secar a temperatura ambiente y en oscuridad durante toda la noche en tarjetas ArrayitWhatman GE Healthcare 903 Protein Saver Cards. Pasado este tiempo se recortó manualmente en pequeñas porciones la zona acotada con la gota seca de la tarjeta y se depositó en un ependorf de 1.5mL de capacidad y se adicionaron 500µL del solvente de extracción (mezcla metanol-agua en proporciones 60:40) y se dejaron 30 minutos de espera. A continuación se vortearon, se sonicaron 10 minutos (baño sonicador Arpival S.A), se volvieron a agitar y se centrifugaron a 12000rpm, 10°C durante dos tiempos de 15 minutos (Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Refrigerated Microcentrifuge, 24-PI Rotor; 120V). Una vez centrifugado, todo el sobrenadante se trasfiere un ependorf de 1.5mL limpio (en torno a 500µL) y se evapora (SpeedVac 100 H ISS-ENPROTECH POWER CONCENTRATOR HEATER CENTRIFUGE) hasta un volumen final de 100µL (40-60 minutos). El volumen final se resuspende y se filtra con filtros de PTFE (teflón) de 0,45µm de tamaño de poro, jeringas desechables de 1mL y en viales de inyección tipo Total recovery (Waters). Por último se procesa mediante HPLC.

Tanto por metodología clásica como por Dried Blood Spot, se realizaron al menos dos repeticiones en un mismo día y en días distintos.

El ensayo farmacocinético "in vivo" en modelo de *Galleria mellonella* propiamente dicho consistió en administrar 10µL de una solución de voriconazol preparada en agua para inyección (400mg/L) a un grupo de larvas con un peso medio de 0.4g (intervalo 0,3-0,5g). La dosis única administrada a cada larva fue 10mg/kg, equivalente a una dosis terapéutica en humanos (dosis inicial de carga, 6mg/kg cada 12 horas, seguida de una dosis de mantenimiento de 4mg/kg también cada 12 horas). Los tiempos de muestreo establecidos fueron tiempo 0 (T0), 5-10 minutos (T0,125), 15 minutos (T0,25), 30 minutos (T0,5), 1 hora (T1), 1 hora y 30 minutos (T1,5), 2 horas (T2), 3 horas (T3), 4 horas (T4), 5 horas (T5), 6 horas (T6) y 24 horas (T24). A cada tiempo se extrajo la hemolinfa de 4 larvas, se tomaron 80 µL y se procesaron como se describió anteriormente. Cada muestra de hemolinfa se procesó añadiendo ACN congelado a -20°C (160µL, 1/3 v/v). La precipitación de proteínas se lleva a cabo centrifugando (12000rpm, 10°C) en dos periodos de 15 minutos (Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 Refrigerated Microcentrifuge, 24-PI Rotor; 120V). Por último se filtra el sobrenadante (jeringas desechables y filtros de PTFE (teflón) de 0,45µm de tamaño de poro) y se inyecta el vial (viales de inyección tipo Total recovery (Waters)) para su procesamiento por HPLC. La concentración de voriconazol evaluada en cada tiempo de muestreo se utilizó para establecer el perfil farmacocinético de este compuesto en la larva utilizando el software Excel y el complemento de Excel, PK Solver.

Adicionalmente se dispusieron 30µL de cada tiempo de muestreo en la tarjeta ArrayitWhatman GE Healthcare 903 Protein Saver Cards y se procesó según el método DBS desarrollado. Se compararon los parámetros farmacocinéticos obtenidos con uno y otro método.

