

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Medicina individualizada y de
precisión en el laboratorio clínico
mediante el uso de la cromatografía
líquida y la espectrometría de masas
como herramientas de análisis

Yolanda Villena Ortiz



Título de la tesis doctoral presentada en este documento:

Medicina individualizada y de precisión en el laboratorio clínico mediante el uso de la cromatografía líquida y la espectrometría de masas como herramientas de análisis

de

Yolanda Villena Ortiz

Directores:

Dr. Joan López Hellín

Dr. Francisco Rodríguez Frías

Tutora:

Dra. Maria Assumpció Bosch Merino

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina, 2020–2024 (RD 99/2011)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universitat Autònoma de Barcelona

Agradecimientos

Al consejo de expertas, Andrea, Clara, Pablo y Laura, que me dieron el apoyo y el empuje que necesitaba para acabar.

A Jaume, que me ha dado las ideas y me ha ayudado además a llevarlas a cabo, y por supuesto gracias por enseñarme tantas cosas.

Al grupo de datos, que me han acompañado durante todos estos años y sin los cuales este trabajo no habría sido posible.

Muchas gracias a mis compañeras del día a día Eva, Maribel, Vicky, Carmen, Mari, Mireia, Josselyn y Chantal, que en estos años han colaborado conmigo activamente y me han ayudado muchísimo.

A los resis que han pasado por mi unidad y me han ayudado a diseñar y realizar las validaciones. Gracias Lui, Reichi, Alba, Dani, Laura, Clara, Gonzalo, Sarai y Lydia.

A Laura, mi compañera y amiga, que además de ayudarme muchísimo y revisar los artículos concienzudamente, me ha animado siempre.

A Joan y Paco, que me impulsaron a empezar, me impulsaron a terminar, y nunca dudaron de que llegaría hasta aquí.

A mi familia, y en especial a mi madre, que al final ha conseguido que sea “doctora”.

A mis amigas Marta, Eli, Dani, Lui, Noe, Laura, Marta, Teresa, gracias por acompañarme en este camino.

A Sergi, que siempre, siempre, me apoyó.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sumario	7
Abreviaturas	15
Introducción.....	18
A. Medicina individualizada/personalizada	18
B. Retos para el laboratorio clínico.....	19
C. Utilidad de la cromatografía y la espectrometría de masas en el laboratorio clínico	20
C.1. Detector de absorción UV/VIS	24
C.2. Detector de fluorescencia	25
C.3. Detección por espectrometría de masas.....	26
a. Ionización.....	26
b. Separación de iones.....	27
c. Detección	29
D. Desarrollo de métodos vs. kits comerciales	29
E. Medicina individualizada a través de la monitorización de fármacos y vitaminas para ajuste de dosis y optimización en la suplementación	32
F. Nutrición de precisión, personalizada, o estratificada.....	34
G. Ajuste de dosis del fármaco antineoplásico busulfán.....	36
H. Monitorización de antivirales.....	40
H.1. Tratamientos tradicionales del CMV.....	40
H.2. Nuevas estrategias terapéuticas	44
I. Suplementación de vitaminas hidro y liposolubles	46
I.1. Vitaminas liposolubles A y E	48
I.2. Vitaminas hidrosolubles B1 y B6	49
I.3. Teoría de los valores de referencia	52
Hipótesis	56
Objetivo general	57
Objetivos concretos	57
Métodos y resultados.....	59

1.	Ajuste de dosificación del fármaco antineoplásico busulfán	60
1.1.	Validación analítica de un método por LC-MS/MS para la cuantificación exacta y precisa del fármaco busulfán.....	60
1.1.1.	Materiales y métodos	60
1.1.1.1.	Desarrollo del método	60
1.1.1.2.	Validación analítica del método	61
1.1.2.	Resultados	64
1.2.	Ajuste de dosis del fármaco busulfán utilizado en regímenes de acondicionamiento en pacientes pediátricos receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos	68
1.2.1.	Materiales y métodos	68
1.2.2.	Resultados	69
1.2.2.1.	Validación clínica prospectiva	69
1.2.2.2.	Estudio observacional retrospectivo diciembre de 2020 – mayo de 2023.....	70
2.	Monitorización de antivirales utilizados en pacientes trasplantados como profilaxis frente al citomegalovirus	74
2.1.	Desarrollo y validación de un método por LC-MS/MS para la medida de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir.....	74
2.1.1.	Materiales y métodos	74
2.1.1.1.	Desarrollo del método	74
2.1.1.2.	Validación analítica del método	76
2.1.2.	Resultados	79
2.2.	Utilidad clínica de la medida de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir en el paciente adulto trasplantado	84
2.2.1.	Materiales y métodos	84
2.2.2.	Resultados	85
2.2.2.1.	Hallazgos casuales en pacientes tratados con letermovir: interacción farmacológica y toxicidad hepática.....	87
3.	Optimización de la suplementación vitamínica en población adulta mediante la medida de las vitaminas A, E, B1 y B6	89
3.1	Materiales.....	89

3.2 Métodos.....	90
3.2.1. Análisis por cromatografía líquida.....	90
3.2.2. Sujetos.....	91
3.2.3. Pruebas estadísticas.....	92
3.3. Resultados.....	95
3.3.1. Verificación analítica del método.....	95
3.3.2. Cálculo de valores de referencia para vitaminas y parámetros relacionados.....	95
3.3.3. Aplicación clínica de los intervalos de referencia.....	102
Discusiones.....	103
Capítulo 1.....	103
Capítulo 2.....	106
Capítulo 3.....	109
Discusión global.....	113
Conclusiones.....	115
Bibliografía.....	116
ANEXO I. CUESTIONARIO.....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de procesos de la medicina de precisión.....	20
Figura 2. Representación gráfica de la separación cromatográfica en fase reversa.....	22
Figura 3. Representación esquemática de un cromatógrafo líquido.....	23
Figura 4. Representación esquemática de un detector UV/VIS.....	24
Figura 5. Fenómeno de fluorescencia.....	25
Figura 6. Representación esquemática la fuente de ionización electrospray.....	27
Figura 7. Representación gráfica de un cuadrupolo.....	28
Figura 8. Cuadrupolo y celda de colisión del espectrómetro de masas LCMS-8050 de Shimadzu.....	28
Figura 9. Representación de un detector multiplicador de electrones.....	29
Figura 10. Ejemplos de kits comerciales.....	30
Figura 11. Factores que influyen en la farmacocinética de un fármaco.....	33
Figura 12. Representación esquemática de los principales factores en la nutrición de precisión....	35
Figura 13. Estructura del fármaco busulfán.....	36
Figura 14. Diagrama que ilustra la distribución, el metabolismo y la eliminación del busulfán intravenoso.....	38
Figura 15. Nomograma de dosificación de busulfán ajustado por peso del paciente.....	39
Figura 16. Estructura del ganciclovir.....	40
Figura 17. Mecanismo antiviral del ganciclovir.....	41
Figura 18. Estructura del aciclovir.....	42
Figura 19. Estructura del letermovir.....	44
Figura 20. Empaquetamiento del complejo terminasa del citomegalovirus y mecanismo de acción del letermovir.....	45
Figura 21. Terapia nutricional en diferentes grupos de pacientes complejos.....	47
Figura 22. Resumen de las funciones de las vitaminas A y E.....	49
Figura 23. Mecanismo de acción de la vitamina B6.....	50
Figura 24. Mecanismo de acción de la vitamina B1.....	51
Figura 25. Absorción, transporte, metabolismo y excreción de la vitamina E.....	52
Figura 26. Representación de los valores de referencia y los IC 90% en una distribución normal.....	54
Figura 27. Interferogramas de hemoglobina, lipemia y bilirrubina a una concentración de busulfán de 1,5 mg/L.....	65
Figura 28. Estabilidad del busulfán a dos concentraciones.....	67
Figura 29. Representación del tratamiento con busulfán previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos en un paciente pediátrico real.....	69

Figura 30. Representación de las AUC medidas en pacientes pediátricos, según la dosis inicial ...	70
Figura 31. Regímenes de acondicionamiento administrados en los pacientes de estudio.....	72
Figura 32. Ajuste de dosis de busulfán (%) para alcanzar el AUC acumulado objetivo en una cohorte de pacientes pediátricos.....	72
Figura 33. Evolución de las áreas bajo la curva de busulfán medidas durante los días de tratamiento en cuatro pacientes pediátricos.....	73
Figura 34. Gradiente cromatográfico del método analítico para la medida de antivirales	75
Figura 35A. Cromatograma del ganciclovir.....	79
Figura 35B. Cromatograma del aciclovir.....	79
Figura 35C. Cromatograma del letermovir	80
Figura 36. Rectas de regresión lineal en las que se representan los valores obtenidos en diferentes curvas de calibración frente a los valores teóricos para ganciclovir, aciclovir y letermovir.....	81
Figura 37. Representación de los resultados de recuperación y efecto matriz para los antivirales..	83
Figura 38. Interferogramas de hemoglobina y lipemia a cuatro concentraciones de ganciclovir y aciclovir, y a tres concentraciones de letermovir	82
Figura 39. Mediciones individuales de los resultados de ganciclovir, aciclovir y letermovir	87
Figura 40. Mediana e intervalo intercuartílico de las mediciones de aciclovir y letermovir en seis pacientes adultos con medidas seriadas incluidos en el estudio.....	87
Figura 41. Caso clínico: evolución de las concentraciones séricas de letermovir y las enzimas hepáticas AST y ALT.....	88
Figura 42. Flujo de trabajo para el cálculo de valores de referencia por metodología directa.....	93
Figura 43. Gráficos cuantil-cuantil para tiamina pirofosfato y cociente alfa-tocoferol/colesterol...	98
Figura 44. Distribución de los datos por sexo para todas las vitaminas y cocientes.....	99
Figura 45. Distribución de los datos por edad para todas las vitaminas y cocientes.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Configuración del detector de espectrometría de masas para el busulfán y su estándar interno, el [² H ₈]-busulfán	64
Tabla 2. Resultados de imprecisión inter e intraserial, así como sesgo para diferentes concentraciones de busulfán	64
Tabla 3. Resultados del estudio de la matriz. Todos los resultados se expresan como desviación porcentual normalizada de la matriz	66
Tabla 4. Resumen de las indicaciones de trasplante hematopoyético, con referencia al tipo de trasplante (autólogo o alogénico), fármacos antineoplásicos administrados y exposición objetivo de busulfán	71
Tabla 5. Parámetros optimizados del espectrómetro de masas para los tres fármacos antivirales y sus estándares internos	75
Tabla 6. Resultados de los estudios de precisión y exactitud, así como el error analítico total	81
Tabla 7. Características demográficas y pruebas de laboratorio rutinarias de los pacientes tratados con ganciclovir, aciclovir y letermovir	85
Tabla 8. Especificaciones de calidad para las vitaminas A, E, B1 y B6 según variabilidad biológica	90
Tabla 9. Resultados de error aleatorio, error sistemático y error total para las cuatro vitaminas estudiadas	95
Tabla 10. Estadística descriptiva y comparativa de pruebas de laboratorio entre voluntarias y voluntarios	96
Tabla 11. Resumen de los valores atípicos detectados, estratificados por sexo y rangos de edad. ..	97
Tabla 12. Intervalos de referencia actualmente informados e intervalos de referencia calculados para vitaminas y cocientes	101
Tabla 13. Porcentaje de resultados patológicos en una cohorte independiente de pacientes	102

SUMARIO

La medicina personalizada, también medicina individualizada o de precisión, se entiende como el estudio de los fenotipos y genotipos de los individuos con el objetivo de seleccionar una estrategia terapéutica dirigida. También engloba ramas relacionadas con la salud del paciente como la nutrición. La nutrición de precisión se puede definir como el uso de la información sobre características individuales para maximizar los beneficios y reducir los efectos adversos de los cambios dietéticos en pacientes con enfermedades específicas o necesidades nutricionales especiales. Estos conceptos se erigen como herramientas a explotar por el profesional sanitario en beneficio del paciente, que se presenta como un individuo caracterizado por una biología, genética, entorno e idiosincrasia únicas y diferentes a los demás individuos y como tal se les debe tratar de forma individualizada y no generalizada por patología o demografía.

En este proyecto se han desarrollado tres aplicaciones de la medicina personalizada empleando como herramientas la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en el laboratorio clínico. Se han utilizado por su versatilidad y su capacidad para cuantificar amplios intervalos de medida, así como la sencillez en la preparación de la muestra y el elevado rendimiento analítico. Se han desarrollado y validado dos métodos *in-house* para la detección y cuantificación del antineoplásico busulfán y de los tres antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir. En cambio, se han utilizado kits comerciales de reactivos para la medición de las vitaminas A, E, B1 y B6. Estas aplicaciones se han seleccionado en función de las necesidades clínicas en nuestro hospital y tienen un beneficio directo para el paciente. La monitorización de fármacos y vitaminas (TDM) permite conocer la concentración del fármaco/vitamina y poder corregirla en caso de ser necesario, a través del ajuste de dosis del fármaco o suplementación vitamínica. Concentraciones supratrapéuticas se relacionan con toxicidad, mientras que concentraciones infratrapéuticas pueden conducir a eventos adversos graves.

Los objetivos de este proyecto son 1) validar un método analítico sencillo, rápido y coste-efectivo para la cuantificación de busulfán en plasma por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), y validar el método clínicamente en pacientes pediátricos tratados con busulfán como acondicionamiento previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos, 2) desarrollar y validar un método por LC-MS/MS para cuantificar en suero los fármacos antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir; así como medir la concentración sérica del fármaco en tres cohortes de pacientes trasplantados adultos a los que se administró el antiviral profilácticamente de forma oral, y 3) evaluar las características metrológicas de las vitaminas A, B1, B6 y E; y establecer valores de referencia para las vitaminas y parámetros relacionados en población adulta mediante

cromatografía líquida por métodos directos para establecer unos límites de decisión correctos y ajustados a nuestra población que permitan evaluar de forma óptima el estado “micronutricional” del paciente.

Se siguieron diferentes guías para el desarrollo y validación de métodos bioanalíticos, para el reclutamiento de voluntarios y cálculo de valores de referencia, y para la evaluación de prestaciones analíticas de las sociedades española (SEQC), europea (EMA), americana (FDA) e internacional (CLSI).

Los resultados obtenidos mostraron unas características metrológicas adecuadas para todos los métodos evaluados en cuanto a sensibilidad, linealidad, reproducibilidad, repetibilidad o exactitud, cumpliendo las especificaciones de calidad de nuestro laboratorio. No se observaron interferencias ni efecto matriz relativo. La monitorización de busulfán supuso ajustes de dosis en el 90% de los pacientes estudiados, de hasta $-51,5\%$ y $+75,5\%$, justificando la monitorización de busulfán de forma personalizada en dichos pacientes. La monitorización se relacionó además con elevadas tasas de supervivencia global y de supervivencia libre de eventos adversos. La monitorización de antivirales expuso concentraciones en sangre de los pacientes en profilaxis de $0,28$ mg/L para aciclovir, de $0,20$ mg/L para ganciclovir y de $0,29$ mg/L para letermovir. Todas las concentraciones de los pacientes se encontraron dentro del intervalo de medida, y únicamente un paciente tratado con letermovir presentó una carga viral de CMV ≥ 500 UI/ml, de 2.026 UI/ml. Se observó una elevada variabilidad intraindividual y un caso clínico de interacción farmacológica para el letermovir, que unido a su reconocido comportamiento inductor de enzimas y transportadores, conduce a aumentar la vigilancia en determinados pacientes, especialmente pacientes con polimorbilidades. En el caso de las vitaminas, se obtuvieron nuevos y actualizados puntos de decisión en forma de valores de referencia que difirieron significativamente de los informados en nuestro laboratorio: $1,1-2,8$ $\mu\text{mol/L}$ y $18,9-42,2$ $\mu\text{mol/L}$ para las vitaminas A y E, $85,9-181,6$ nmol/L y $57,0-165,7$ nmol/L para las vitaminas B1 y B6; y cocientes relacionados de $246,2-561,1$ ng/g para la vitamina B1 corregida por hemoglobina; $5,2-8,9$ $\mu\text{mol/mmol}$ y $4,5-7,4$ $\mu\text{mol/mmol}$ para la vitamina E corregida por colesterol y lípidos totales, respectivamente. Estos condujeron a cambios significativos en el porcentaje de resultados patológicos y, por lo tanto, en el porcentaje de pacientes que se han de seguir y suplementar.

El desarrollo de estas aplicaciones y su implantación en el laboratorio clínico supondrá un aumento en la seguridad del paciente y la eficacia del tratamiento. Su utilidad es selectiva, es decir, la necesidad de monitorizar estos fármacos y vitaminas es específica para algunos pacientes. Las terapias guiadas por monitorización son especialmente prometedoras para los pacientes vulnerables

o con características atípicas que afecten a la absorción, distribución, metabolismo o excreción del fármaco o vitamina. La administración personalizada de fármacos y el ajuste personalizado en la suplementación de vitaminas son prometedores pasos hacia la medicina de precisión, que tiene en cuenta la variabilidad de los genes, y las diferencias en el entorno y el estilo de vida de cada individuo.

SUMARI

La medicina personalitzada, també medicina individualitzada o de precisió, s'entén com l'estudi dels fenotips i els genotips dels individus amb l'objectiu de seleccionar una estratègia terapèutica dirigida. El concepte de medicina personalitzada engloba branques relacionades amb la salut del pacient com la nutrició. La nutrició de precisió es pot definir com l'ús de la informació sobre les característiques individuals per maximitzar els beneficis i reduir els efectes adversos dels canvis dietètics en pacients amb malalties específiques o necessitats nutricionals especials. Aquests conceptes s'erigeixen com a eines a explotar pel professional sanitari en benefici del pacient, que es presenta com un individu caracteritzat per una biologia, genètica, entorn i idiosincràsia úniques i diferents dels altres individus i com a tal se'ls ha de tractar de manera individualitzada i no generalitzada per patologia o demografia.

En aquest projecte s'han desenvolupat tres aplicacions de la medicina personalitzada emprant com a eines la cromatografia líquida i l'espectrometria de masses al laboratori clínic. S'han utilitzat per la seva versatilitat i capacitat per quantificar amplis intervals de mesura, així com la senzillesa en la preparació de la mostra i l'elevat rendiment analític. S'han desenvolupat i validat dos mètodes in-house per a la detecció i quantificació de l'antineoplàsic busulfan i dels tres antivirals ganciclovir, aciclovir i letermovir. En canvi, s'ha fet servir kits comercials de reactius per al mesurament de vitamines A, E, B1 i B6. Aquestes aplicacions incloses s'han seleccionat en funció de les necessitats clíniques al nostre hospital i tenen un benefici directe per al pacient. La monitorització de fàrmacs i vitamines (TDM) permet conèixer la concentració del fàrmac/vitamina i poder corregir-la en cas que sigui necessari, a través de l'ajust de dosi del fàrmac o suplementació vitamínica. Concentracions supraterapèutiques es relacionen amb toxicitat, i concentracions infraterapèutiques, poden conduir a esdeveniments adversos greus.

Els objectius d'aquest projecte són 1) validar un mètode analític senzill, ràpid i cost-efectiu per a la quantificació de busulfan en plasma per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS), i validar el mètode clínicament en pacients pediàtrics tractats amb busulfan com a condicionament previ al trasplantament de progenitors hematopoètics, 2) desenvolupar i validar un mètode per LC-MS/MS per quantificar en sèrum els fàrmacs antivirals ganciclovir, aciclovir i letermovir; així com mesurar la concentració sèrica del fàrmac en tres cohorts de pacients trasplantats adults als quals es va administrar l'antiviral profilàcticament de forma oral, i 3) avaluar les característiques metrològiques de les vitamines A, B1, B6 i E; i establir valors de referència per a les vitamines i paràmetres relacionats en població adulta mitjançant cromatografia líquida per

mètodes directes per establir uns límits de decisió correctes i ajustats a la nostra població que permetin avaluar de forma òptima l'estat "micronutricional" del pacient.