## Resultados

### Estandarización del tiempo de secado

En este proyecto se han determinado y establecido las mejores condiciones de extracción de voriconazol. El tiempo de secado, y en definitiva la humedad del papel, puede condicionar el proceso de extracción de voriconazol desde el papel, por lo que ha sido un parámetro a estandarizar. Tras comparar los resultados de la extracción a tiempos de secado 3h, toda la noche (O/N) y varios meses (estas muestras fueron preparadas previamente a mi incorporación con ellos) podemos observar que, a igual concentración de voriconazol, se cuantifica más con un tiempo de secado de toda la noche (O/N), obteniéndose valores medios de área de pico mayores y CV (coeficiente de variación) menores y por consiguiente, mayor señal y mejor reproducibilidad. Se demuestra que el tiempo de secado óptimo es O/N, mejorando así la extracción como se ve en la tabla 1 y anexo 5.

C.Teórica (µg/mL)	Meses			O/N			3h		
	Media áreas de pico (µV*s)	ds	CV	Medias áreas de pico (µV*s)	ds	CV	Media áreas de pico (µV*s)	Ds	CV
8	102823,29	56785,72	55,23	105068,00	4178,57	3,98	83540,50	11127,32	13,32
2	28231,67	7151,84	25,33	24799,36	3166,28	12,77	24764,83	3934,45	15,89

Tabla 1.- Resultados de las áreas de pico cromatográfico obtenidos por HPLC, con desviación estándar (ds) y coeficiente de variación (CV) de la estandarización tiempo secado.

## Estandarización del volumen de solvente de extracción y condiciones de concentración de la muestra

Este fue otro parámetro a estandarizar del método DBS. Para intentar mejorar la extracción y que la señal obtenida fuera máxima, se propusieron varios volúmenes del solvente de extracción (200 $\mu$ L, 400 $\mu$ L y 500 $\mu$ L). Se obtuvieron, a igual concentración de voriconazol (2 $\mu$ g/mL) mayores áreas de pico al concentrar la muestra 5 veces. En cuanto al volumen del SE, la señal mejora con 500 $\mu$ L. A la vista de los resultados obtenidos (figura 4) se evidencia que la extracción es máxima con 500 $\mu$ L de solvente de extracción y haciendo una concentración 5x mediante evaporación de la mezcla metanol-agua hasta un volumen final de 100 $\mu$ L.

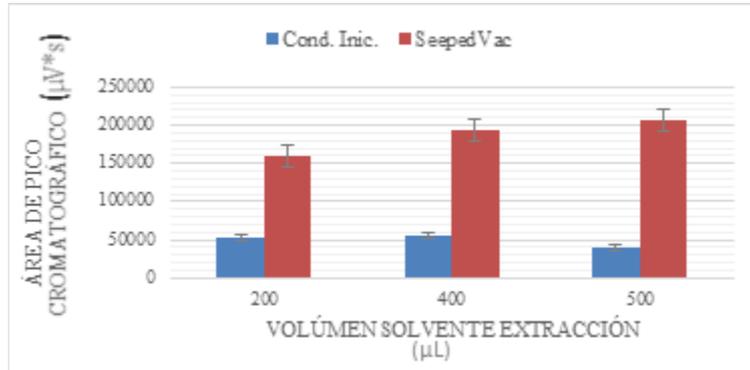


Figura 4.- Señal (áreas de pico de absorción) obtenidas en distintas condiciones de extracción y con distintos volúmenes de SE para la misma concentración de voriconazol (2 $\mu$ g/mL).

## Resultados de la validación del método final establecido

El análisis de los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se basa en la obtención del cromatograma de la muestra inyectada y el pico correspondiente a voriconazol, con un tiempo de retención ( $t_r$ ) constante y un espectro UV característico y previamente definido. Cada sustancia tiene un espectro de absorción característico. En particular, voriconazol absorbe a 255,6nm y muestra un  $t_r$  de 9,45 minutos. El pico de absorción máximo será mayor o menor en función de la cantidad deazol. Estableciendo una relación entre área de pico y concentración nominal podemos establecer una recta patrón y así analizar muestras problema. En vista a los resultados de los ensayos realizados en distintos días, de varias muestras y diferente soluciones estándar, se observa una relación lineal entre área de pico cromatográfico y concentración de voriconazol en la muestra de suero ( $y=13260x$ ,  $r^2=0.9977$  (figura 5)). El límite bajo de cuantificación se establece en 0,25. El coeficiente de variación (CV) no supera para ninguna de las muestras estándar el 15% (tabla 2). Según las guías para la estandarización de métodos bioanalíticos (FDA, EMA) el CV debe ser  $\pm 15\%$  el valor nominal establecido para que un método sea reproducible. Fijándonos en los errores relativos (ER) de las concentraciones calculadas a partir de la ecuación de la recta son igualmente menores del 15%, por lo que el método planteado y desarrollado, además de ser reproducible, es válido para la cuantificación de voriconazol.