Es van seguir diferents guies per al desenvolupament i validació de mètodes bioanalítics, per al reclutament de voluntaris i càlcul de valors de referència, i per a l'avaluació de prestacions analítiques de les societats espanyola (SEQC), europea (EMA), americana (FDA) i internacional (CLSI).

Els resultats obtinguts van mostrar unes característiques metrològiques adequades per a tots els mètodes avaluats quant a sensibilitat, linealitat, reproductibilitat, repetibilitat o exactitud, complint les especificacions de qualitat del nostre laboratori. No es van observar interferències ni efecte matriu relatiu. La monitorització de busulfan va suposar ajustaments de dosi en el 90% dels pacients estudiats, de fins a un -51,5% o un +75,5%, justificant la monitorització de busulfan de forma personalitzada en aquests pacients. La monitorització es va relacionar, a més, amb elevades taxes de supervivència global i de supervivència lliure d'esdeveniments adversos. La monitorització d'antivirals va exposar concentracions en sang dels pacients en profilaxi de 0,28 mg/L per aciclovir, de 0,20 mg/L per a ganciclovir i de 0,29 mg/L per a letermovir. Totes les concentracions dels pacients es van trobar dins de l'interval de mesura, i només un pacient tractat amb letermovir va presentar una càrrega viral de CMV ≥ 500 UI/ml, de 2.026 UI/ml. Es va observar una elevada variabilitat intraindividual i un cas clínic d'interacció farmacològica per al letermovir, que unit al seu comportament inductor reconegut d'enzims i transportadors, condueix a augmentar la vigilància en determinats pacients, especialment pacients amb polimorbilitats. En el cas de les vitamines, es van obtenir nous i actualitzats punts de decisió en forma de valors de referència que van diferir significativament dels informats al nostre laboratori: 1,1–2,8 $\mu\text{mol/L}$ i 18,9–42,2 $\mu\text{mol/L}$ per a les vitamines A i E, 85,9–181,6 nmol/L i 57,0–165,7 nmol/L per a les vitamines B1 i B6; i quocients relacionats de 246,2–561,1 ng/g per a la vitamina B1 corregida per hemoglobina; 5,2–8,9 $\mu\text{mol/mmol}$ i 4,5–7,4 $\mu\text{mol/mmol}$ per a la vitamina E corregida per colesterol i lípids totals, respectivament. Aquests van conduir a canvis significatius en el percentatge de resultats patològics i, per tant, en el percentatge de pacients que cal seguir i suplementar.

El desenvolupament d'aquestes aplicacions i la implantació al laboratori clínic suposarà un augment de la seguretat del pacient i de l'eficàcia del tractament. La seva utilitat és selectiva, és a dir, la necessitat de monitoritzar aquests fàrmacs i vitamines és específica per a alguns pacients. Les teràpies guiades per monitorització són especialment prometedores per als pacients vulnerables o amb característiques atípiques que afectin l'absorció, la distribució, el metabolisme o l'excreció del fàrmac o vitamina. L'administració personalitzada de fàrmacs i l'ajust personalitzat a la suplementació de

vitamines són prometedors passos cap a la medicina de precisió, que té en compte la variabilitat dels gens, l'entorn i l'estil de vida de cada individu.

SUMMARY

Personalised medicine, also known as individualised or precision medicine, is the study of the phenotypes and genotypes of individuals with the aim of selecting a targeted therapeutic strategy. The concept of personalised medicine encompasses areas of patient health such as nutrition. Precision nutrition can be defined as the use of information about individual characteristics to maximise the benefits and reduce the adverse effects of dietary changes in patients with specific diseases or special nutritional needs. These concepts stand as tools to be used by the healthcare professional for the benefit of the patient, who is presented as an individual with a unique biology, genetics, environment and idiosyncrasies that are different from other individuals and as such should be treated on an individual basis rather than generalised by pathology or demographics.

This project has developed three personalised medicine applications using liquid chromatography and mass spectrometry as tools in the clinical laboratory. They were used because of their versatility and ability to quantify over wide ranges, as well as their ease of sample preparation and high analytical performance. Two in-house methods were developed and validated for the detection and quantification of the antineoplastic drug busulfan and the three antivirals ganciclovir, acyclovir and letermovir. In contrast, two commercial reagent kits were used for the measurement of vitamins A, E, B1 and B6. These included applications were selected based on the clinical needs of our hospital and are of direct benefit to the patient. Therapeutic drug monitoring (TDM) enables the concentration of the drug or vitamin in question to be determined and, if necessary, corrected through adjustments to the dosage or the introduction of supplementary vitamins. Supra-therapeutic concentrations are associated with significant toxicity, while sub-therapeutic concentrations can result in serious adverse events.

The objectives of this project are 1) to validate a simple, rapid and cost-effective analytical method for the quantification of busulfan in plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), and to validate the method clinically in paediatric patients who are being treated with busulfan as a conditioning agent prior to haematopoietic stem cell transplantation, 2) to develop and validate a method by LC-MS/MS to quantify in serum the antiviral drugs ganciclovir, acyclovir and letermovir; as well as to measure the serum concentration of the drug in three cohorts of adult transplant patients to whom the antiviral was administered prophylactically orally, and 3) to evaluate the metrological characteristics of vitamins A, B1, B6 and E; and to establish reference values for the vitamins and related parameters in the adult population using liquid chromatography by direct methods. This will facilitate the establishment of accurate decision limits, which will be

tailored to our population, thus enabling the most effective assessment of the patient's 'micro-nutritional' status.

The development and validation of bioanalytical methods, the recruitment of volunteers and the calculation of reference values, and the evaluation of analytical performance were conducted in accordance with the guidelines set forth by the Spanish (SEQC), European (EMA), American (FDA) and international (CLSI) societies.

The results demonstrated that all the evaluated methods exhibited satisfactory metrological characteristics, including sensitivity, linearity, reproducibility, repeatability, and accuracy. These findings are in accordance with the quality specifications of our laboratory. No interference or relative matrix effects were observed. The monitoring of busulfan resulted in dose adjustments in 90% of the patients studied, with adjustments reaching -51.5% or $+75.5\%$, justifying personalised TDM of busulfan in these patients. TDM was also associated with high overall and event-free survival rates. Antiviral monitoring revealed serum concentrations of 0.28 mg/L for acyclovir, 0.20 mg/L for ganciclovir and 0.29 mg/L for letermovir in prophylaxis patients. All patient concentrations were within the measurement range and only one patient treated with letermovir had a CMV viral load ≥ 500 IU/mL, at 2,026 IU/mL. High intra-individual variability and one clinical case of drug-drug interaction have been observed with letermovir, which, together with its known enzyme and transporter-inducing behaviour, leads to increased vigilance in certain patients, especially those with polymorbidities. We obtained reliable and updated reference values: 1.1–2.8 $\mu\text{mol/L}$ and 18.9–42.2 $\mu\text{mol/L}$ for vitamins A and E, 85.9–181.6 nmol/L and 57.0–165.7 nmol/L for vitamins B1 and B6; and related ratios of 246.2–561.1 ng/g for vitamin B1 corrected by haemoglobin; 5.2–8.9 $\mu\text{mol/mmol}$ and 4.5–7.4 $\mu\text{mol/mmol}$ for vitamin E corrected by cholesterol and total lipids, respectively. These reference values significantly differ from those provided by the reagent manufacturer currently in use. These led to significant changes in the percentage of pathological results and therefore in the percentage of patients to be followed up and supplemented.

The development of these applications and their implementation in the clinical laboratory will enhance patient safety and treatment efficacy. The utility of these applications is selective, in that the monitoring of specific drugs and vitamins is necessary for a subset of patients. Monitoring-guided therapies are particularly promising for vulnerable patients or those with atypical characteristics that affect the absorption, distribution, metabolism or excretion of the drug or vitamin. The delivery of drugs on an individualised basis and the personalisation of vitamin supplementation represent promising steps towards the realisation of precision medicine. This is a field of medicine that takes into account the variability of an individual's genes, environment and lifestyle.

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
ACV	Aciclovir
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato (<i>adenosine diphosphate</i>)
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
Alfa-T	Alfa-tocoferol
Alo-HSCT	Trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>alkaline phosphatase</i>)
ALT	Alanina aminotransferasa
APCI	Ionización química a presión atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
AST	Aspartato aminotransferasa
ATP	Adenosín trifosfato (<i>adenosine triphosphate</i>)
AUC	Área bajo la curva (<i>area under curve</i>)
Auto-HSCT	Trasplante autólogo de progenitores hematopoyéticos
BR	Relación de sesgos (<i>bias ratio</i>)
CI	Intervalo de confianza (<i>confidence interval</i>)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C_{mín}	Concentración mínima de fármaco
CMV	Citomegalovirus
COL	Colesterol
CV	Coefficiente de variación
dPCR	PCR digital
EA	Error aleatorio
ECMV	Enfermedad por infección con citomegalovirus
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFLM	European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	Efecto matriz
EMA	European Medicines Agency
ERC	Enfermedad renal crónica
ES	Error sistemático
ESI	Ionización por electrospray (<i>electrospray ionization</i>)

ET	Error total
FDA	Food and Drug Administration
GCV	Ganciclovir
GFR	Filtrado glomerular (<i>glomerular filtration rate</i>)
GGT	Gamma-glutamyl transferasa
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteína de alta densidad (<i>high-density lipoprotein</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano (<i>human leukocyte antigens</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-FLD	Cromatografía líquida acoplada a detector de fluorescencia (<i>liquid chromatography coupled with a fluorescence detector</i>)
HPLC-UV	Cromatografía líquida acoplada a detector ultravioleta (<i>liquid chromatography coupled with ultraviolet spectroscopy</i>)
HSCT	Trasplante de progenitores hematopoyéticos (<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>)
IDS	Índice de desviaciones estándar
IQR	Rango intercuartílico (<i>interquartile range</i>)
IM	Incertidumbre de medida
IMC	Índice de masa corporal
IS	Estándar interno (<i>internal standard</i>)
IVD	Diagnóstico in vitro (<i>in vitro diagnostics</i>)
LC	Cromatografía líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (<i>liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry</i>)
LDL	Lipoproteína de baja densidad (<i>low-density lipoprotein</i>)
LLOQ	Límite bajo de cuantificación (<i>low-limit of quantification</i>)
LIN	Límite inferior de normalidad
LT	Lípidos totales
LSN	Límite superior de normalidad
LTV	Letermovir
MBV	Maribavir
MS	Espectrometría de masas (<i>mass spectrometry</i>)
m/z	Relación masa-carga
n	Tamaño muestral
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NGS	Secuenciación de nueva generación (<i>next generation sequencing</i>)

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	Farmacodinámica (<i>pharmacodynamics</i>)
PK	Farmacocinética (<i>pharmacokinetics</i>)
PLP	Piridoxal 5'-fosfato (<i>pyridoxal 5'-phosphate</i>)
QC	Control de calidad (<i>quality control</i>)
RE	Recuperación
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
SIL	Sistema informático del laboratorio
SKML	Programa EQA (<i>Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek</i>)
SOT	Trasplante de órgano sólido (<i>solid organ transplantation</i>)
TDM	Monitorización de fármacos (<i>therapeutic drug monitoring</i>)
TPP	Pirofosfato de tiamina (<i>thiamine pyrophosphate</i>)
UBP	Unidad Básica de Prevención
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UV/VIS	Detector de absorbancia en el intervalo ultravioleta-visible
VACV	Valaciclovir
VGCV	Valganciclovir
VLDL	Lipoproteína de muy alta densidad (<i>very-low-density lipoprotein</i>)
VR	Valores de referencia

INTRODUCCIÓN

A. Medicina individualizada/personalizada

La medicina personalizada, también medicina individualizada o de precisión, se entiende como el estudio de los fenotipos y genotipos de los individuos con el objetivo de seleccionar una estrategia terapéutica dirigida. También se ha definido como la adaptación del tratamiento médico a las características individuales de cada paciente para clasificar a los individuos en subpoblaciones que difieren en su susceptibilidad a una enfermedad o su respuesta a un tratamiento específico¹. Se erige por lo tanto como una potente herramienta a explorar y explotar por el profesional sanitario en beneficio del paciente, que se presenta como un individuo caracterizado por una biología, genética e idiosincrasia únicas y diferentes a los demás individuos y como tal se le debe tratar de forma individualizada y no generalizada por patología o demografía.

La medicina de precisión presenta como limitación la reducida evidencia respecto a la medicina generalizada clásica. Históricamente, las terapias se han validado en los ensayos clínicos, y la aplicación de la medicina de precisión está limitada por las condiciones inherentes de los ensayos aleatorizados controlados. Se han desarrollado nuevas estrategias para aplicar la medicina de precisión y facilitar la transición de las investigaciones basadas en teorías científicas a ensayos clínicos prácticos². Una estrategia es elaborar nuevas políticas y regulaciones centradas en el desarrollo, aplicación y evaluación de la medicina de precisión; por ejemplo, guías clínicas elaboradas por equipos multidisciplinares³. Otra estrategia podría ser combinar los datos generados en estudios multicéntricos aleatorizados (esto ampliaría la heterogeneidad de la población incluida en el estudio) con los datos generados en el mundo real; es decir, de la población tratada en cada centro sanitario. Queda por demostrar si la experiencia del mundo real junto con los métodos analíticos avanzados y el progreso de la tecnología y el aprendizaje automático o *machine learning* para generar predicciones de los efectos de cada tratamiento resultará en mejores o similares decisiones y resultados que siguiendo las directrices de los ensayos aleatorizados clásicos.

La búsqueda del término *personalized medicine* entre 1952 y 2002 en la librería de artículos científicos Pubmed ofrece 3.426 entradas; en los últimos 5 años (2019–2024), la cifra asciende a 113.975 entradas. El interés por alcanzar una medicina individualizada y al alcance de todo el mundo es exponencial, y muestra de ello son los esfuerzos que están realizando a nivel mundial y en todos los campos relacionados con la salud; un ejemplo de ello es el proyecto EULAC PerMed. En este

proyecto aúnan esfuerzos para la cooperación en política e investigación en medicina personalizada entre países de la Unión Europea y países latinoamericanos (<https://www.eulac-permed.eu/index.php/es/que-es-la-medicina-personalizada/>). En el proyecto participan un total de 10 países: España, Alemania, Brasil, Italia, Chile, Francia, Uruguay, Panamá, Israel y Argentina. El objetivo general es colaborar en los esfuerzos globales para el desarrollo y la promoción de la medicina personalizada. Otros objetivos planteados han sido: el análisis de los aspectos éticos, legales y sociales para implementar la medicina de precisión; incluir la medicina personalizada en las políticas científicas; o crear una plataforma para la colaboración en ensayos clínicos centrados en la medicina de precisión. Además de participar activamente en diferentes proyectos y crear una red de investigación de medicina personalizada, promueven la colaboración y la formación a través de seminarios, webinarios, o talleres dirigidos a los profesionales sanitarios de los países colaboradores.

B. Retos para el laboratorio clínico

La medicina de precisión se puede considerar un proceso evolutivo por etapas, que se fundamenta en una serie de conocimientos que denominaremos *big data* o *data mining*. El *big data* se nutre de mucha información obtenida desde diferentes fuentes: la historia médica del paciente y antecedentes patológicos, el estilo de vida y hábitos de salud, la evaluación física, pruebas de laboratorio, pruebas de imagen, pruebas funcionales, pruebas histológicas e inmunológicas y la ómica (genómica, proteómica, lipidómica, metabolómica...) del individuo⁴.

Todos estos datos se deben recoger y considerar en conjunto (primera etapa). La información generada será utilizada para crear modelos diagnósticos, pronósticos y de seguimiento (segunda etapa) que permitan predecir la respuesta del paciente al tratamiento (tercera etapa) (**figura 1**). En este proceso el laboratorio clínico adquiere un papel clave, desde la producción, recogida y almacenamiento de los datos de pacientes hasta el diseño de los modelos predictivos o la evaluación de la respuesta al tratamiento de los pacientes.

Más concretamente, el laboratorio de bioquímica participa activamente en diferentes escalones del proceso, desde los más básicos a los más complejos considerando los primeros las pruebas básicas del laboratorio que se realizan diariamente en los analizadores automatizados, hasta perfiles de ómica o la evaluación de los tratamientos mediante tecnología altamente compleja y exclusiva. En este sentido, se puede afirmar que el desarrollo de la tecnología ha potenciado y facilitado el crecimiento de la medicina de precisión como herramienta terapéutica en la práctica clínica⁵. Existe un amplio espectro de plataformas tecnológicas avanzadas disponibles en los centros sanitarios y más

concretamente, en el laboratorio clínico, que enlazan la tecnología con la medicina de precisión⁶⁻¹¹. Se pueden destacar, entre otros, la PCR digital (dPCR), la espectrometría de masas acoplada a espectrometría de masas en tándem (*liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), el análisis de ADN circulante, o la tecnología de secuenciación masiva del ADN (*next generation sequencing*, NGS).

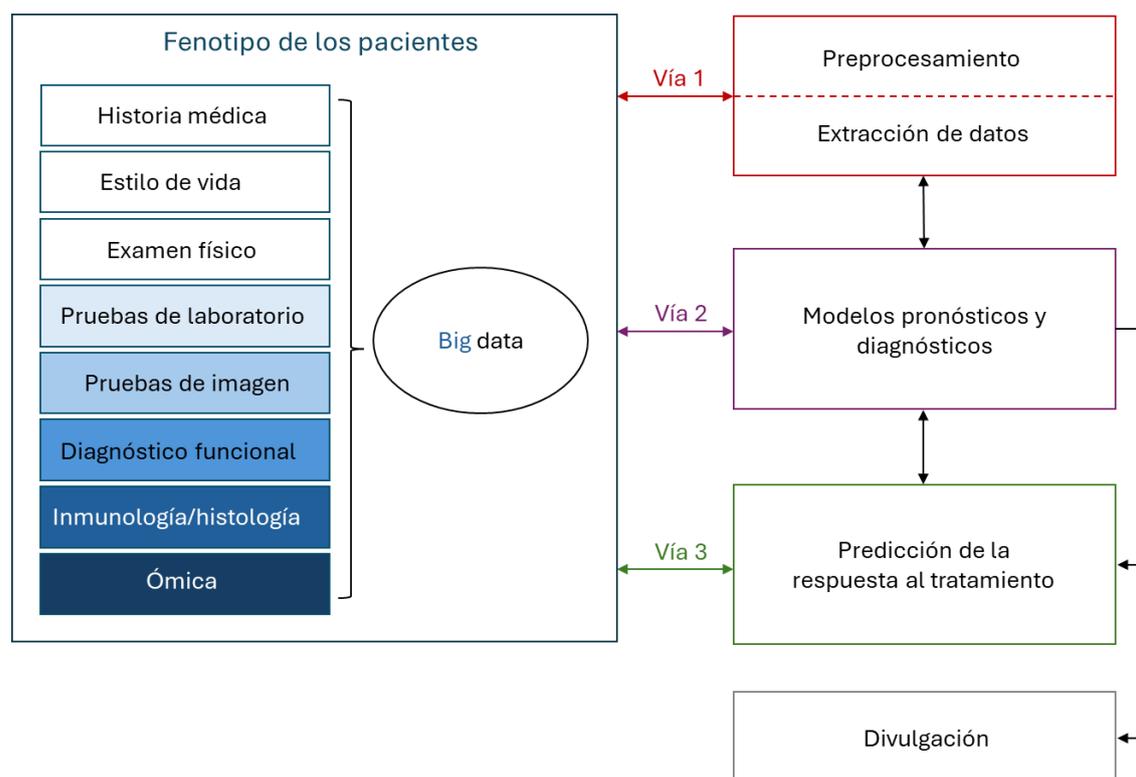


Figura 1. Mapa de procesos de la medicina de precisión. Conceptos clave sombreados en azul. Imagen adaptada del artículo Eur Respir J. 2017 Oct 19;50(4):1700391. doi: 10.1183/13993003.00391-2017⁴.