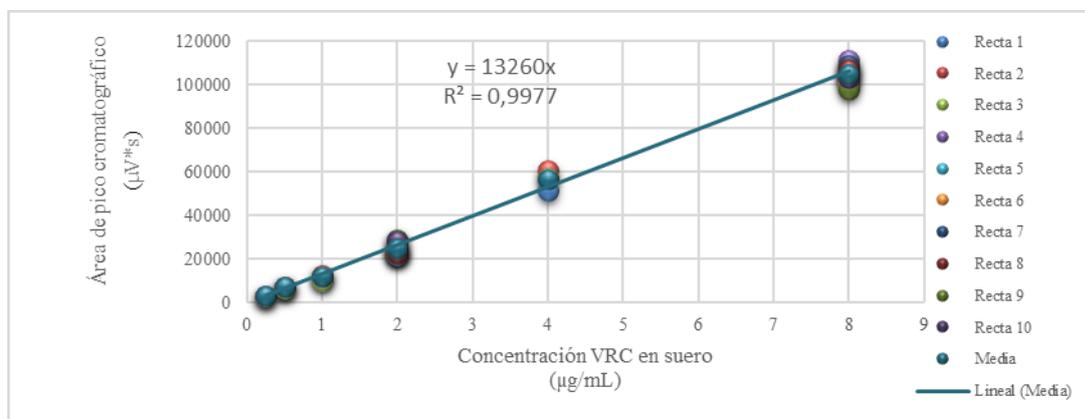


Figura 5.- Representación gráfica de la relación entre concentración nominal de voriconazol en la gota de suero y área de pico cromatográfico obtenido tras el procesado y análisis de muestras sucesivas.

C.Teórica (µg/mL)	Media C.Calculadas (µg/mL)	ER (%)	Méda áreas de pico (µV*s)	ds	CV (%)
8,00	7,92	-0,95	105068,00	4178,57	3,98
4,00	4,25	6,20	56330,33	4957,51	8,80
2,00	1,87	6,49	24799,36	3166,28	12,77
1,00	0,88	-12,14	11650,67	1235,36	10,60
0,50	0,52	3,68	6873,67	484,57	7,05
0,25	0,22	-12,47	2901,50	334,46	11,53

Tabla 2.- Resultados de la determinación y cuantificación de VRC en HPLC mediante el método DBS.

La correlación entre la cantidad de voriconazol en cada muestra estándar calculada por el método clásico (precipitación de proteínas y análisis cromatográfico) y por el método DBS (gota de suero procesada según método desarrollado y análisis cromatográfico) mostró resultados aceptables (C.Calculada mét.clásico=C.Calculada DBS x 1,1335;  $r^2=0,9977$ ), viéndose una relación lineal (figura 6) y una mejora del ER con respecto al método clásico (anexo 6). La metodología planteada de Dried Blood Spot y desarrollada parece ser una buena opción para la monitorización de voriconazol. De hecho se ha comenzado a utilizar en paralelo con el método clásico utilizado en el Servicio de Micología del Instituto de Salud Carlos III para muestras clínicas.

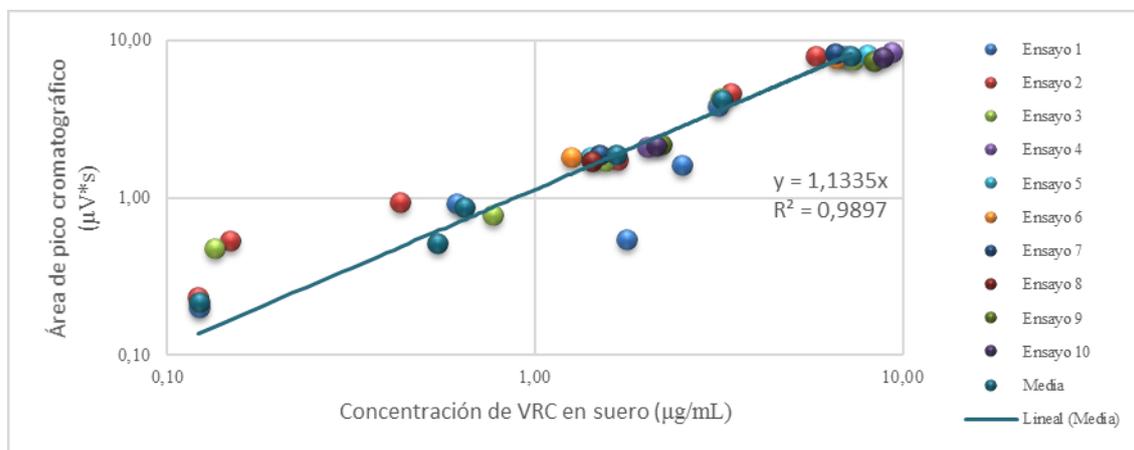


Figura 6.- Recta de correlación entre concentraciones cuantificadas mediante método clásico y las obtenidas por DBS, a escala logarítmica.

### Validación del método DBS: Ensayos cinéticos en un modelo alternativo de invertebrado (*Galleria mellonella*)

Para poder emplear *Galleria mellonella* en la validación del método DBS se necesita la estandarización de la matriz, hemolinfa, y ver si altera la extracción y la detección cromatográfica de voriconazol. Estos fueron los puntos de partida para la recta de calibrado. Se aprecia linealidad entre señal obtenida en forma de área de pico de absorción y la concentración de voriconazol en hemolinfa según aparece en la figura 7 ( $y=16299x$ ;  $r^2=0,9997$ ). Los CV y ER están por debajo del 15% (tabla 3), método reproducible y válido; y concluimos que la matriz hemolinfa no afecta ni a la extracción ni a la detección por HPLC de voriconazol.

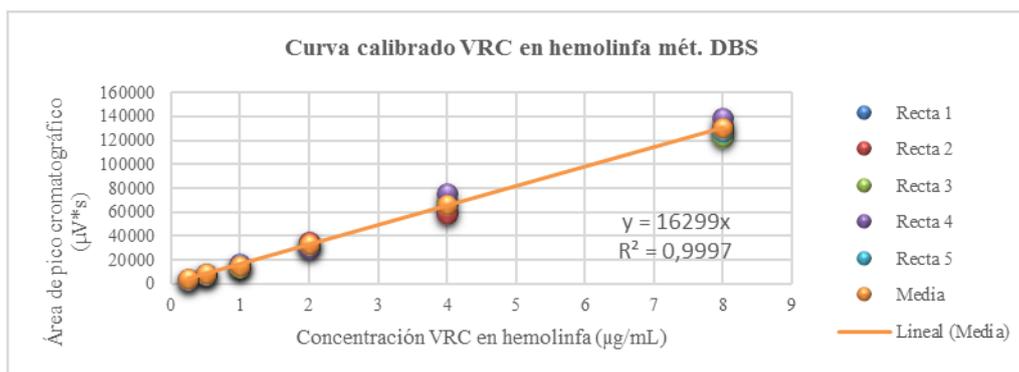


Figura 7.- Relación concentración de VRC en hemolinfa y área de pico medido por HPLC.