C. Utilidad de la cromatografía y la espectrometría de masas en el laboratorio clínico

Los analizadores más comúnmente utilizados en el laboratorio clínico como nefelómetros o espectrofotómetros completamente automatizados permiten el análisis multiplexado de decenas de pacientes rápida y simultáneamente, cualidades que los hace imprescindibles en cualquier centro de salud, especialmente en los que disponen de servicios de urgencias. Sin embargo, son sistemas prácticamente cerrados que no permiten el desarrollo de nuevos métodos de medida. Existen en el laboratorio analizadores menos eficaces y con capacidad mucho más limitada, como los ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) o los

cromatógrafos líquidos y gaseosos, que permiten a operadores expertos desarrollar procedimientos de medida para detectar y cuantificar una gran variedad de analitos, con independencia de proveedores comerciales. En este trabajo, se ha utilizado como herramienta de análisis la cromatografía líquida acoplada a diferentes detectores en función de las características del analito estudiado.

La cromatografía líquida es una metodología de referencia, precisa, exacta, robusta y con el potencial de ser una técnica prácticamente universal y sumamente versátil. Las ventajas se multiplican cuando la cromatografía líquida se usa conjuntamente con un detector de espectrometría de masas (*liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS)¹². Como contrapartida, el coste del equipo y del mantenimiento es elevado, requiere formación especializada, y existe una falta de estandarización entre laboratorios clínicos y de investigación. A pesar de no estar disponible en todos los laboratorios clínicos, se está extendiendo gradualmente en los hospitales terciarios y de referencia. Permite realizar análisis de miles de moléculas basados en propiedades intrínsecas de las moléculas como la polaridad, el peso molecular, el tamaño, la capacidad de ionización, etc., y acoplarla a un detector igualmente versátil.

La cromatografía es una técnica analítica que permite separar mezclas complejas en sus componentes con el objetivo de identificarlos y/o cuantificarlos. Para ello utiliza la diferente afinidad de cada componente entre dos medios diferentes (la fase estacionaria o sólida y la fase móvil o líquida).

- La fase móvil se compone normalmente de uno o dos disolventes. Cuando se trabaja con dos disolventes, éstos suelen ser de polaridades diferentes para arrastrar a todos los componentes de la mezcla hasta el final de la columna.
- La fase estacionaria suele ser una columna sólida de unos centímetros de longitud que contiene un relleno de partículas de sílice, y un grupo químico enlazado a ellas que interacciona con los analitos y los retiene más o menos tiempo en función de los enlaces no covalentes que puedan formar con ese grupo químico.

Los analitos se adhieren a la superficie del relleno de la columna, pero no son absorbidos por él. Los diferentes analitos se separan en la mezcla a medida que atraviesan la columna a diferentes velocidades¹³. La afinidad de cada componente por ambas fases hace que cada analito atraviese la columna en un tiempo determinado, o tiempo de retención, que se utiliza como identificador inequívoco y característico de ese compuesto (en las mismas condiciones; es decir, composición de

las fases móviles y caudal, gradiente, etc.). El uso de dos o más fases móviles permite trabajar en dos modalidades: isocrática y gradiente.

- La modalidad isocrática implica que la composición de las fases móviles es constante durante el tiempo de análisis.
- La modalidad gradiente se refiere al cambio en la composición de las fases móviles (mínimo debe haber dos) durante el tiempo de análisis. Suele producirse progresivamente, para no producir saltos de presión que desestabilicen el detector.

Existen dos metodologías principales de trabajo en función del relleno de la columna y las características de las fases móviles. En primer lugar, la cromatografía en fase normal, que utiliza sílice no modificada en la columna y un gradiente que va de disolventes no polares a polares en las fases móviles. Los componentes más polares del analito se adsorben en la fase estacionaria y, por tanto, requerirían fase móvil más polar para desplazarlos y eluirlos de la columna. Por el contrario, los componentes no polares tienen una afinidad débil por la fase estacionaria y eluyen con un tiempo de retención menor. En segundo lugar, la cromatografía en fase inversa o reversa (**figura 2**), que comúnmente utiliza cadenas de 8 o 18 carbonos, o cadenas apolares, unidas a la sílice y un gradiente que va de disolvente polar a disolvente apolar. Los componentes más lipofílicos del analito se adhieren más fácilmente a las cadenas apolares y eluyen de la columna cuando disminuye la polaridad del disolvente (momento en el que aumenta la afinidad del analito por la fase móvil).

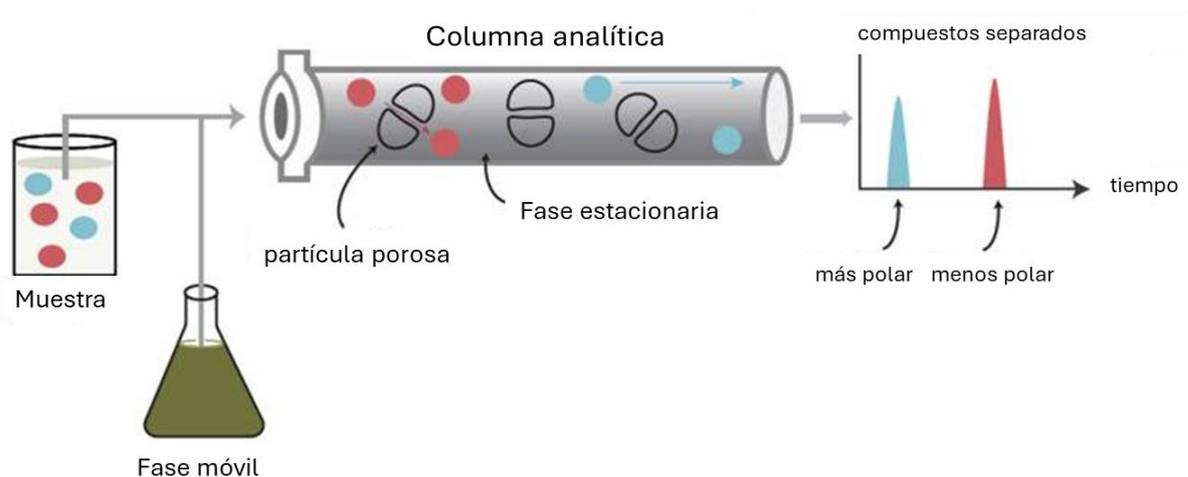


Figura 2. Separación en fase reversa. Imagen adaptada del artículo J Clin Exp Hepatol. 2019 Sep-Oct;9(5):597-606. doi: 10.1016/j.jceh.2019.04.053¹⁴.

El cromatógrafo líquido de alta presión (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) es el más común en los centros sanitarios. Consta de una o varias bombas, uno o varios degasificadores, un

inyector de muestra, una columna analítica y un detector (**figura 3**). Debe ir unido a un ordenador para traducir e interpretar la señal analógica emitida por el detector. La bomba debe producir un flujo constante y estable de fase móvil por todo el sistema. La fase móvil alcanza una presión de hasta 40 MPa o 400 atm. Se puede utilizar como complemento una precolumna que está rellena de un material similar al de la columna analítica y se coloca entre el inyector y la columna. Retiene las impurezas y los componentes de la mezcla que potencialmente puedan quedar retenidos en la columna; así, prolonga la vida útil de la columna¹³.

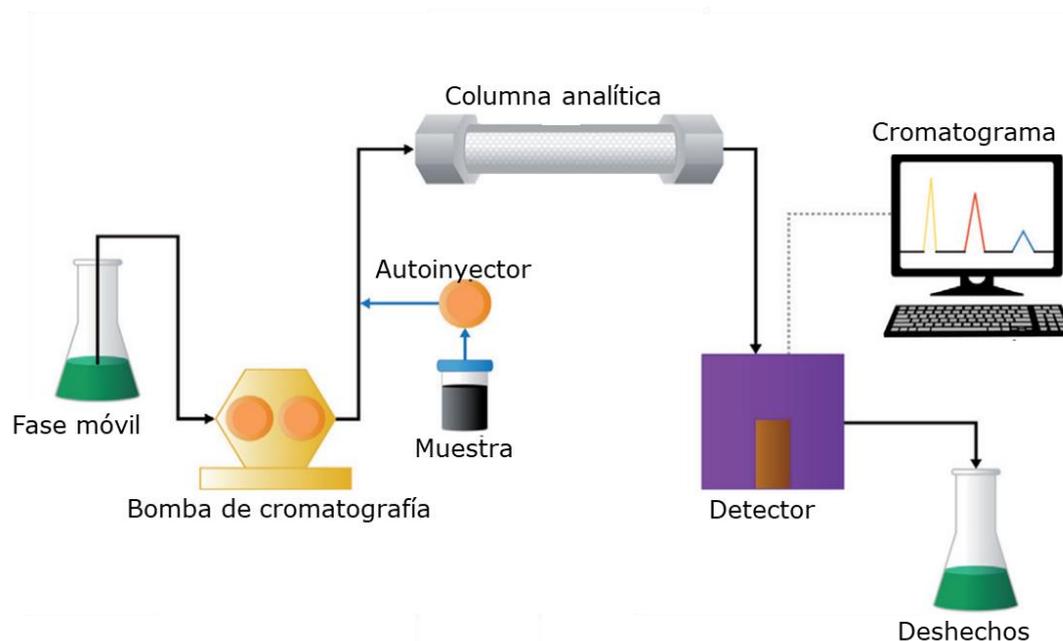


Figura 3. Representación esquemática de un cromatógrafo líquido. Imagen adaptada del artículo Br J Hosp Med (Lond). 2014 Feb;75(2):C18-21. doi: 10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18¹⁵.

Para llevar a cabo el análisis de fluidos biológicos en el laboratorio clínico el analista se enfrenta a varios retos. Uno de los principales retos es la naturaleza compleja de la matriz, que requiere una extracción previa a su inyección en el cromatógrafo. Idealmente se debería obtener un extracto limpio. Además, en las mezclas, el analizador debe ser capaz de separar los analitos de interés de los coeluyentes o posibles interferentes. Para ello, la selección del detector será trascendental en el análisis. El detector de absorbancia en el intervalo ultravioleta-visible (UV/VIS) (C.1) ofrece una excelente linealidad, rapidez y una interpretación sencilla de los cromatogramas, pero presenta una menor especificidad y sensibilidad que otros detectores. Los detectores de fluorescencia (C.2) son considerablemente más sensibles y selectivos que los detectores UV/VIS, pero pocas moléculas emiten fluorescencia, lo que limita su aplicabilidad. Los espectrómetros de masas (C.3) presentan elevada especificidad y sensibilidad y son prácticamente universales en cuanto al número de distintos tipos de molécula que puede medir. Como desventajas, los equipos son más caros que los de UV/VIS y fluorescencia, y requieren una mayor experiencia del usuario.

C.1. Detector de absorción UV/VIS

El detector UV-VIS mide la absorbancia de las moléculas en la región UV-VIS mediante la ley de Beer–Lambert (**ecuación 1**).

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon \times b \times C \quad (1)$$

en la que A es la absorbancia total medida a una longitud de onda determinada; P_0 y P son las potencias del haz de luz antes y después, respectivamente, de atravesar la mezcla estudiada; ε es la absorptividad molar; b el camino óptico y C la concentración de la molécula absorbente. Es decir, el detector UV-VIS mide la pérdida de intensidad de luz, “P”, producida por una lámpara al atravesar el haz de luz una cubeta de tamaño conocido, “b”, en la que se encuentra la muestra respecto a la intensidad de luz que alcanzaría al detector sin la muestra, “ P_0 ”.

En la actualidad estos detectores utilizan una rejilla para dispersar la luz una vez que ha atravesado la celda de flujo, así permiten la medición de muchas longitudes de onda simultáneamente, lo que proporciona un espectro de absorción completo de la mezcla. Las moléculas que absorben en el espectro UV/VIS son aquellas que contienen electrones en los orbitales moleculares σ y π o en orbitales no enlazantes n. Presentan grupos cromóforos como $-C=C-$, $-N=N-$ y anillos aromáticos.

Un detector UV-VIS consta de: una fuente de luz como una lámpara de deuterio o tungsteno, un portamuestras, un dispositivo de dispersión para separar las distintas longitudes de onda de la luz y un detector tipo fotomultiplicador (**figura 4**).

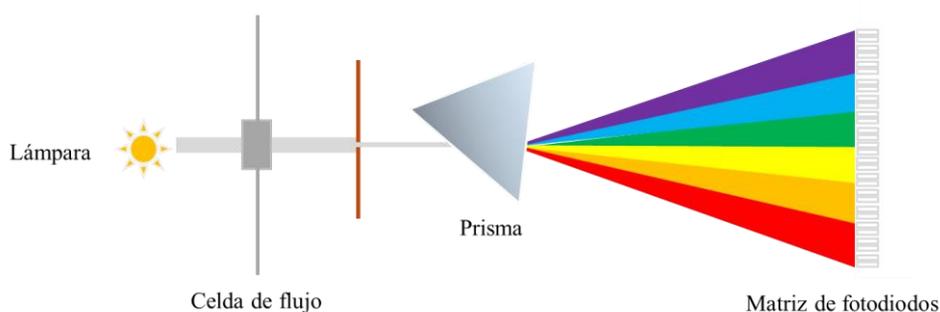


Figura 4. Representación esquemática de un detector UV/VIS. Se representa un monocromador de prisma como dispositivo de dispersión de la luz y la matriz de fotodiodos como detector de radiación.

C.2. Detector de fluorescencia

Los detectores de fluorescencia miden los fotones emitidos por moléculas fluorescentes tras la excitación de las mismas a una longitud de onda determinada. Son entre 10 y 1000 veces más sensibles que los detectores de absorción UV/VIS.

La fluorescencia es un proceso de relajación de las moléculas desde un estado excitado a un nivel basal o menos excitado. Dentro de los procesos de fotoluminiscencia se engloban la fluorescencia y la fosforescencia, siendo la duración de la primera mucho menor (**figura 5**). Sólo unas pocas moléculas pueden emitir fluorescencia, aquellas con un elevado número de anillos y elevada conjugación. Por ejemplo, los compuestos que contienen grupos funcionales aromáticos y los compuestos con estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces muy conjugados. En el laboratorio clínico, cuando los analitos se encuentran en baja concentración en el fluido biológico y se requiere un método de medición suficientemente sensible, es común derivatizar las moléculas para unir a su estructura un fluoróforo y así poder medirlas mediante el detector de fluorescencia.

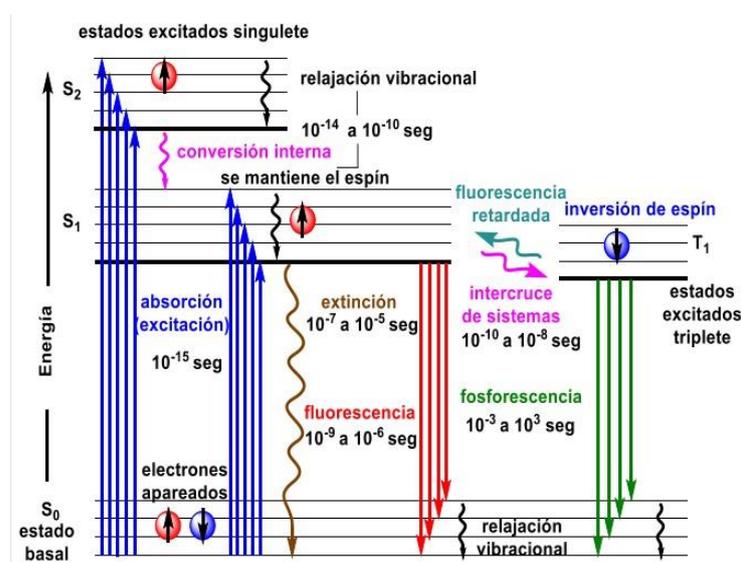


Figura 5. Fenómeno de fluorescencia. Imagen obtenida del artículo Pádi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI, 9(17), pp. 9-16. doi: 10.29057/icbi.v9i17.7143¹⁶.

El detector de fluorescencia consta de: una lámpara de arco de xenón o de mercurio como fuente de radiación, varias lentes, un monocromador que selecciona una longitud de onda de excitación (λ_{ex}), un segundo monocromador que forma un ángulo de 90° con la luz incidente y examina la longitud de onda de emisión (λ_{em}) o fluorescencia, y un fotomultiplicador.

C.3. Detección por espectrometría de masas

Los espectrómetros de masas miden la relación masa-carga de moléculas ionizadas positiva o negativamente (abreviado como m/Q , m/q , m/Z o más comúnmente m/z). El análisis por espectrometría de masas es mucho más versátil que el de los detectores arriba mencionados, además de ofrecer características mejoradas como especificidad, exactitud, o sensibilidad.

Los espectrómetros de masas acoplados a cromatógrafos líquidos constan de tres componentes fundamentales: una entrada de muestra con una fuente de ionización a presión atmosférica (a); un analizador de masas que separa los iones en función de su m/z (b); y un detector de iones para detectar y cuantificar los iones, ambos a alto vacío (c). Algunos de estos componentes básicos pueden combinarse; por ejemplo, la entrada, vaporización de la muestra e ionización de las moléculas pueden estar acoplados; también en algunos diseños la separación y la detección de iones se llevan a cabo simultáneamente. Además, todo espectrómetro de masas requiere de un dispositivo para el procesamiento de la señal del detector, básicamente un convertidor analógico-digital y un software informático.

a. Ionización

La muestra procedente del cromatógrafo líquido se evapora y se ioniza. En el laboratorio clínico se utilizan frecuentemente la ionización por electroespray (*electrospray ionization*, ESI) (**figura 6**) y la ionización química a presión atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI). Ambas trabajan a presión atmosférica y son fuentes de ionización suave; esto es, apenas fragmentan las moléculas en este proceso, formando iones moleculares.

La espectrometría de masas sólo puede medir la masa de partículas cargadas positiva o negativamente, y esta carga puede ser única (± 1) o múltiple ($\pm 2, \pm 3 \dots$).

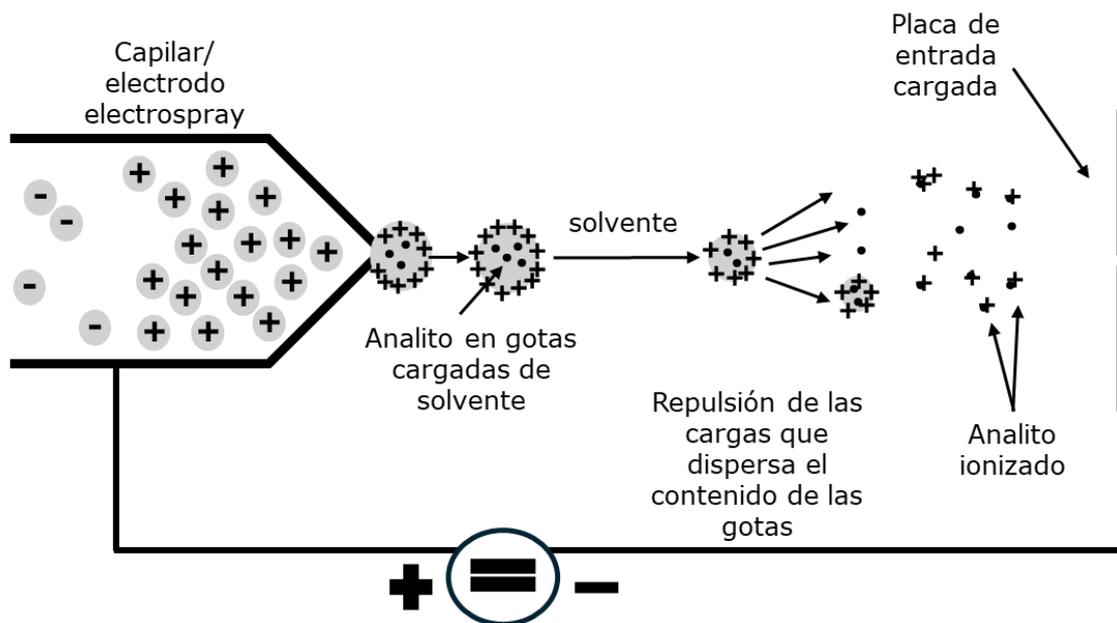


Figura 6. Representación esquemática la fuente de ionización electroespray (ESI). Imagen adaptada del artículo Clin Biochem Rev. 2011 Feb;32(1):5-31. PMID: 21451775¹².

b. Separación de iones

Los iones se separan en esta etapa en función de su relación m/z usando campos eléctricos y/o magnéticos. Aunque existen diferentes analizadores de masas, todos tienen en común que la interacción entre moléculas de diferentes tamaños y cargas y el campo eléctrico y/o magnético causa la separación de los iones en función de su m/z . Cuando la separación se lleva a cabo por campos eléctricos, el tamaño y la carga del ion determinarán la velocidad con la que alcanzan el detector; para la separación según campos magnéticos, los iones trazarán diferentes trayectorias hasta el detector.