C.Teórica (µg/mL)	Media C.Calculadas (µg/mL)	ER (%)	Média áreas de pico (µV*s)	ds	CV (%)
8,00	8,03	0,36	130140,80	5768,90	4,43
4,00	4,04	1,12	65927,75	7903,61	11,99
2,00	2,03	1,53	33095,25	2726,05	8,24
1,00	0,90	-10,42	14600,75	1303,74	8,93
0,50	0,49	2,14	7975,33	449,58	5,64
0,25	0,22	-13,77	3513,50	548,01	15,60

Tabla 3.- Resultados de la determinación y cuantificación de VRC en hemolinfa por HPLC y mediante el método DBS.

### Farmacocinética "in vivo" en modelo de *Galleria mellonella*

Se inició el estudio de la cinética de voriconazol en larvas de *Galleria mellonella* como modelo alternativo. El estudio farmacocinético en organismos sanos consiste en evaluar la absorción, metabolismo y eliminación del fármaco estudiado, en este proyecto, voriconazol. Para ello se cuantifican las concentraciones de este azol a distintos tiempos en hemolinfa extraída (para ver cómo varían estas con el tiempo). Los parámetros farmacocinéticos importantes a analizar son la concentración máxima obtenida de voriconazol en hemolinfa y el tiempo transcurrido hasta alcanzarla ( $C_{máx}$  y  $T_{máx}$ ), el ABC y el aclaramiento. Tras los ensayos llevados a cabo, la curva de cinética en larvas es la mostrada en la figura 8. Se ve cómo hay un periodo de latencia hasta que el fármaco alcanza la dosis máxima en hemolinfa, hecho que incita a pensar en una distribución previa al paso a hemolinfa y la correspondiente absorción. Se llevó a cabo un estudio no compartimental de los resultados, obteniendo los parámetros farmacocinéticos siguientes:  $C_{máx} = 12,03\mu\text{g/ml}$ ,  $T_{máx} = 15$  minutos,  $ABC = 28,50\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$  y un aclaramiento de  $11,27(\text{mg})/(\mu\text{g/ml})/\text{h}$ . Vemos cómo se obtiene ABC similar si las muestras de las larvas las procesamos por el método DBS (tabla 4).

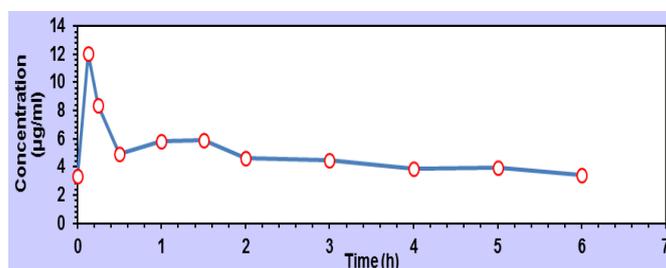


Figura 8.- Perfil farmacocinético de VRC en *Galleria mellonella*.

Parameter	Unit	Valor clásico	Valor DBS
$t_{1/2}$	H	9,10	19,88
$T_{max}$	H	0,13	1,50
$C_{max}$	µg/ml	12,03	9,58
$C_0$	µg/ml	3,32	7,23
<b>AUC 0-t</b>	<b>µg/ml*h</b>	<b>28,50</b>	<b>29,93</b>
$Cl_{obs}$	(mg)/(µg/ml)/h	11,27	3,22

Tabla 4.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos del ensayo "in vivo" por el programa PK Solver.

### Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que la técnica DBS desarrollada es válida y reproducible para estudiar la exposición a voriconazol.

La posibilidad de manejar pequeños volúmenes de muestra prevé interesantes aplicaciones de este método a estudios individualizados y modelos experimentales alternativos como el descrito en esta memoria.

*Galleria mellonella* es un modelo válido para determinar exposición de voriconazol y plantea interesantes aplicaciones en el estudio de relaciones exposición –respuesta y correlación in vitro in vivo.