Un analizador de masas frecuentemente usado en el laboratorio clínico es el cuadrupolo en su versión más simple, o el triple cuadrupolo en tándem. Un cuadrupolo está formado por cuatro barras metálicas enfrentadas dos a dos a las que se aplican potenciales constantes y alternos. Así, se genera un campo eléctrico oscilante que atravesarán las moléculas ionizadas: si entran en resonancia con el campo eléctrico, trazarán una trayectoria estable que les permitirá alcanzar el detector. De lo contrario, chocarán contra las barras o saldrán fuera del analizador y no llegarán al detector (**figura 7**).

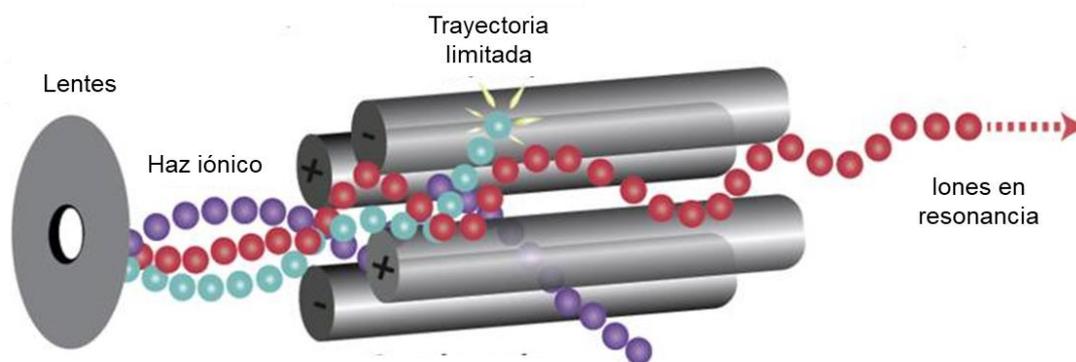


Figura 7. Representación gráfica de un cuadrupolo. Imagen adaptada del artículo J Clin Exp Hepatol. 2019 Sep-Oct;9(5):597-606. doi: 10.1016/j.jceh.2019.04.053¹⁴.

En el analizador de masas triple cuadrupolo o espectrómetro de masas en tándem (**figura 8**), el primer y el tercer cuadrupolo permiten filtrar una m/z concreta o un intervalo de m/z , pero el segundo cuadrupolo, o celda de colisión, se llena con un gas inerte a baja presión que fragmentará las moléculas (esta opción se puede deshabilitar).

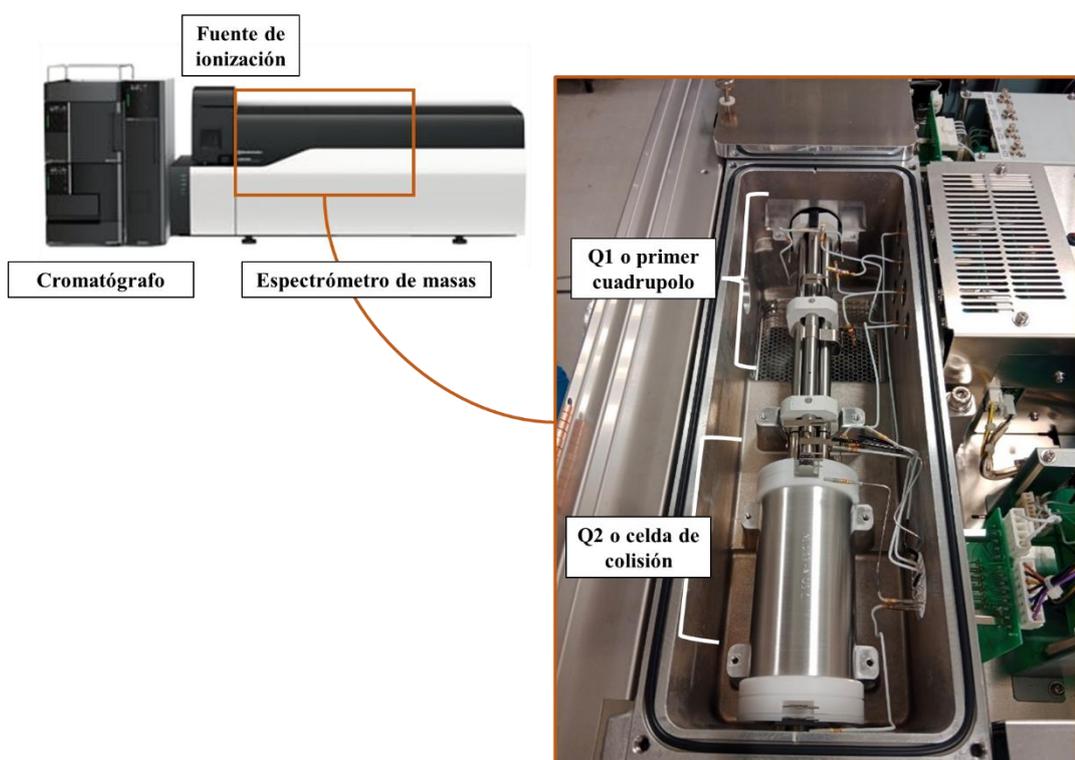


Figura 8. Cuadrupolo y celda de colisión de un espectrómetro de masas LCMS-8050 de Shimadzu. Fotografía realizada por la autora.

Esta instrumentación permite al usuario realizar, dentro de la sensibilidad del instrumento y la resolución de masa, diferentes tipos de análisis: escaneo de masas según un intervalo definido, selección de una relación m/z concreta, o una combinación de ambos.

c. Detección

El detector suele ser un multiplicador de electrones, que registra a través de un ordenador el número de iones por cada relación m/z específica (**figura 9**). El detector está compuesto a su vez por un dinodo de conversión y un multiplicador secundario de electrones que detectará los iones que consigan atravesar el analizador de masas. Una vez que los primeros iones colisionan con el dinodo de conversión, se aceleran y colisionan con el primer dinodo del multiplicador, amplificando a través de varias etapas el número de electrones y por lo tanto la corriente generada. Esta corriente será proporcional a la concentración del analito en el bioespecimen.

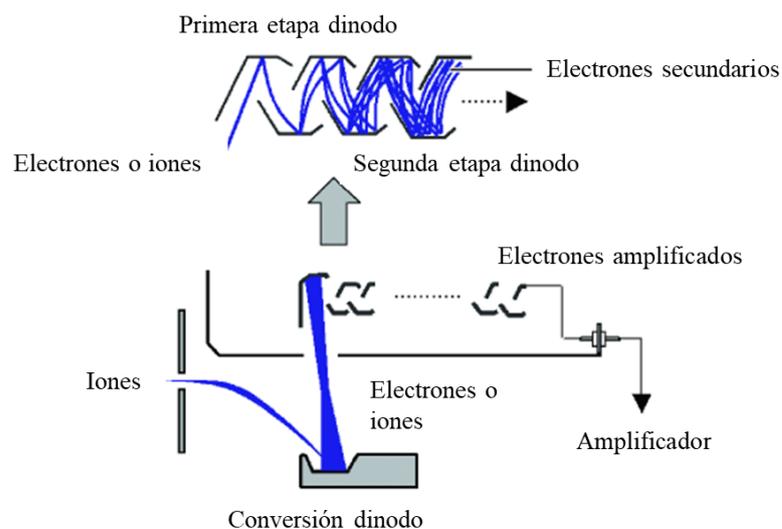


Figura 9. Representación de un multiplicador de electrones. Adaptada del manual de instrucciones para el usuario del analizador LCMS-8050 de Shimadzu.

D. Desarrollo de métodos vs. kits comerciales

Una ventaja de la cromatografía es la posibilidad de desarrollar un procedimiento de medida con disolventes, soluciones y fungibles comunes para medir un único analito o un panel extenso de analitos según las necesidades del equipo de investigación o, en el caso de los laboratorios clínicos, del paciente. A estos métodos propios se les denomina procedimientos internos o métodos *in-house*. Por otro lado, existen empresas privadas que desarrollan sus propios métodos y venden conjuntos de

disolventes, calibradores, controles y fungibles en kits completamente cerrados, validados y listos para su uso¹⁷. Son productos de diagnóstico *in vitro* (*in vitro diagnostics*, IVD). Estos kits están aumentando en cantidad y complejidad y, actualmente, el laboratorio clínico dispone de un enorme catálogo en el que ofrecen paneles de metabolitos y biomarcadores tan variados como las propias necesidades del paciente (**figura 10**). Sin embargo, las empresas privadas se mueven, evidentemente, por interés comercial, desarrollando paneles de fármacos más comúnmente usados en la práctica clínica y biomarcadores de enfermedades con mayor prevalencia¹⁸.

Su principal desventaja es la falta de kits comerciales para medir biomarcadores de enfermedades raras o menos prevalentes, así como fármacos monitorizados en un reducido grupo de pacientes. En estos casos, el desarrollo de procedimientos internos adquiere gran importancia y conduce al seguimiento y tratamiento individualizado del paciente con necesidades más exclusivas.



Figura 10. Ejemplo de kit comercial, que incluye los reactivos necesarios para el pretratamiento de las muestras y el análisis de metanefrinas por LC-MS/MS. Imagen obtenida de la página web del fabricante, <https://chromsystems.com/>.

El desarrollo de métodos por cromatografía líquida no carece de inconvenientes. Por ejemplo, la gran complejidad de las matrices biológicas, lo cual implica realizar un procesamiento en ocasiones tedioso a la muestra previamente al análisis¹⁹. Por otro lado, las moléculas detectadas mediante espectrometría de masas (*mass spectrometry*, MS) están sujetas a efectos de matriz y supresión iónica que pueden afectar a la cuantificación y sensibilidad del método²⁰; los métodos que utilizan como detectores de ultravioleta (UV) y fluorescencia (*fluorescence detector*, FLD), además de efecto

matriz, pueden presentar interferencias, a las longitudes de onda medidas, que limita la especificidad del método.

Desde el año 2017, la normativa europea 2017/746 regula el desarrollo, la validación y la justificación de los procedimientos internos, entre ellos los métodos por cromatografía líquida (*liquid chromatography*, LC) implementados en el laboratorio clínico²¹. Esta normativa tiene como propósito “reforzar la transparencia en el proceso de desarrollo y fabricación de productos sanitarios para garantizar la seguridad del paciente”²². El nuevo reglamento no modifica significativamente el desempeño de las etapas de desarrollo y validación en LC, pues los laboratorios clínicos ya realizan una extensa validación analítica y clínica de dichos procedimientos siguiendo guías actualizadas de sociedades científicas europeas (European Medicines Agency, EMA), americanas (Food and Drug Administration, FDA) o internacionales (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI). Sin embargo, el tercer concepto, la justificación, cambia por completo el paradigma de los métodos *in-house*. Si hasta el momento era posible desarrollar cualquier método de cualquier analito y cualquier espécimen en el laboratorio, desde el 26 de mayo de 2024 se deberá optar por el kit comercial si el analito a estudio está comercializado. Únicamente estará justificado el desarrollo de métodos propios cuando “no puedan satisfacerse las necesidades específicas del grupo de pacientes al que se destinan los productos, o no pueden satisfacerse con el nivel de funcionamiento adecuado mediante otro producto comercializado”²². De este modo, los métodos *in-house* quedan relegados a marcadores de enfermedades raras o poco prevalentes, fármacos administrados en un pequeño grupo de pacientes, o aquellos que sólo se deban monitorizar en condiciones específicas. En definitiva, relega el desarrollo de métodos *in-house* a situaciones muy concretas y aumenta la supervisión de los mismos²³, con un enorme impacto en el laboratorio y en el paciente^{24,25}.

E. Medicina individualizada a través de la monitorización de fármacos y vitaminas para ajuste de dosis y optimización en la suplementación

La farmacogenómica, pilar fundamental en la medicina de precisión, es el estudio del modo en que las diferencias genéticas entre individuos influyen en la respuesta de los pacientes y en la disposición de los fármacos. Existe una importante variabilidad interindividual entre genomas humanos (entre 2 y 100 veces)²⁶. Esta variabilidad puede tener un gran impacto en la eficacia de fármacos que requieren la activación o inactivación de las enzimas afectadas.

Por lo tanto, la farmacogenómica puede desempeñar un papel importante en el ajuste de la dosis para garantizar la eficacia y/o prevenir la toxicidad. Sin embargo, hay otros factores que pueden afectar a la exposición global de un paciente a un fármaco. Entre ellos se incluyen influencias dietéticas, problemas gastrointestinales (por ejemplo, la enfermedad de Crohn o el síndrome del intestino irritable), la composición corporal o la medicación concomitante (prescrita y recreativa)²⁶.

Momper *et al.* consideran que la monitorización de fármacos (*therapeutic drug monitoring*, TDM) es la base conceptual para la medicina personalizada, que finalmente ha evolucionado para incluir estrategias farmacogenómicas, basadas en biomarcadores, y en análisis de datos para la clasificación de pacientes²⁷. El genotipado de las enzimas metabolizadoras o de los transportadores de fármacos (o farmacogenómica) puede ser útil para seleccionar el fármaco y la dosis inicial, mientras que la TDM es necesaria para ajustar las dosis posteriores en función de las concentraciones del fármaco o las medidas farmacodinámicas²⁸.

La coadministración de fármacos y suplementos puede producir interacciones en la farmacocinética (*pharmacokinetics*, PK) o la farmacodinámica (*pharmacodynamics*, PD) de un fármaco, en ocasiones independientemente del análisis farmacogenómico del paciente²⁹. Estas interacciones podrían ocurrir si los compuestos comparten mecanismos o impactan en los procesos de absorción (A), distribución (D), metabolismo (M) o excreción (E) (**figura 11**)²⁹. Tales interacciones pueden conducir a un cambio en la concentración del fármaco o del suplemento en su diana molecular o sitio de acción. Por ejemplo, la metoclopramida tiene un impacto negativo en la absorción de la digoxina; por otro lado, la administración de ácido fólico en pacientes tratados con 5-fluorouracilo tiene un efecto sinérgico que incrementa la inhibición de la sintasa timidilato (**figura 11**). La monitorización del fármaco o suplemento en estos casos es clave para asegurar su eficacia y evitar toxicidad, independientemente de la farmacogenómica.

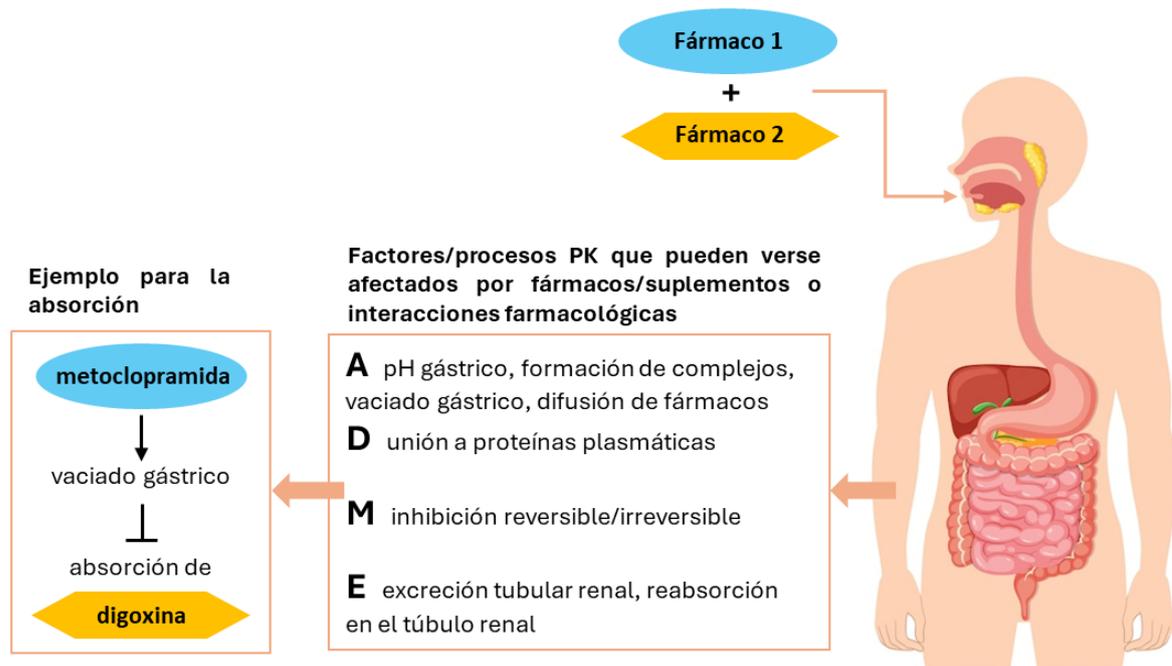


Figura 11. Factores que influyen en la farmacocinética de los fármacos, junto al ejemplo de la metoclopramida. A, absorción; D, distribución; E, excreción; M, Metabolismo; PK, farmacocinética. Imagen adaptada del artículo Front Pharmacol. 2024 Mar 13;15:1348112. doi: 10.3389/fphar.2024.1348112²⁹.

Los pacientes pediátricos son especialmente vulnerables a la variabilidad en los parámetros farmacocinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Especialmente los neonatos, experimentan cambios madurativos constantemente y muestran una amplia variabilidad farmacocinética interindividual, que a menudo no se puede explicar ni predecir. Los cuidados intensivos neonatales como la hipotermia terapéutica o la oxigenación por membrana extracorpórea aumentan aún más la variabilidad farmacocinética²⁷.

Cuando se ajusta la dosis de un fármaco, se hace respecto a concentraciones objetivo predeterminadas que se derivan de un grupo de pacientes estudio en un ensayo clínico. Este enfoque ha sido aceptable y suficiente para la TDM en general. Sin embargo, las concentraciones diana no siempre son correctas para un paciente en particular. Esta circunstancia podría dar lugar a la aplicación de concentraciones objetivo individualizadas mediante la monitorización de la respuesta al fármaco (en función de la eficacia o toxicidad del mismo)²⁸. En este sentido, la TDM es fundamental para el concepto de medicina personalizada^{28,30,31}.

Otro ejemplo especialmente interesante es el descubrimiento de nuevos fármacos. La TDM ayuda a caracterizar la farmacocinética de estos nuevos fármacos, cuando se desconoce qué niveles esperar y, quizás, cuándo ajustar la dosis. Esta investigación se beneficiaría de generar datos farmacocinéticos en grupos de pacientes para los que aún no existen datos. Simultáneamente, los pacientes podrían beneficiarse del ajuste de dosis basado en los escasos datos farmacocinéticos disponibles. Así, los laboratorios generarían en cierto sentido datos de desarrollo de fármacos y de TDM simultáneamente³⁰.

F. Nutrición de precisión, personalizada, o estratificada

La nutrición de precisión se puede definir de forma global como el uso de la información sobre las características individuales para desarrollar asesoramiento, productos o servicios nutricionales específicos³². La nutrición de precisión puede aplicarse en dos grandes ámbitos: en primer lugar, para maximizar los beneficios y reducir los efectos adversos de los cambios dietéticos en pacientes con enfermedades específicas o con necesidades nutricionales especiales y, en segundo lugar, para mejorar la salud pública.

En la nutrición de precisión se utilizan múltiples conceptos³².

- Nutrición estratificada. Agrupa a personas con características comunes y ofrece consejos nutricionales adaptados a cada grupo.
- Nutrición personalizada. Ofrece, además, consejo nutricional adaptado a cada individuo.
- Nutrición de precisión. Sugiere que es posible tener un conocimiento cuantitativo suficiente sobre las complejas relaciones entre un individuo, su consumo de alimentos y su fenotipo para ofrecer un consejo nutricional individual.

La nutrición de precisión se basa, principalmente, en los siguientes supuestos: existe variabilidad interindividual en la respuesta a los factores dietéticos; y la personalización de la dieta produce mayores mejoras en el estatus nutricional del individuo que las dietas no personalizadas, generales o universales³³.

La nutrigenómica es un concepto diferente pero necesario en la nutrición de precisión, e implica la caracterización de todos los productos génicos afectados por los nutrientes y sus consecuencias metabólicas. Es decir, las vitaminas no pueden ejercer sus funciones en el organismo sin una serie de enzimas, transportadores, receptores y proteínas de unión que intervienen en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de las mismas. Si se producen polimorfismos en los genes que codifican las proteínas mencionadas, la función correspondiente de las vitaminas puede resultar afectada, produciendo o magnificando enfermedades.

La utilidad de los consejos dietéticos individualizados para anticipar la respuesta del paciente a la ingesta es uno de los principales objetivos de la nutrición de precisión. Para alcanzar este objetivo, además de la genética, se deben tener en cuenta y monitorizar factores como el estilo de vida, la actividad física, la metabolómica o la microbiómica intestinal (**figura 12**)³⁴.

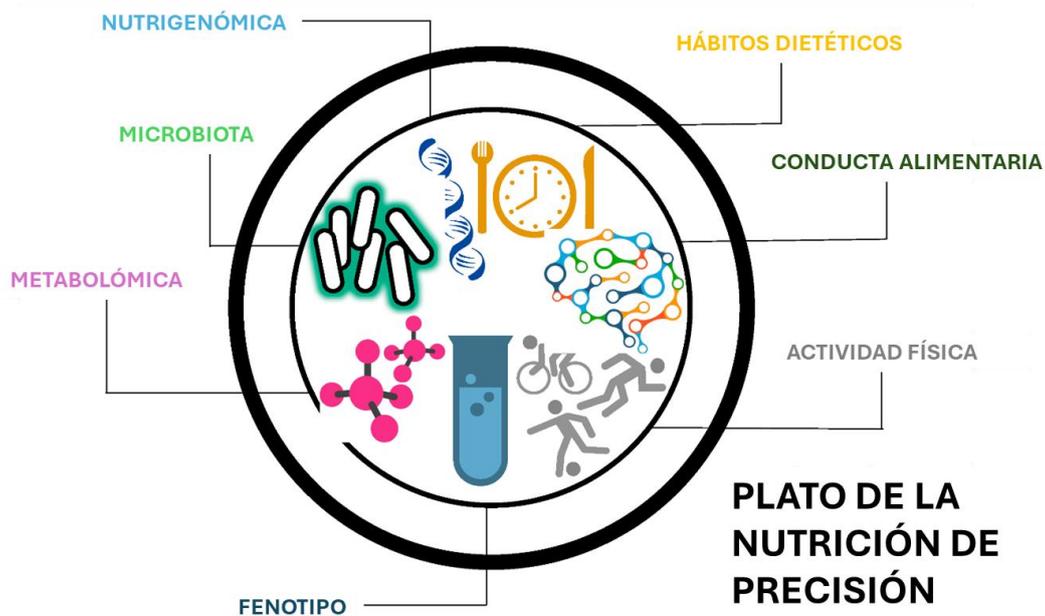


Figura 12. Representación esquemática de los principales factores a tener en cuenta en la nutrición de precisión. Imagen adaptada del artículo Nutrients. 2017 Aug 22;9(8):913. doi: 10.3390/nu9080913³⁴.

La nutrición de precisión se ha utilizado como una herramienta para, entre otras aplicaciones, la prevención o el manejo del síndrome metabólico³⁴, o la reducción del riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer³⁵.



En este proyecto se proponen tres aplicaciones de la medicina de precisión e individualizada utilizando como herramienta la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en el laboratorio clínico: el ajuste de dosificación del fármaco antineoplásico busulfán; la monitorización de tres antivirales, ganciclovir, aciclovir y letermovir, utilizados en pacientes trasplantados como tratamiento y profilaxis para evitar la infección por citomegalovirus; y la adecuación de puntos de decisión de las vitaminas A, B1, B6 y E para mejorar la interpretación del resultado y optimizar la suplementación vitamínica en pacientes complejos.

A continuación, se presentan los tres puntos individualmente en detalle.

G. Ajuste de dosis del fármaco antineoplásico busulfán

El busulfán, 1,4-butanediol (**figura 13**), es un agente bifuncional alquilante del ADN. Es una molécula pequeña y lipófila que se hidroliza en entornos acuosos y libera los grupos metanosulfonato, conduciendo a un ion carbonio reactivo que alquila el ADN. Exactamente, induce la formación de aductos covalentes en el ADN provocando su ruptura, y, con ello, la inhibición de su replicación. Es por tanto un fármaco antineoplásico que afecta a la célula en cualquier fase del ciclo celular.

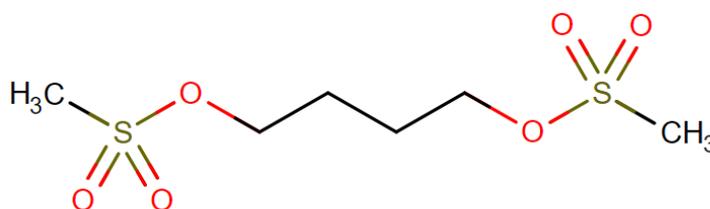


Figura 13. Estructura del fármaco busulfán. Imagen obtenida en la base de datos DRUGBANK online (<https://go.drugbank.com/>).

Se aplicó por primera vez en el tratamiento paliativo de la leucemia mieloide crónica por sus propiedades mielosupresoras y efectos antitumorales. Es especialmente citotóxico para los tejidos proliferantes: en particular, las células de la serie blanca de la médula ósea.

El busulfán se administra por vía intravenosa en el acondicionamiento previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT), en pacientes con enfermedades malignas hematológicas y tumores sólidos y en enfermedades no malignas (enfermedades genéticas) para obtener tanto un efecto antitumoral como mielosupresor³⁶⁻³⁸.

La farmacocinética del busulfán es compleja y no del todo conocida. El busulfán se distribuye a través del torrente sanguíneo libre, unido a proteínas (32%), y en los eritrocitos (47%). La fracción libre puede atravesar la membrana celular de forma pasiva. Dentro de la célula, se metaboliza principalmente a las formas tetrahidrofurano y tetrahidrotiofeno, las cuales interactúan con el ADN y, finalmente, desencadenan la apoptosis de la célula. El tetrahidrotiofeno atraviesa la membrana de los hepatocitos por transporte activo y continúa su ruta de degradación formando metabolitos hidrosolubles que pueden eliminarse de forma renal (**figura 14**)³⁹. Las reacciones adversas comunes asociadas a todos los agentes alquilantes incluyen daños en la mucosa intestinal, alopecia, pancitopenia, anemia, amenorrea, alteración de la espermatogénesis y aumento del riesgo de malignidad. La toxicidad más importante del busulfán es la toxicidad hematológica, que está relacionada estrechamente con la dosis. También la administración a dosis altas se relaciona con náuseas, vómitos, estomatitis, alteraciones en la función hepática, fibrosis pulmonar intersticial, convulsiones (a menudo tónico-clónicas) y enfermedad veno-oclusiva hepática.

La enfermedad veno-oclusiva hepática es un efecto adverso comúnmente asociado al busulfán⁴⁰⁻⁴². Este efecto adverso suele aparecer entre 10 y 20 días después del HSCT. La frecuencia oscila entre el 20% y el 50%, pero la incidencia ha disminuido debido a la mejora de los regímenes terapéuticos. La enfermedad veno-oclusiva hepática suele presentarse con dolor abdominal, sensibilidad hepática e ictericia. Puede causar elevación de enzimas hepáticas e incluso fallo hepático. Dosis superiores a 16 mg/kg exponen al paciente a un mayor riesgo de enfermedad veno-oclusiva hepática (que depende de la dosis).

Se ha documentado extensamente la necesidad de monitorizar el busulfán con el fin de calcular y modificar la dosis del paciente, optimizar la terapia, aumentar la eficacia y reducir su toxicidad^{43,44}. Un ejemplo de ello es la guía clínica europea de 2021 para el trasplante de progenitores hematopoyéticos por alteraciones congénitas de inmunidad ("*EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity*"), en la

que recomiendan la monitorización de busulfán para optimizar la exposición al fármaco⁴⁵. El busulfán cumple ampliamente los criterios para la monitorización: tiene un estrecho margen terapéutico y una elevada variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos^{46,47}.

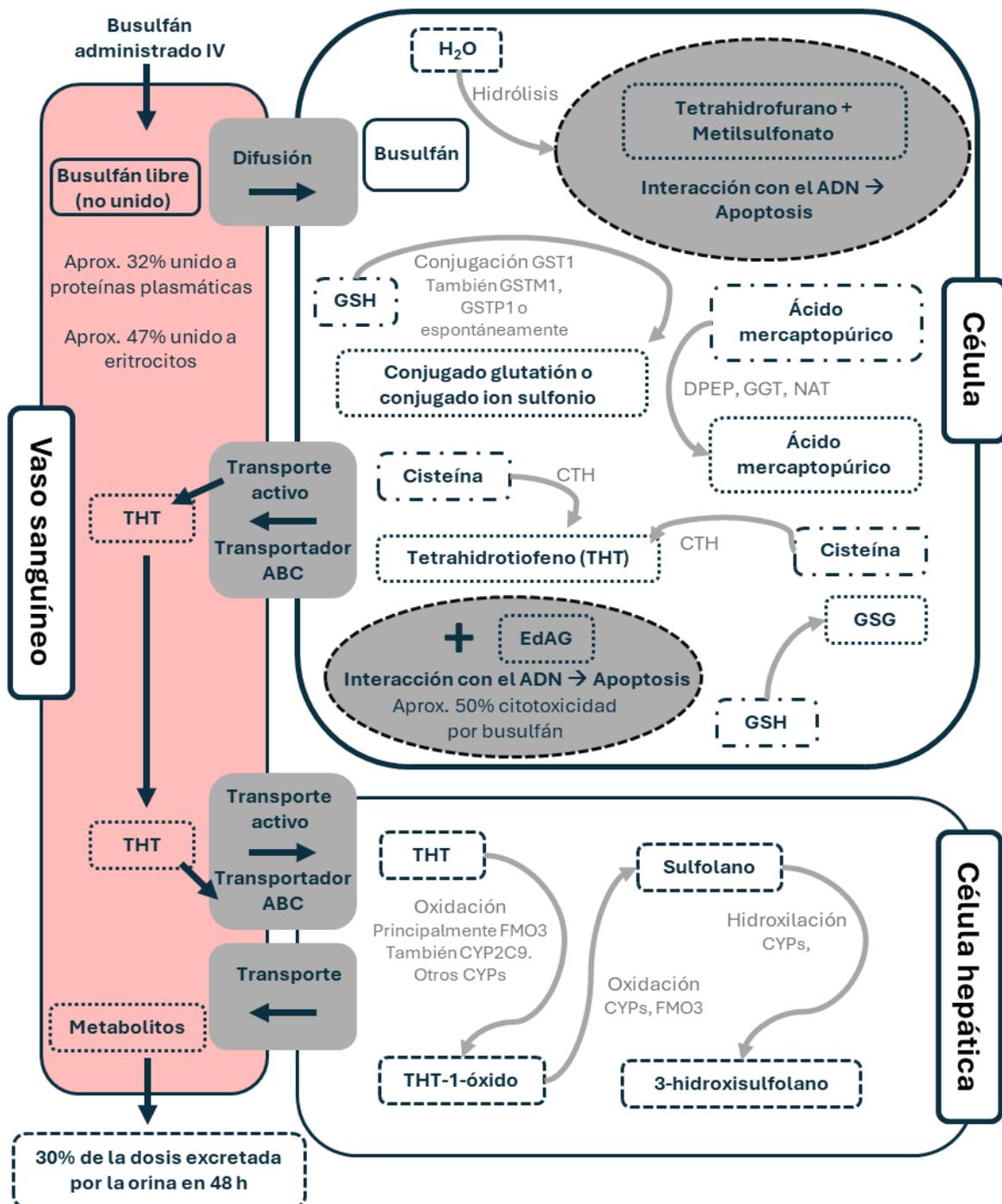


Figura 14. Diagrama que ilustra la distribución, el metabolismo y la eliminación del busulfán intravenoso. ABC, transportador de cassette enlazante a ATP; CTH, cistationina gamma liasa; CYP, citocromo P450; DPEP, dipeptidasa; EdAG, γ -glutamaldehidroalanilglicina; FMO3, monooxigenasa-3 que contiene favina; GGT, gamma-glutamyl transferasa; GSG, glutatión conjugado; GSH, glutatión; GST, glutatión-S-transferasa; NAT, N-acetiltransferasa. Imagen adaptada del artículo Clin Pharmacokinet. 2021 Jan;60(1):17-51. doi: 10.1007/s40262-020-00947-2³⁹.

La exposición a busulfán se estima mediante diferentes índices, a destacar área bajo la curva (*area under curve*, AUC) de la concentración plasmática en función del tiempo en el intervalo de dosificación, AUC en 24 horas y AUC acumulado durante todo el tratamiento⁴⁸. Diferentes estrategias de dosificación guiadas por TDM incluirían la medición del AUC a través de las concentraciones plasmáticas de busulfán, bien durante un intervalo de tiempo definido o bien durante todos los días de tratamiento. En el último caso, que coincidiría con el índice AUC acumulado durante todo el tratamiento, la exposición sistémica a busulfán deseada u objetivo se dividirá entre los días de administración y se calculará como las sumas de las AUC obtenidas cada día, con un mínimo de tres puntos (o concentraciones plasmáticas). Para alcanzar el AUC objetivo y por tanto la exposición a busulfán deseada, se debe modificar la dosis a diario si fuera necesario.

Para seleccionar la dosis inicial de busulfán en pacientes pediátricos, se utilizan nomogramas ajustados por peso en función del tipo de régimen deseado, mieloablativo o no mieloablativo⁴⁹. En la **figura 15** se muestra un ejemplo de estos nomogramas elaborado por Bartelink et al. Una vez establecida la dosificación inicial, la TDM esclarece si se ha alcanzado el objetivo o se ha de modificar la dosis.

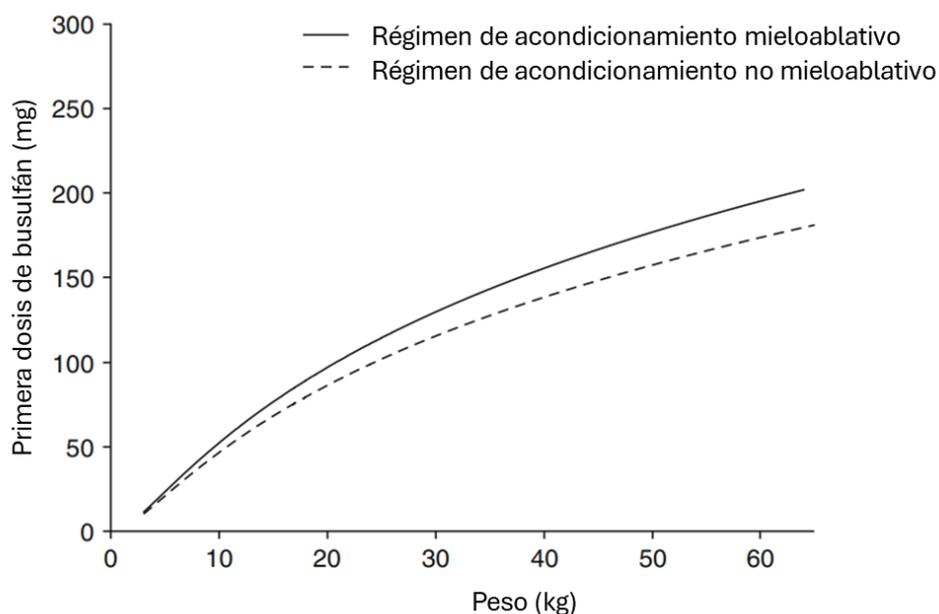


Figura 15. Nomograma de dosificación individualizada de busulfán ajustados por el peso del paciente, para un régimen de acondicionamiento mieloablativo o no mieloablativo⁴⁹.

H. Monitorización de antivirales

El citomegalovirus humano (CMV) es un miembro de la subfamilia Betaherpesvirinae con un genoma de 236-kb. En individuos sanos la infección por CMV suele ser asintomática pero es uno de los patógenos oportunistas más frecuentemente reportados en pacientes inmunodeprimidos, teniendo un gran impacto en los pacientes trasplantados, tanto en receptores de trasplante de órgano sólido (*solid organ transplantation*, SOT)⁵⁰ como de progenitores hematopoyéticos (*hematopoietic stem cell transplantation*, HSCT)⁵¹, produciendo numerosos eventos adversos y llegando a comprometer el injerto. En hospedadores inmunodeprimidos, afecta principalmente al aparato digestivo, los pulmones, el hígado y el sistema nervioso central. La presentación clínica depende de múltiples factores como el tipo de infección, el grado de inmunosupresión o el tipo de trasplante⁵².

H.1. Tratamientos tradicionales del CMV

El ganciclovir (GCV) es un análogo de nucleósido que inhibe la síntesis de ADN viral (**figura 16**). Su profármaco es el valganciclovir (VGCV). A través de la fosforilación intracelular, actúa como inhibidor competitivo de la desoxiguanosina trifosfato para inhibir la síntesis de ADN viral. En las células infectadas por el CMV, el GCV es fosforilado por una enzima con actividad de proteína cinasa, producida por el gen *UL97* del CMV (**figura 17**).

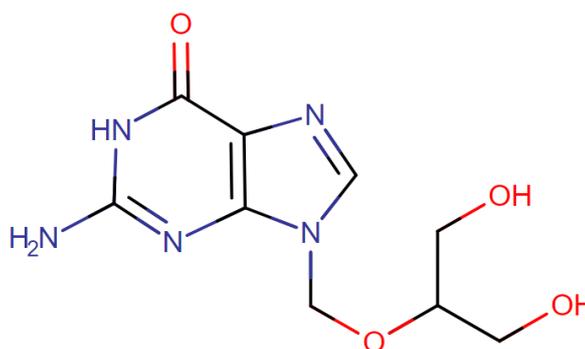


Figura 16. Estructura del ganciclovir. Imagen obtenida en la base de datos DRUGBANK online (<https://go.drugbank.com/>).

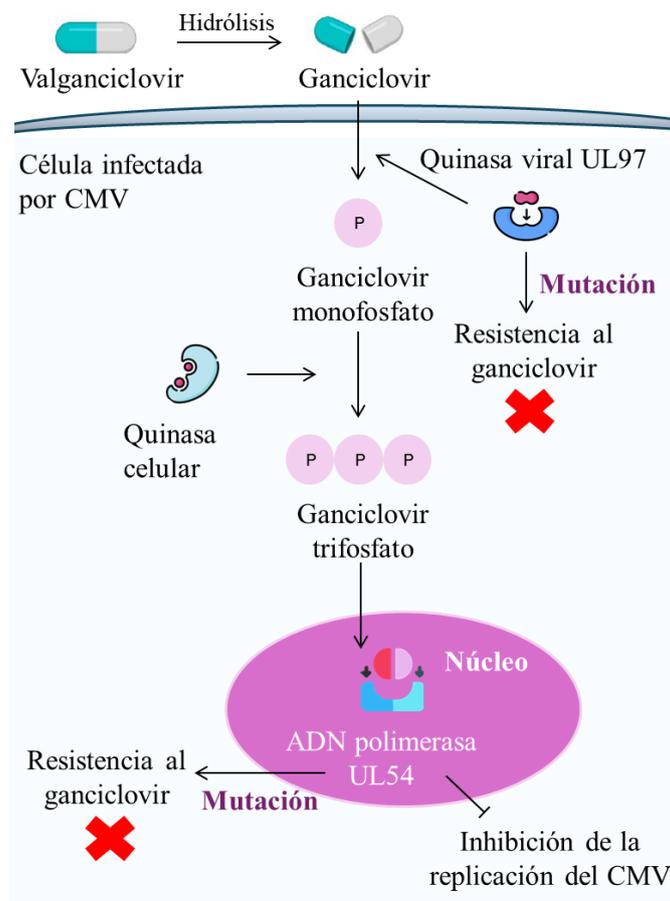


Figura 17. Mecanismo antiviral del ganciclovir. CMV, citomegalovirus. Imagen adaptada del artículo Ther Drug Monit. 2022 Feb 1;44(1):138-147. doi: 10.1097/FTD.0000000000000925⁵³.