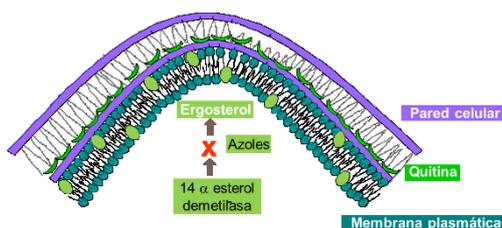
## Bibliografía

- [1]. Chen J, Yang Q, Huang J and Li L. 2013. Risk factors for invasive pulmonary aspergillosis and hospital mortality in acute-on-chronic liver failure patients: A retrospective cohort study. *Int J Med Sci.* 10(12):1625-1631.
- [2]. Arvanitis M and Mylonakis E. 2015. Diagnosis of invasive aspergillosis: recent developments and ongoing challenges. *Eur J Clin Invest.* 45(6):646-52.
- [3]. Wang T et al. 2013. Identification of factors influencing the pharmacokinetics of voriconazole and the optimization of dosage regimens based on Monte Carlo simulation in patients with invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 69(2): 463-470.
- [4]. Geist MJ1, Egerer G, Burhenne J, Riedel KD, Weiss J and Mikus G. 2013. Steady-state pharmacokinetics and metabolism of voriconazole in patients. *J Antimicrob Chemother.* 68(11):2592-9
- [5]. Norie Murayama, Naoko Imai, Takahisa Nakane, Makiko Shimizu and Hiroshi Yamazaki. 2007. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agente, in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology.* 73(12): 2020-2026.
- [6]. Souzan B. Yanni, Pieter P. Annaert, Patrick Augustijns, Joseph G. Ibrahim, Daniel K. Benjamin Jr. and Dhiren R. Thakker. 2009. 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.
- [7]. Ashbee HR1, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R and Hope WW. 2014. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother.* 69(5):1162-76.
- [8]. Kim C. M. van der Elst et al. 2013. Dried Blood Spot analysis suitable for therapeutic drug monitoring of voriconazol, fluconazole and posaconazole. *Antimicrob Agents and Chemother.* 57(10):4999-5004
- [9]. Arwa Hassan et al. 2011. Modulators of very low voriconazole concentrations in routine therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 33(1):86-93.
- [10]. Alicia Gómez-López et al. 2012. Voriconazole serum levels measured by high-performance liquid chromatography: a monocentric study in treated patients. *Medical Mycology.* 50(4): 439–445
- [11]. Sylvain Lehmann, Constance Delaby, Jérôme Vialaret, Jacques Ducos and Christophe Hirtz. 2013. Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry. *Clin Chem Lab Med* 51(10): 1897-1909.
- [12]. Abhisheak Sharma, Swati Jaiswal, Mahendra Shuklaa and Jawahar Lala. 2014. Dried blood spots: Concepts, present status, and future perspectives in bioanalysis. *Drug testing and analysis.* 6(5): 399-414.
- [13]. Emilio Cendejas-Bueno, Juan L. Rodríguez-Tudela, Manuel Cuenca-Estrella, Alicia Gómez-López. 2012. Development and validation of a fast HPLC/photodiode array detection method for the measurement of voriconazole in human serum samples. A reference laboratory experience. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(1):23–28
- [14]. Todime M. Reddy, Cristina I. Tama and Roger N. Hayes. A dried blood spots technique based LC–MS/MS method for the analysis of posaconazole in human whole blood samples. 2011. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 879(30): 3626-3638.
- [15]. Athanasios Desalermos, Beth Burgwyn Fuchs and Eleftherios Mylonakis. 2012. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathogens.* 8(2). Published online (URL [www.plospathogens.org](http://www.plospathogens.org)). Doi: 10.1371/journal.ppat.e1002451.
- [16]. Lipner SR and Scher RK. 2015. Efinaconazole in the treatment of onychomycosis. *Infect Drug Resist.* 8: 163-172. Plublished online. Doi: 10.2147/IDR.S69596.