La resistencia al GCV se desarrolla como resultado de un cambio conformacional en la cinasa viral UL97 que la hace incapaz de fosforilar el GCV a su forma activa. Así, el gen *UL97* es el más comúnmente mutado en pacientes con enfermedad por CMV (ECMV) resistentes al GCV (se han encontrado con mayor frecuencia las mutaciones M460V, A594V, L595S). También se han identificado mutaciones en pacientes con ECMV en el gen de la ADN polimerasa viral, *UL54* (P522S, N408D, V715M)^{54,55}. De esta manera, se detiene la inhibición en la replicación del virus (**figura 17**). Otros antivirales usados como segunda línea, cidofovir y foscarnet, también inhiben la replicación del CMV interfiriendo con la ADN polimerasa, provocando la interrupción de la síntesis del ADN viral⁵³. Al compartir diana molecular, las mutaciones en *UL54* y *UL97* suelen conferir resistencia a los tres antivirales.

Los efectos adversos hematológicos del GCV son preocupantes. Entre el 7% y el 35% de los receptores de SOT expuestos a GCV experimentan leucopenia, mientras que entre el 3% y el 15% desarrollan neutropenia⁵³. La neutropenia se produce al principio del tratamiento, es limitada por la dosis y reversible con la interrupción del fármaco; sin embargo, puede asociarse a infección y muerte. Las complicaciones hematológicas relacionadas con el tratamiento con GCV se ven agravadas por muchos factores adicionales que son frecuentes tras un trasplante. Por lo tanto, el desarrollo de resistencias y la toxicidad relacionada justifican la TDM (no generalizada, sino individualizada) de GCV⁵⁶.

El aciclovir (ACV), o 9-(2-hidroxietoximetil) guanina (**figura 18**), es un análogo de la guanosina que se fosforila hasta en tres ocasiones para ejercer su función antiviral. Su mecanismo de acción es prácticamente idéntico al GCV. Tras su entrada en las células infectadas, el primer paso de fosforilación lo realiza la timidina cinasa codificada por el virus. A este paso le siguen dos fosforilaciones sucesivas llevadas a cabo por la guanilato cinasa celular del huésped y la difosfato cinasa nucleósida. El ACV-trifosfato puede servir como sustrato de la reacción de la ADN polimerasa viral y, por tanto, incorporarse al ADN en su extremo 3'. La unión del siguiente desoxinucleósido 5'-trifosfato al cebador conduce a la formación de un complejo de extremo inservible. El ACV-trifosfato no posee un grupo hidroxilo en la posición 3', por lo que es un terminador obligado de la cadena de ADN. In vitro, el ACV ha mostrado ser más potente para el virus herpes simple 1 y 2, o los virus varicela-zóster y Epstein–Barr, que para el CMV⁵⁷.

El ACV tiene un buen perfil de seguridad y se relaciona con baja toxicidad⁵⁸. En los casos de toxicidad reportados, el tratamiento con ACV se ha relacionado con neurotoxicidad y nefrotoxicidad^{59,60}.

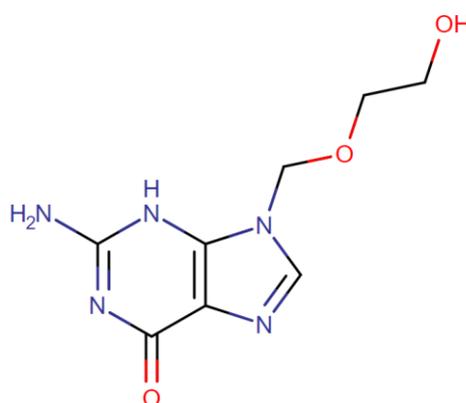


Figura 18. Estructura del aciclovir. Imagen obtenida en la base de datos DRUGBANK online (<https://go.drugbank.com/>).

Según las fichas técnicas elaboradas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), para ambos antivirales, GCV y ACV, la biodisponibilidad es baja y deben administrarse mediante sus respectivos profármacos, VGCV y valaciclovir (VACV). En sangre, su unión a proteínas es baja. Su metabolismo es reducido, sobre todo en el caso del GCV. El ACV se convierte en pequeña medida en los metabolitos 9-carboximetoxi-metilguanina por alcohol y aldehído deshidrogenasa y a 8-hidroxi-aciclovir por la aldehído oxidasa. Finalmente, ambos se excretan renalmente (se excreta la molécula prácticamente intacta debido a su reducido metabolismo).

La inmunoglobulina CMV y los antivirales arriba mencionados ACV, VACV, GCV y VGCV han sido utilizados en receptores de SOT, con una duración y posología variables, como tratamiento preventivo de la ECMV^{61,62}. Mientras que el GCV administrado mediante perfusión intravenosa ha sido el tratamiento de referencia de la ECMV en pacientes con SOT; el ACV se ha propuesto para el tratamiento de la ECMV en pacientes con HSCT, así como otros virus. Ambos pueden producir neutropenia y toxicidad renal^{59,63,64}.

La incidencia de enfermedad por CMV ha disminuido en los últimos años debido al mayor conocimiento de la infección y las numerosas estrategias que se han establecido para su prevención y tratamiento. Según una revisión sistemática realizada en diferentes países de Asia, el Pacífico y Sur América, no hay una única opción preventiva para la infección por CMV. A modo de resumen, se utiliza la profilaxis en el 45,0–58,7% de los pacientes, mientras que la terapia preventiva (monitorización de la carga viral del CMV) se aplica en el 41,3–56,3%⁶⁵. El tratamiento convencional de primera línea para la prevención del CMV consiste en GCV intravenoso o VGCV oral en receptores de SOT, con una duración del tratamiento que puede oscilar entre 2 y 3 semanas. En algunos países se utilizan tratamientos alternativos como ACV y su profármaco para prevenir la aparición de CMV. En los receptores de SOT que desarrollaron la enfermedad por CMV, el tratamiento de elección fue el GCV intravenoso⁶⁵. La profilaxis universal conduce a un sobretratamiento y, por tanto, a toxicidad farmacológica, y se asocia a una mayor incidencia de la enfermedad de aparición tardía, probablemente al impedir desarrollar inmunidad protectora de la enfermedad. A su vez, las terapias antivirales preventivas también se asocian a sobreexposición a fármacos antivirales y toxicidad, ya que una parte de los episodios de infección activa por CMV que se tratan probablemente se habrían resuelto sin necesidad de tratamiento⁶⁶.

La monitorización de fármacos presenta un gran potencial para mejorar la relación riesgo/beneficio: permite relacionar concentraciones y efectos secundarios, optimizar el régimen de dosificación y mitigar el riesgo de eventos inducidos por ACV o GCV^{53,67–70}.

H.2. Nuevas estrategias terapéuticas

Después de años sin autorizar nuevos fármacos anti-CMV, en los últimos años se han aprobado dos nuevos antivirales para la prevención o el tratamiento del CMV: letermovir (LTV) y maribavir (MBV). En este estudio, nos centraremos en el LTV, por ser más frecuentemente utilizado en nuestro entorno sanitario. El LTV (**figura 19**) es el primer fármaco antiviral autorizado para la profilaxis del CMV, que ha demostrado ser muy eficaz en la reducción de la incidencia de infecciones y de la enfermedad por CMV, junto con un buen perfil de seguridad. Los resultados de diferentes estudios han mostrado que el LTV reduce significativamente tanto los eventos relacionados con el CMV, como la mortalidad por todas las causas, y la mortalidad sin recaída⁷¹.

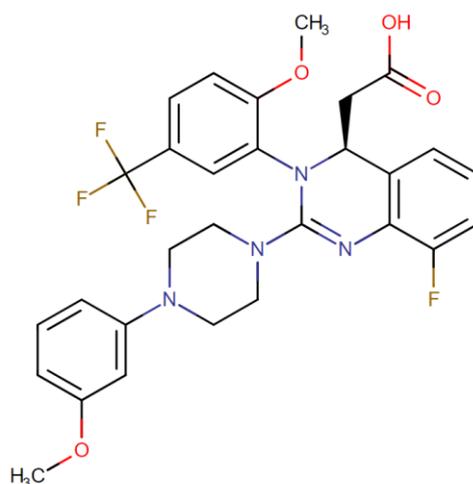


Figura 19. Estructura del letermovir. Imagen obtenida en la base de datos DRUGBANK online (<https://go.drugbank.com/>).

A diferencia de otros fármacos contra el CMV, el LTV no produce toxicidad hematológica ni nefrotoxicidad. Como la diana del LTV es el complejo terminasa viral en lugar de la ADN polimerasa viral, conserva su actividad frente a virus resistentes a otros fármacos anti-CMV. Inhibe la replicación del CMV en el complejo de la ADN terminasa del CMV, que es necesario para el procesamiento y empaquetamiento del ADN viral, afectando a la producción del genoma y alterando la maduración del virión (**figura 20**)⁷². Este complejo terminasa parece ser muy específico del CMV y presenta una elevada actividad frente a cepas resistentes a los inhibidores de la ADN polimerasa. Por otro lado, la resistencia natural al LTV sigue siendo rara. El período de profilaxis recomendado actualmente para el tratamiento con LTV es de 100 días⁷³.

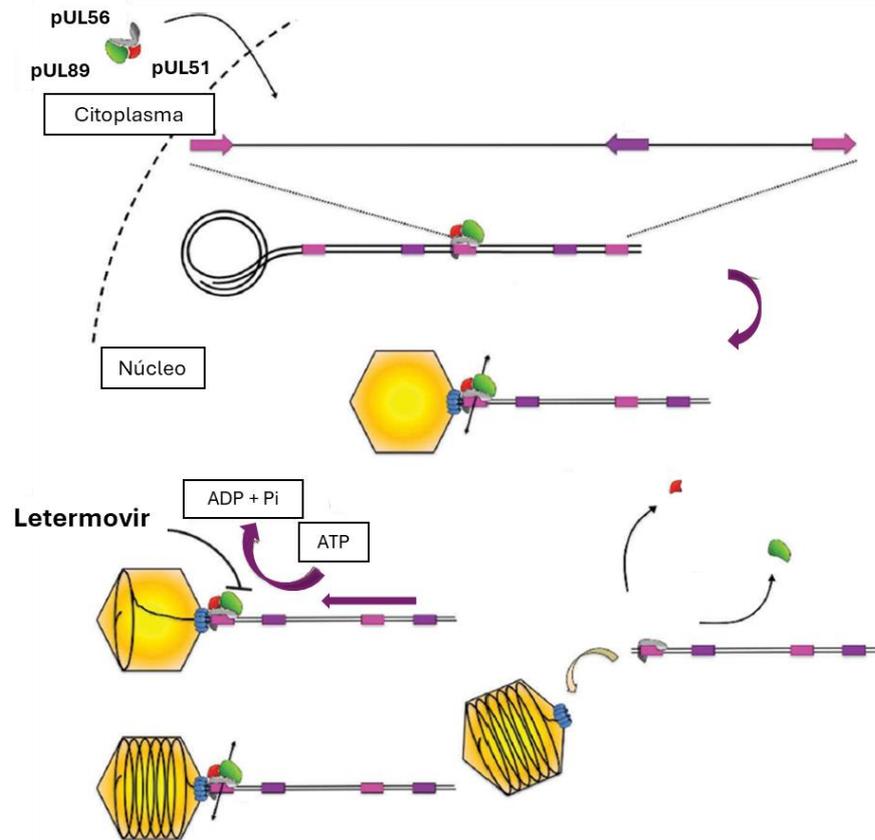


Figura 20. Empaquetamiento del complejo terminasa del citomegalovirus y mecanismo de acción del letermovir. Imagen adaptada del artículo Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2018 Dec;14(12):1197-1207. doi: 10.1080/17425255.2018.1550485⁷⁴.

Según la ficha técnica del fármaco, el LTV está indicado “para la profilaxis de la reactivación del CMV y de la enfermedad causada por este virus en adultos seropositivos para el CMV [R+] receptores de un HSCT; así como para la profilaxis de la enfermedad por CMV en adultos CMV-seronegativos que han recibido un trasplante de riñón de un donante CMV-seropositivo [D+/R-]” (https://cima.aemps.es/cima/dochtml/ft/1171245004/FT_1171245004.html). Se puede administrar por vía oral o intravenosa una dosis de 480 mg por día (o 240 mg por día en pacientes que toman ciclosporina A)^{75,76}.

La experiencia real en pacientes que han recibido profilaxis con LTV es prometedora⁷⁷⁻⁷⁹, aunque la información disponible sobre su farmacocinética, toxicidad o interacción con otros fármacos actualmente es limitada. Este punto es de suma importancia, ya que el letermovir es un inductor moderado de enzimas y transportadores dando lugar tanto a reducciones como a incrementos de las concentraciones plasmáticas de medicamentos administrados concomitantemente⁸⁰⁻⁸². A destacar, es inhibidor de CYP3A *in vivo*, a través del cual se metabolizan inmunosupresores como la ciclosporina, el tacrolimus, y el sirolimus; es inhibidor de los transportadores OATP1B1/3, afectando por ejemplo

a los inhibidores de la HMG-CoA reductasa; e inductor de CYP2C19, del cual es sustrato el antifúngico voriconazol. Según la ficha técnica del fármaco, no se ha estudiado la interacción con otros antimicrobianos ampliamente usados en pacientes trasplantados como piperacilina/tazobactam, amfotericina B y micafungina. Además, existe bibliografía reducida sobre la seguridad y eficacia de letermovir en pacientes pediátricos.

En el Hospital Universitario Vall d'Hebron, fue aprobado en 2023 para la profilaxis frente a CMV exclusivamente en receptores de HSCT.

La monitorización de estos fármacos antivirales sigue siendo controvertida, y se ha utilizado para optimizar las dosis sólo en situaciones específicas⁸³⁻⁸⁷. Mientras que la guía americana sobre infección por CMV en trasplantados de órgano sólido "*Cytomegalovirus in Solid Organ Transplant Recipients - Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Disease Community of Practice*"⁸⁸ no recomienda la monitorización de GCV de forma sistemática a todos los pacientes, la guía internacional "*The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation*"⁸⁹ y la guía europea para el manejo de CMV en HSCT "*Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7)*"⁶², no se han pronunciado sobre ello.

I. Suplementación de vitaminas hidro y liposolubles

Las vitaminas y los oligoelementos se conocen como micronutrientes y deben aportarse en la dieta. El organismo sólo necesita pequeñas cantidades diarias de ambos, pero son esenciales para el metabolismo y los procesos fisiológicos. Se puede deducir de ello que necesitan un estricto control, especialmente en pacientes con necesidades nutricionales especiales. Un ejemplo del manejo de los micronutrientes como terapia y tratamiento son los pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI). La heterogeneidad de tales pacientes complica la terapia nutricional generalizada; de modo que la monitorización y suplementación con vitaminas y oligoelementos si procede es un importante punto a tener en cuenta (**figura 21**).

Muchos factores como la enfermedad primaria, las comorbilidades o los requerimientos específicos en la fase aguda de la enfermedad se han de tener en cuenta e individualizar la terapia siempre que sea posible⁹⁰. Por ejemplo, en un paciente con una malnutrición preexistente o enfermedad gastrointestinal se habrían de monitorizar los micronutrientes y suplementar en caso de deficiencias.

Pacientes de la unidad de traumatología, quemados o con enfermedad pulmonar no requieren una monitorización de micronutrientes a priori, a no ser que existan síntomas clínicos o haya una sospecha de deficiencia. En cambio, a modo general, sí se recomienda la monitorización y suplementación de micronutrientes en nutriciones parenterales (**figura 21**)⁹⁰.

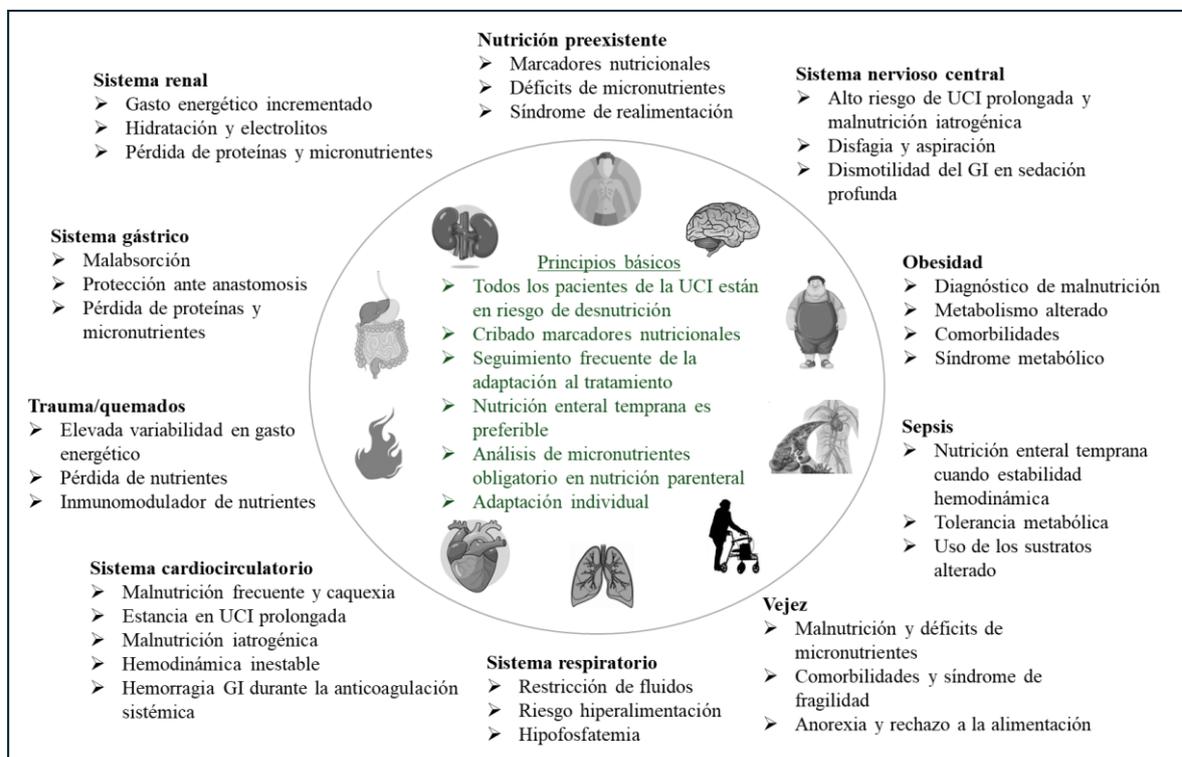


Figura 21. Resumen de la terapia nutricional en diferentes grupos de pacientes. GI, gastrointestinal; UCI, unidad de cuidados intensivos. Imagen adaptada del artículo Nutrients. 2021 Aug 19;13(8):2851. doi: 10.3390/nu13082851⁹⁰.

En este trabajo, se pondrá el foco en las vitaminas. Las vitaminas son un grupo de compuestos orgánicos esenciales para las funciones fisiológicas del organismo. A pesar de sus diferentes estructuras y características físico-químicas, las vitaminas comparten características comunes, a destacar: (1) La mayoría de las vitaminas en la naturaleza se sintetizan a partir de aminoácidos; (2) Aunque su función clave es la regulación del metabolismo, no son componentes de la célula ni producen energía; (3) Excepto la vitamina D, la mayoría de las vitaminas no pueden ser sintetizadas ni producidas en cantidad suficiente por el cuerpo humano, por lo que normalmente deben ser aportadas en los alimentos; (4) El cuerpo humano sólo necesita una pequeña cantidad de vitamina medida en miligramos o incluso microgramos³³. Intervienen en los procesos celulares y están relacionadas con el desarrollo o la prevención de enfermedades malignas⁹¹.