## Material suplementario

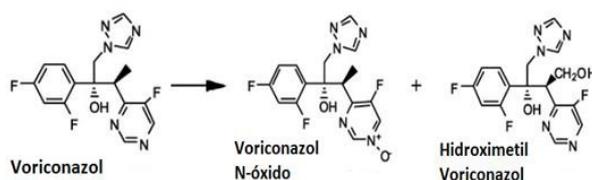
### Anexo 1

El mecanismo de acción antifúngica de voriconazol, por un lado, consiste en una inhibición competitiva de la enzima 14 $\alpha$ -esterol demetilasa, encargada de la síntesis de ergosterol a partir de lanosterol. El ergosterol forma parte de la membrana celular del hongo (anexo 1). A consecuencia, se produce una acumulación de esteroides en el interior de la célula, lo que altera la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas y, a su vez, compromete el ambiente celular necesario para el desarrollo y la división celular [16]. Por otro lado, también los azoles actúan a nivel de la biosíntesis de triglicéridos, fosfolípido y peróxido de hidrógeno, alterando los mecanismos enzimáticos intracelulares y ocasionando alteraciones en las organelas intracelulares de los hongos.



### Anexo 2

Voriconazol es metabolizado en el organismo en sus dos metabolitos principales: voriconazol N-óxido e hidroximetil voriconazol.



### Anexo 3

Esquema características gradiente en el método GRADNox\_VRC y TODOS\_311, método cromatográfico en gradiente por etapas para la determinación y cuantificación de azoles mediante técnica HPLC desarrollado en el Servicio de Micología del Centra Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

	Time	Flow	%A	%B	%C	%D	Curve
1	0,01	1	10	90	0	0	6
2	4	1	30	70	0	0	6
3	4,5	1	50	50	0	0	6
4	8	1	50	50	0	0	6
5	8,5	1	70	30	0	0	6
6	9	1	80	20	0	0	6
7	13	1	80	20	0	0	6
8	16	1	10	90	0	0	6

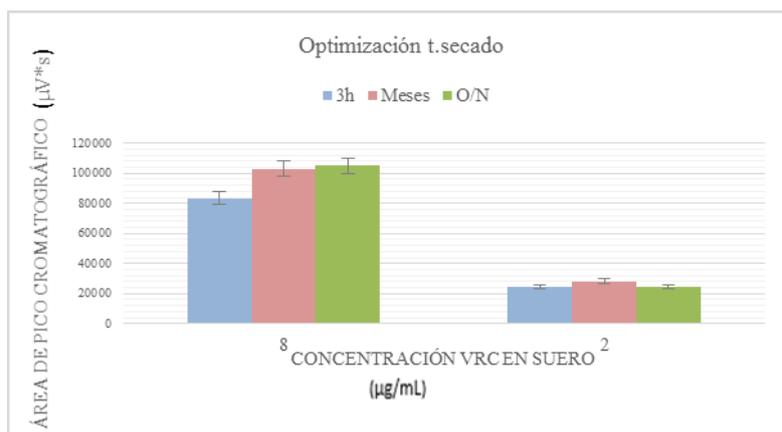
Anexo 4

Equipo de separación cromatográfica con detección ultravioleta (HPLC-UV) marca Alliance Waters 2695 (A) y columna de tipo fase reversa modelo SunFire™ C18 (Waters) y precolumna SunFire™ C18 (Waters) (B).



Anexo 5

Representación gráfica de los resultados obtenidos en la estandarización del tiempo de secado del método DBS.



Anexo 6

Resultados de concentraciones calculadas y sus ER de voriconazol obtenidos por el método clásico versus metodología DBS.

C.Teórica (µg/mL)	Media C.Calculadas mét clásico (µg/mL)	ER	Média C.Calculadas DBS (µg/mL)	ER
8	7,23	-9,67	7,92	-0,95
4	3,23	-19,36	4,25	6,20
2	1,67	-16,71	1,87	-6,49
1	0,64	-35,74	0,88	-12,14
0,50	0,54	8,78	0,52	3,68
0,25	0,12	-51,25	0,22	-12,47