- Algunos autores han analizado el papel de diferentes vitaminas en la oncogénesis. En el artículo de Venturelli *et al.* se observó una asociación entre las concentraciones de vitaminas

en sangre y tejidos y el riesgo de padecer cáncer; además, se recomendó la monitorización como biomarcador en la detección precoz del cáncer⁹².

- La demencia es un síndrome de deterioro cognitivo que limita progresivamente las actividades de la vida diaria. Gil Martínez *et al.* realizaron en 2022 una revisión sistemática en la que evaluaron la eficacia del uso de suplementos vitamínicos en la dieta no sólo para prevenir las deficiencias nutricionales sino también la demencia y el deterioro cognitivo leve. Concluyeron que la suplementación con vitaminas C o ácido ascórbico, ácido fólico y vitamina B1 mejoraban el rendimiento cognitivo⁹³.
- La deficiencia de vitamina A se ha asociado a una mayor susceptibilidad a las infecciones. Se ha estudiado la suplementación con vitamina A para proteger a los pacientes frente a las infecciones víricas. Aunque los hallazgos no han sido estadísticamente significativos, se describieron resultados esperanzadores para el tratamiento de algunas enfermedades víricas con suplementos de vitamina A⁹⁴.

I.1. Vitaminas liposolubles A y E

Las vitaminas A y E son vitaminas liposolubles que desempeñan papeles cruciales en varios procesos fisiológicos.

El principal efecto de la vitamina A en la bioquímica celular se debe a los procesos de replicación y transcripción, aunque también puede modular la expresión celular global (**figura 22**)⁹². Además, la vitamina A modifica la expresión genética a nivel epigenético modulando la histona acetiltransferasa pCAF. En su forma de 11-cis-retinal, se asocia a la proteína opsina, formando la rodopsina, que es el pigmento necesario para la percepción de la luz⁹⁵. También interviene en la glicosilación de las proteínas, en la modulación de aspectos importantes del ciclo celular y la adhesión célula-célula, y en la estabilidad de las membranas biológicas⁹².

La vitamina E, así como la mayoría de los minerales, afecta a la bioquímica celular principalmente alterando el estado oxidativo de las células (**figura 22**). También puede modular la expresión de los genes. Las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) pueden dañar el ADN, fomentando la oncogénesis, pero también pueden influir en el control epigenético de la expresión genética induciendo la hipometilación⁹². Además, la vitamina E tiene efectos preventivos sobre la oxidación de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados, ayuda a mantener la integridad de la

membrana celular, previene la agregación plaquetaria, aumenta la estabilidad de la membrana eritrocitaria y favorece la síntesis de glóbulos rojos⁹⁶.

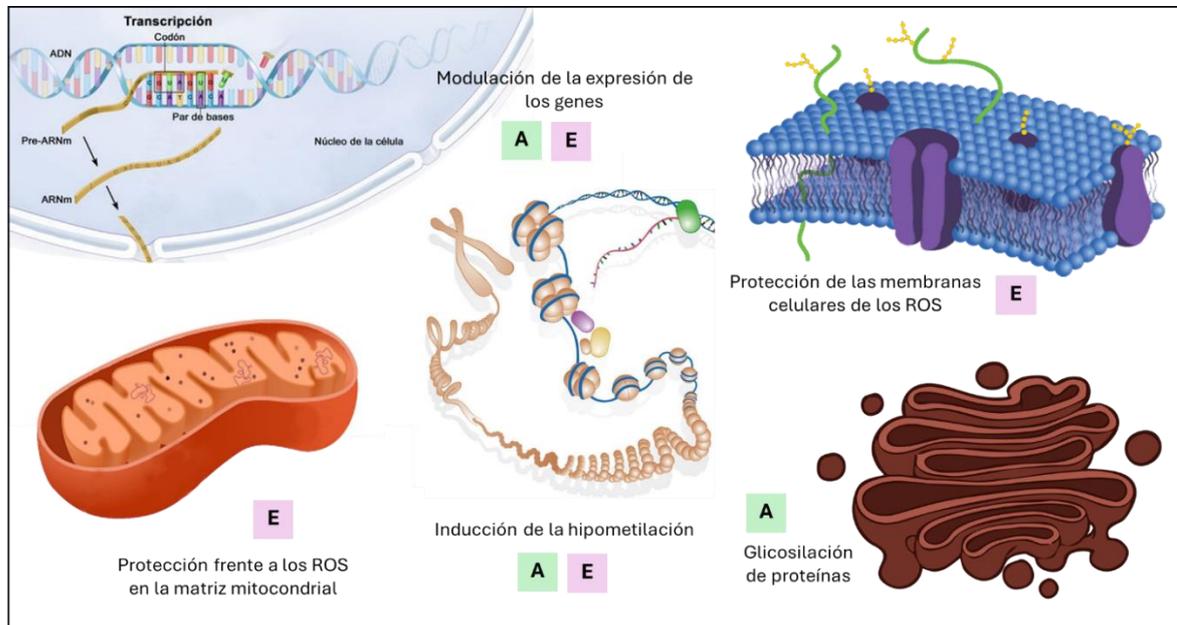


Figura 22. Resumen de las funciones de las vitaminas A y E con mayor impacto en la bioquímica de la célula. ROS, especies reactivas de oxígeno. Imagen adaptada del artículo Nutrients. 2021 Nov 1;13(11):3914. doi: 10.3390/nu13113914⁹².

El déficit de vitamina A provoca síntomas oftalmológicos como ceguera nocturna y xeroftalmia⁹⁷; el déficit de vitamina E se asocia a síntomas neurológicos como ataxia, neuropatía periférica y debilidad muscular⁹⁸.

1.2. Vitaminas hidrosolubles B1 y B6

Las vitaminas B1 y B6 son vitaminas hidrosolubles y coenzimas que desempeñan funciones fundamentales en los procesos metabólicos.

La vitamina B6 tiene un papel crucial en la síntesis de los neurotransmisores dopamina y serotonina; participa en el metabolismo de la homocisteína, favoreciendo su eliminación; e indirectamente participa en los ciclos de la metionina y del ácido cítrico (**figura 23**)⁹⁹.

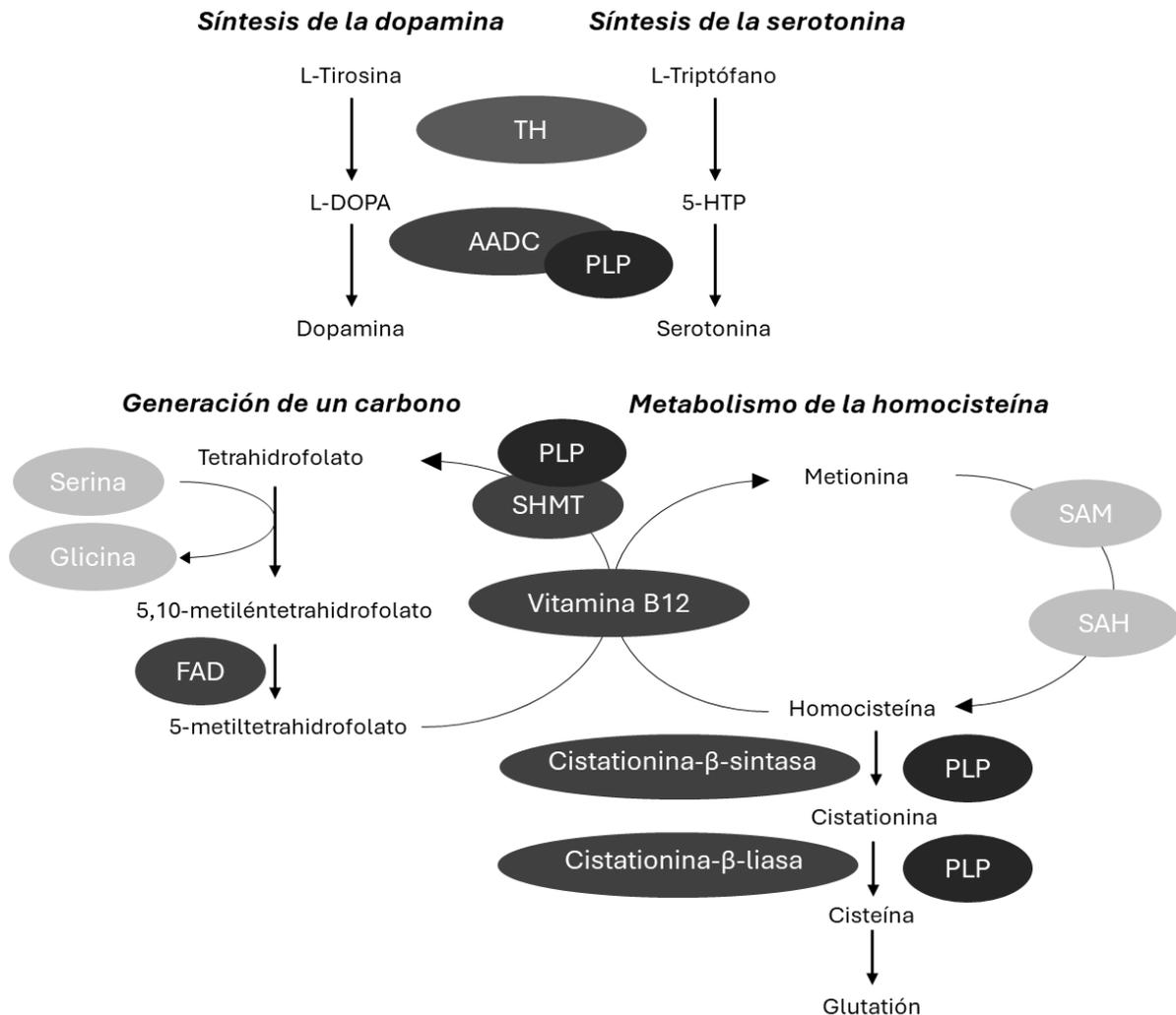


Figura 23. Mecanismo de acción de la vitamina B6 (PLP en la imagen). AADC, L-aminoácido aromático descarboxilasa; FAD, dinucleótido de flavina y adenina; 5-HTP, 5-hidroxitriptófano; L-DOPA, L-dopamina; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; SHMT, serina hidroximetil transferasa; TH, tirosina hidroxilasa. Imagen adaptada del artículo CNS Neurosci Ther. 2020 Jan;26(1):5-13. doi: 10.1111/cns.13207⁹⁹.

En cuanto a las funciones de la vitamina B1, también están íntimamente relacionadas con el metabolismo celular. Las vías centrales del metabolismo de los carbohidratos implican enzimas como la transcetolasa, la piruvato deshidrogenasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa dependientes de la vitamina B1 en forma de pirofosfato de tiamina (*thiamine pyrophosphate*, TPP) (**figura 24**). El TPP participa como cofactor en el ciclo de las pentosas fosfato, en la formación de acetil-coA a partir de piruvato y en el ciclo del ácido cítrico¹⁰⁰.

El déficit de vitamina B1 puede provocar complicaciones neurológicas y cardiovasculares graves¹⁰¹; el de vitamina B6 produce anemia microcítica y refractaria al hierro, así como trastornos neurológicos¹⁰².

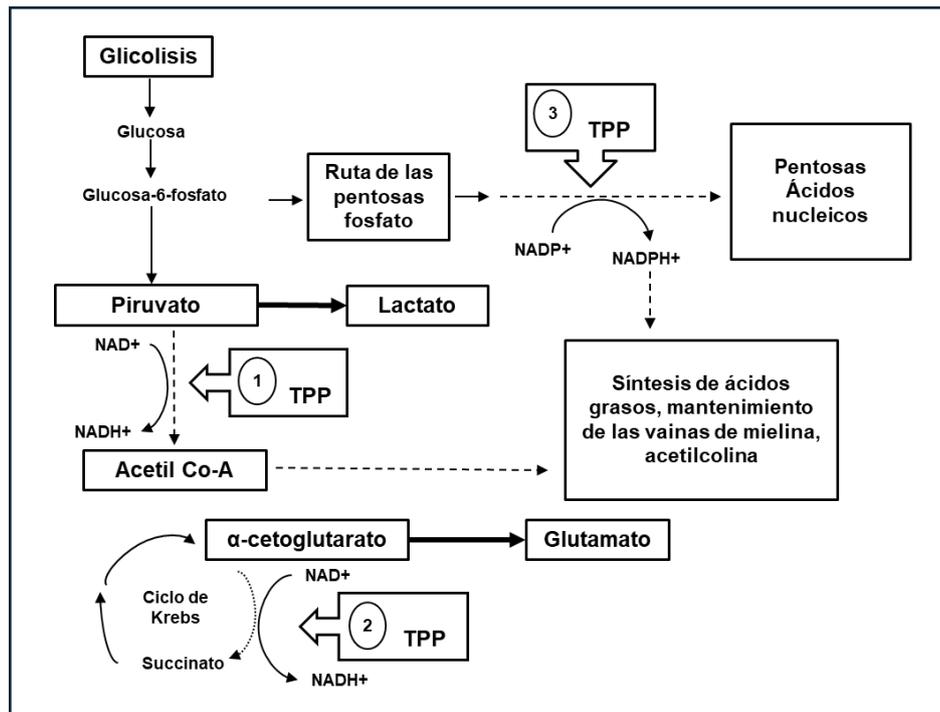


Figura 24. Mecanismo de acción de la vitamina B1 (TPP en la imagen). Imagen adaptada del artículo Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 39(5), 503–520. doi:10.1177/0148607114565245¹⁰³.

En resumen, las vitaminas participan en numerosos procesos metabólicos imprescindibles en el funcionamiento del organismo. Tanto su deficiencia como su exceso en el organismo se relaciona con importante sintomatología que perjudica la salud del paciente. Es necesario monitorizar las concentraciones de vitaminas hidro- y liposolubles para detectar carencias y excesos, y orientar la administración de suplementos¹⁰⁴.

Algunos laboratorios clínicos determinan junto a las vitaminas otros compuestos relacionados, así como cocientes que ayudan a corregir sesgos y evitar errores postanalíticos que enmascaren una hipo o hipervitaminosis. Por ejemplo, se utilizan en la medida de las concentraciones de las vitaminas E y B1.

En cuanto a la vitamina E, existe una importante correlación con la concentración de lípidos transportados por las lipoproteínas quilomicrones, de muy baja densidad (*very-low-density lipoprotein*, VLDL) y de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL) (colesterol y triglicéridos). Esta afirmación es fácilmente deducible si se analiza el transporte y la distribución de la vitamina E en el organismo (**figura 25**). La vitamina E forma quilomicrones con colesterol, fosfolípidos y triacilglicerol, y circulan por el sistema linfático con destino a la sangre; una vez en el hígado, es absorbido por la lipoproteína VLDL y liberada al torrente sanguíneo¹⁰⁵. De este modo, la vitamina E

sérica que se medirá en el laboratorio está estrechamente unida a las concentraciones de lipoproteínas y, en consecuencia, de los lípidos que éstas transportan. Tanto es así que a menudo los niveles séricos de vitamina E se expresan como un cociente entre el colesterol, los triglicéridos o la suma de ambos. El cálculo de dichos cocientes junto al resultado de la concentración de vitamina E sérica podría beneficiar a personas con metabolismo lipídico alterado, mejorando la interpretación del resultado^{106,107}.

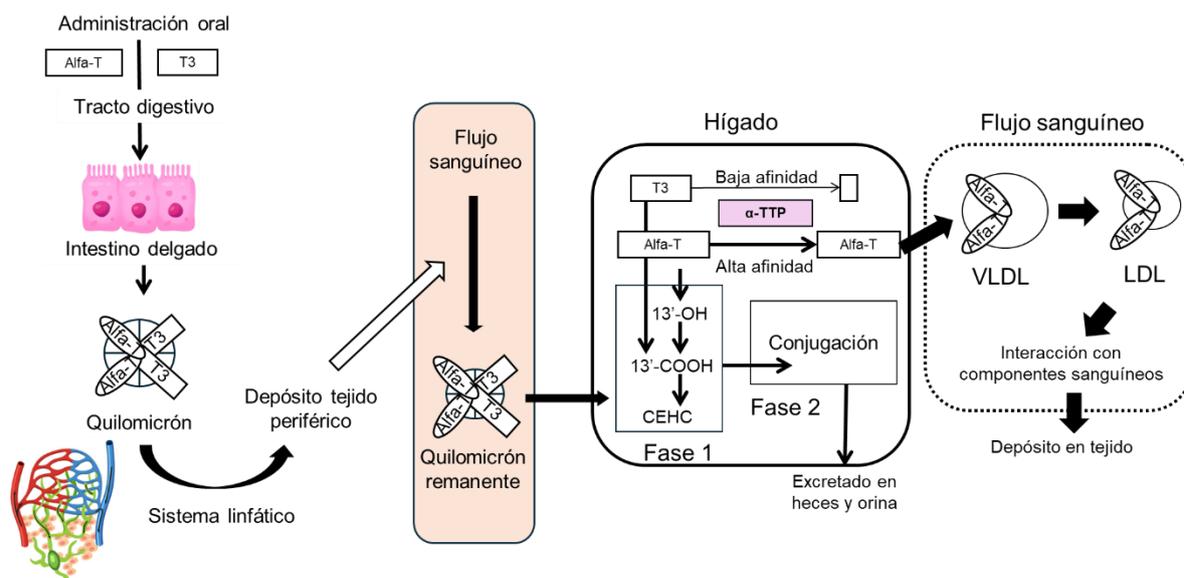


Figura 25. Absorción, transporte, metabolismo y excreción de la vitamina E. Alfa-T, alfa-tocoferol; CEHC, carboxietilhidroxicromanol; 13'-COOH, 13'-carboxicromanol (del alfa-T) o 13'-carboxitrienol (del tocotrienol); LDL, lipoproteína de baja densidad; 13'-OH, 13'-hidroxicromanol; T3, tocotrienol; α -TTP, proteína de transferencia de alfa-tocoferol; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad. Imagen adaptada del artículo IUBMB Life. 2019 Apr;71(4):430-441. doi: 10.1002/iub.2008¹⁰⁵.

Por otro lado, aproximadamente el 90% del contenido total de tiamina se encuentra en los eritrocitos en la forma biológicamente activa, TPP¹⁰³. Dado que la TPP está presente predominantemente en los eritrocitos, las concentraciones de TPP muestran una mejor concordancia cuando se corrigen por hemoglobina. Por lo tanto, sería más apropiado acompañar la medida de TPP con la estimación de la hemoglobina para corregir cualquier variación en el volumen celular¹⁰⁸.

I.3. Teoría de los valores de referencia

La superposición de síntomas con otras morbilidades complica el diagnóstico de hipo e hipervitaminosis, por lo que es necesario establecer valores de referencia (o de normalidad, VR) de vitaminas para evaluar el estado nutricional. Establecer unos VR adecuados de vitaminas resulta crucial para alcanzar un estatus nutricional óptimo.

Los VR desempeñan un papel muy importante en el diagnóstico de los pacientes, el seguimiento, el tratamiento y la adición de pruebas suplementarias posteriores. Se calcula que hasta el 70% de las decisiones clínicas se basan en resultados de laboratorio, por lo que los VR desempeñan un papel clave en el manejo de los pacientes¹⁰⁹. Los especialistas de laboratorio son los responsables de proporcionar VR robustos que permitan un uso óptimo de las pruebas de laboratorio. Sin embargo, este requisito es prácticamente imposible para la mayoría de los laboratorios clínicos^{110,111}.

Para superar este problema, los VR utilizados en el laboratorio clínico se adoptan habitualmente a partir de los VR propuestos por los fabricantes¹¹². Otras opciones empleadas consisten en adoptar VR de otros laboratorios o de artículos publicados con poblaciones similares. Estas opciones son sencillas, coste-efectivas y asequibles para un laboratorio clínico. Sin embargo, pueden no ser apropiadas y conducir a diagnósticos erróneos debido a las diferencias en la población de referencia utilizada para su cálculo, los métodos analíticos empleados o el enfoque estadístico. Si los VR se adoptan de una fuente ajena, se deberían verificar en nuestra población. Alternativamente, pueden ser calculados por el laboratorio clínico por métodos directos, aquellos basados en la selección de una muestra representativa de la población sana (sujetos de referencia)¹¹³; o por métodos indirectos, en los cuales se necesitan grandes volúmenes de datos de análisis rutinarios de individuos presumiblemente sanos del sistema de informático del laboratorio (SIL)¹¹⁴.

El enfoque directo implica un mínimo de 120 individuos sanos por magnitud, de modo que la muestra sea suficientemente representativa de la población general y se eliminen posibles sesgos. Si se requieren múltiples particiones (subgrupos de pacientes según edad, sexo, raza, etc.), se necesitarán al menos 120 datos para cada subconjunto de población¹¹⁵. Posteriormente, el tratamiento estadístico de estos datos es sencillo y los VR se definen como el 95% central de los datos. De acuerdo a esta definición, comúnmente se utilizan los percentiles 2,5 y 97,5 para definir los límites inferior y superior del intervalo de referencia, como muestra la **figura 26**. Algunas magnitudes no se ajustan a esta definición, como aquellas en las que únicamente un lado de la distribución es clínicamente significativo (por ejemplo las enzimas hepáticas) o las que requieren de una mayor especificidad y utilizan percentiles más extremos (por ejemplo la troponina cardiaca)¹¹⁶.

El enfoque directo presenta limitaciones conocidas; a destacar, se necesita realizar un cuestionario a los voluntarios del estudio, informarlos y solicitarles que firmen el consentimiento informado (deben ser individuos sanos bien definidos), requiere mucho tiempo y una inversión económica moderada.

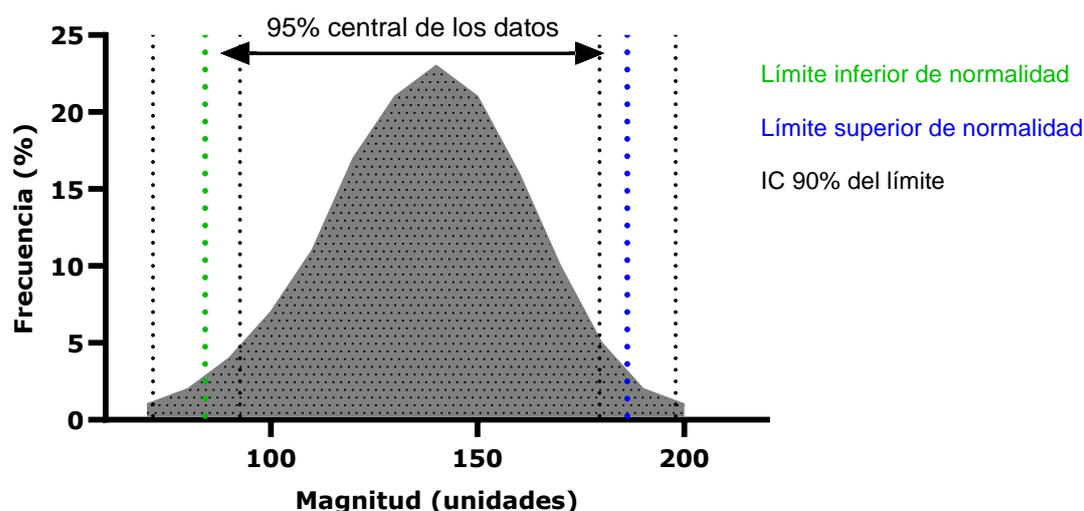


Figura 26. Histograma de una magnitud ficticia del laboratorio, que presentaría una distribución normal de los datos. Se representan los valores de referencia para dicha magnitud, definidos por los límites inferior y superior de normalidad, junto al intervalo de confianza al 90% (IC 90%) de ambos.

Como alternativa, el *big data* (métodos indirectos) utiliza enormes cantidades de datos procedentes de análisis rutinarios de pacientes. Estos métodos eliminan los resultados patológicos seleccionando a priori sujetos sanos, por ejemplo, pacientes de centros ambulatorios, y realizando una limpieza o filtrado de datos y una estadística más compleja que permita obtener una muestra sana¹¹⁷. El enfoque indirecto tampoco carece de limitaciones^{118,119}. La primera y principal de ellas, no existen guías oficiales, no hay estandarización ni consenso en este enfoque. Además, no se han definido parámetros estadísticos tan importantes como el tamaño mínimo muestral necesario o la forma más adecuada para detectar y excluir valores aberrantes. Finalmente, puede producirse un sesgo en los resultados debido a la selección inadecuada de individuos.

La elección entre ambas metodologías, o la decisión de adoptar VR del fabricante, de publicaciones, o puntos de corte reconocidos por sociedades científicas dependerá de cada laboratorio y, sobre todo, de cada magnitud.

Para el caso particular de las vitaminas, los VR son una poderosa herramienta para el cribado poblacional, el diagnóstico, la monitorización y la toma de decisiones para la suplementación en pacientes crónicos, polimórbidos y complejos. Diferentes guías clínicas en nutrición recomiendan medir las concentraciones de vitaminas y ajustar la suplementación de los pacientes en función de los intervalos de referencia del laboratorio. Por ejemplo, las concentraciones séricas de vitaminas liposolubles A y E se han de monitorizar en pacientes con fibrosis quística, que suelen tener un mecanismo de absorción rápida alterado, incluso cuando las reservas pancreáticas son adecuadas¹²⁰. En adultos con enfermedad renal crónica estadio 5D en hemodiálisis de mantenimiento o diálisis

peritoneal que toman suplementos, deben controlarse las concentraciones séricas de vitaminas A/E para prevenir toxicidad¹²¹. Otro ejemplo es la prevalencia de la deficiencia de vitamina B1; en hasta un 49% de pacientes postcirugía bariátrica. El seguimiento de dichos pacientes que presenten síntomas o factores de riesgo debe incluir la medición de vitamina B1 durante los primeros 6 meses y luego cada 3–6 meses, independientemente del procedimiento bariátrico¹²². Las concentraciones séricas de vitaminas también deben medirse al inicio de la nutrición parenteral domiciliaria en pacientes con insuficiencia intestinal crónica y después anualmente para ajustar las dosis si es necesario. En estos pacientes suelen encontrarse únicamente hallazgos subclínicos, pero es necesario tratarlos para corregir los niveles subóptimos¹²³. Tanto la deficiencia de vitamina B6 como la ingesta elevada se han descrito como factores de riesgo en el desarrollo de neuropatía periférica. La monitorización de las concentraciones de vitamina B6 puede ayudar a determinar si existe un efecto directo de las concentraciones séricas de B6 en la neuropatía periférica¹²⁴.

HIPÓTESIS

La variación intraindividual conduce a que el cálculo de la dosis de un fármaco o vitamina no siempre produzca la concentración plasmática prevista, lo que puede implicar que se esté suministrando una dosis con menor efecto terapéutico o tóxica. Por otra parte, la administración concomitante de fármacos y suplementos puede provocar interacciones imprevistas que afecten a la concentración plasmática de los fármacos. Todo ello nos indica la importancia de profundizar en la medicina personalizada, por lo que proponemos que la medida de la concentración plasmática precisa y exacta de los fármacos y suplementos administrados, junto con una correcta definición de los intervalos de referencia, sería indispensable para comprobar que se obtienen concentraciones plasmáticas terapéuticas, o, en caso contrario, proceder al ajuste de la dosis, que redundaría en un mejor tratamiento de los pacientes y una disminución de eventos adversos y efectos indeseables. Para poder evidenciar esta posibilidad es necesario poner a punto y evaluar metodologías cromatográficas optimizadas.

OBJETIVO GENERAL

Utilizar la cromatografía líquida acoplada a detección ultravioleta (UV), de emisión por fluorescencia (FLD) o de espectrometría de masas (MS) como herramientas de análisis para potenciar y participar en la medicina personalizada, abarcando desde la individualización de la dosificación de fármacos administrados al paciente, al seguimiento pormenorizado de los mismos, la adaptación de los intervalos de normalidad de diferentes magnitudes a nuestra población y la revisión de parámetros clave que mejoren la clasificación y diagnóstico de los pacientes.

OBJETIVOS CONCRETOS

1. Desarrollo y validación técnica y clínica de un método por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para la medida del fármaco busulfán. La validación de un método para la medida de la concentración de busulfán en plasma por LC-MS/MS permitirá una cuantificación robusta, exacta y precisa del fármaco.
2. Monitorización de la concentración de busulfán con el método desarrollado en el objetivo 1 como acondicionamiento previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes pediátricos. Comprobar si la medida de la concentración plasmática del fármaco mejora el manejo pre-trasplante del paciente pediátrico, y en consecuencia disminuye los eventos adversos respecto a los pacientes sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos no monitorizados.
3. Desarrollo y validación técnica y clínica de un método por LC-MS/MS para la medida de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir. El desarrollo de un método para la cuantificación de antivirales en suero por LC-MS/MS permitirá la medida exacta y precisa de los mismos en el laboratorio clínico.
4. Estudio de las concentraciones de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir usando el método desarrollado en el objetivo 3 en tres cohortes de pacientes trasplantados (HSCT y SOT). Investigar si existen interacciones farmacológicas entre el antiviral letermovir y otros fármacos coadministrados y metabolizados por las mismas enzimas de la familia del citocromo P450, que alterarían la concentración plasmática prevista.

5. Cálculo de valores de referencia de las vitaminas A, B1, B6 y E en nuestra población por cromatografía líquida mediante un enfoque directo. Comprobar si el cálculo de valores de referencia de las vitaminas A, B1, B6 y E, de gran demanda clínica, específicos para nuestra población, optimizaría el tratamiento de los pacientes en riesgo de hipo e hipervitaminosis y con necesidades de suplementación.

6. En relación a la valoración e interpretación cuantitativa de las vitaminas, se llevará a cabo la revisión de la corrección de vitamina E por concentración lipídica y de vitamina B1 por hemoglobina. Se evaluará si la aplicación de estos marcadores adicionales relacionados con la medida de las vitaminas E y B1 mejora la interpretación de los resultados de los pacientes y, por lo tanto, el tratamiento de los mismos.

MÉTODOS Y RESULTADOS

El apartado de métodos y resultados se ha dividido en tres capítulos. Los dos primeros capítulos se engloban en la temática medicina individualizada a través de la monitorización de fármacos para el ajuste de dosis, mientras que el tercer capítulo hace referencia a la medicina individualizada a través de la monitorización de vitaminas para optimización en la suplementación.

Más detalladamente, el primer capítulo hace referencia al ajuste de dosis del fármaco neoplásico busulfán. Consta de dos subapartados: en el primero se desarrolla la validación analítica y se evalúan tanto parámetros analíticos comunes a todos los métodos analíticos del laboratorio clínico como parámetros específicos de los métodos cromatográficos; en el segundo, se realiza una validación clínica con pacientes pediátricos en la que se evalúan los resultados obtenidos inmediatamente después de la validación analítica y varios años después de implementar el método en el laboratorio.

El segundo capítulo corresponde a la monitorización de antivirales. La estructura es similar a la del primer capítulo, en cuanto a que está subdividido en dos apartados y el primero también describe el desarrollo del procedimiento de medida por LC-MS/MS y los resultados de la validación analítica. En el segundo se mide la concentración sérica del fármaco en tres cohortes de pacientes trasplantados adultos a los que se administran los antivirales estudiados profilácticamente de forma oral. Se realizan medidas seriadas a diferentes pacientes para evaluar la variabilidad intraindividual y posibles interacciones farmacológicas.

El tercer capítulo hace referencia a la optimización de la suplementación de vitaminas hidro y liposolubles. En primer lugar, se evalúan las características metrológicas de los métodos de medida de las vitaminas A, B1, B6 y E. A continuación, se calculan intervalos de referencia mediante aproximación directa para establecer unos límites de decisión correctos y ajustados a nuestra población. Asimismo, se evalúan parámetros que mejoran la interpretación del resultado, en cuanto a que corrigen posibles sesgos inherentes al paciente.

1. Ajuste de dosificación del fármaco antineoplásico busulfán

1.1. Validación analítica de un método por LC-MS/MS para la cuantificación exacta y precisa del fármaco busulfán

1.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Para medir las concentraciones en plasma de busulfán se han utilizado diversos sistemas de medida, desde cromatógrafos de gases (GC) a cromatógrafos líquidos acoplados a UV, FLD y MS. En este trabajo, se ha optado por la tercera opción, por el mayor rendimiento y sencillez respecto a la GC-MS y la mayor sensibilidad y especificidad respecto a la LC-UV.

Reactivos

Se empleó busulfán, [²H₈]-busulfán, acetato de amonio de alta pureza, y bilirrubina de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos). La presentación comercial de [²H₈]-busulfán fue de 100 µg/mL en metanol. Se empleó acetonitrilo de calidad HPLC/MS de Honeywell (Charlotte, North Carolina, Estados Unidos) y metanol de calidad HPLC/MS de Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Se adquirió ácido fórmico de alta pureza de PanReac AppliChem (Barcelona, España). El reactivo Intralipid® fue suministrado por Fresenius Kabi España (Barcelona, España). Se obtuvo plasma y plasma hemolizado de muestras de pacientes no tratados con busulfán.

Equipamiento y condiciones

Las muestras de plasma se analizaron en el cromatógrafo líquido Nexera X2 acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Shimadzu LCMS-8050 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), equipado con una fuente de ionización por electroespray. Se utilizó una columna UHPLC Mediterranea Sea™ 18 1,8 µm de 50×2,1 mm de Teknokroma (Sant Cugat del Vallès, Barcelona, España), a una temperatura de trabajo de 40°C.

1.1.1.1. Desarrollo del método

Los compuestos se eluyeron a una velocidad de flujo de 0,3 mL/min mediante elución isocrática de 1,6 minutos de duración. La fase móvil consistió en 2 mM de acetato de amonio y ácido fórmico al 0,1% disuelto en una proporción 30:70 de metanol/agua.

En el espectrómetro de masas, la temperatura de la interfaz se estableció en 300°C, la temperatura de la línea de desolvatación se fijó en 250°C, y la temperatura del bloque térmico fue de 350°C. Como gas nebulizador se empleó gas nitrógeno, a una velocidad de flujo de 3 L/min. También se empleó nitrógeno como gas de secado a una velocidad de flujo de 10 L/min, y aire seco para calentar, a una velocidad de flujo de 10 L/min. La revisión de los cromatogramas se realizó con el programa LabSolutions™ de Shimadzu (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón).

Preparación de la muestra

Se prepararon dos disoluciones madre en acetonitrilo (ACN), una de 0,5 g/L de busulfán y otra de 0,5 g/L de estándar interno (*internal standard*, IS), y se congelaron a -20 °C. Se preparó para cada curva de calibración un material de blanco, un calibrador cero, y seis calibradores con concentraciones de 5 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,08 mg/L y 0,03 mg/L de busulfán en plasma. Se prepararon cinco muestras de control de calidad (*quality control*, QC) en plasma con las siguientes concentraciones de busulfán: 4,0 mg/L, 1,5 mg/L, 0,75 mg/L, 0,09 mg/L y 0,03 mg/L. La proporción de plasma fue del 95% o superior respecto del volumen final tanto en los calibradores como en los QCs.

La preparación de las muestras se realizó mediante precipitación de proteínas con ACN. A 100 µL de plasma, calibrador o control se le añadió 100 µL de disolución de trabajo de IS. A continuación, se añadieron 600 µL de ACN. Las muestras se agitaron durante 1 minuto y finalmente se centrifugaron a 10.000 g a temperatura ambiente durante 6 minutos. El volumen de inyección del sobrenadante fue de 2 µL.

1.1.1.2. Validación analítica del método

El estudio de validación se diseñó de acuerdo con las directrices de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)¹²⁵.

Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se analizaron las curvas de calibración una vez al día durante cinco días. Las curvas de calibración se obtuvieron dividiendo el área de pico del analito por el área de pico del IS, y representando este valor frente a la concentración teórica del calibrador. Se permitió una desviación del 15% en todos los calibradores excepto en el calibrador 1, que se fijó un máximo del 20%. Se confirmó la linealidad en el intervalo de medida cuando la recta de regresión lineal ponderada según la fórmula $1/x^2$ proporcionó un coeficiente de correlación superior a 0,995.

Sensibilidad analítica

La evaluación del límite inferior de cuantificación (*low-limit of quantification*, LLOQ) se realizó durante la evaluación de la recta de calibración. Se fijó una desviación máxima permitida del $\pm 20\%$ entre la concentración medida y la teórica, y un coeficiente de variación (CV) $< 20\%$.

Veracidad y precisión

Se realizó la evaluación de la veracidad y la precisión durante tres días mediante cinco replicados de cada QC. La desviación y el CV se calcularon a partir de los datos de cada serie por concentración. La incertidumbre de medida (IM) se calculó con la **ecuación 2**.

$$IM = 1,96 \times CV (\%) (2)$$

Los requisitos fijados fueron $\pm 15\%$ para el sesgo máximo permitido y $\pm 15\%$ para la imprecisión máxima permitida.

Se realizó adicionalmente un estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad. Se analizaron doce muestras por duplicado del programa de garantía externa de la calidad de la Institución Holandesa SKML para la Evaluación de la Calidad en los Laboratorios Clínicos ($n = 12$, intervalo de 0,5–3,5 mg/L). Se consideró aceptable si la diferencia obtenida respecto al valor consenso era inferior al $\pm 15\%$.

Selectividad y arrastre

La selectividad de nuestro método se evaluó comparando la señal del LLOQ respecto a la señal del blanco ($n = 50$). Se evaluaron interferencias endógenas por hemoglobina, lipemia y bilirrubina analizando muestras a una concentración de 1,5 mg/L de busulfán en presencia de concentraciones crecientes de hemoglobina, Intralipid® y bilirrubina. El cambio porcentual se calculó mediante la **ecuación 3**.

$$Interferencia (\%) = 100 \times \frac{C_i}{C_0} (3)$$

donde C_0 fue la muestra con busulfán en ausencia de interferente, y C_i , la muestra con busulfán en presencia del interferente. Se consideró que una interferencia era significativa cuando el porcentaje de interferencia superaba el error total del busulfán a 1,5 mg/L, calculado mediante la **ecuación 4**.

$$Error\ total = |sesgo (\%)| + 1,96 \times CV (\%) (4)$$

La contaminación por arrastre se analizó comparando el área de pico cromatográfico de un blanco con la del LLOQ siguiendo las secuencias: ULOQ – blanco – LLOQ y QC4 – blanco – LLOQ. Las medidas se realizaron por duplicado durante 5 días, considerando aceptable una diferencia inferior al 5%.

Efecto matriz y recuperación del proceso cromatográfico

El efecto matriz (EM) y la recuperación (RE) se evaluaron a dos concentraciones de busulfán (0,09 mg/L y 1,5 mg/L), aplicando el procedimiento descrito por Matuszewski²⁰. El EM también se calculó a una concentración de busulfán de 4 mg/L. El estándar interno se evaluó por separado a la concentración de trabajo (0,1 mg/L). Se prepararon seis lotes diferentes de tres series de muestras para cada concentración descrita: a) en la serie uno se adicionó busulfán a una matriz de ACN; b) en la serie 2 se realizó el pretratamiento a muestras de pacientes no tratados con busulfán y se adicionó éste justo antes del análisis; y c) la serie 3 estaba compuesta por muestras de plasma a las que se adicionó busulfán, posteriormente tratadas y analizadas de forma ordinaria. El EM se determinó comparando la serie 2 con la serie 1, y la RE comparando la serie 3 con la serie 2. El EM se consideró aceptable si presentaba una desviación máxima de $\pm 15\%$ normalizada por IS.

Para evaluar la RE, se valoró que los datos fueran consistentes, precisos y reproducibles ($CV_{\text{intra lote}} < 15\%$, $CV_{\text{inter lote}} < 15\%$).

Estabilidad

El estudio de estabilidad se realizó a dos concentraciones de busulfán, 0,09 mg/L y 1,5 mg/L, cada experimento en tres alícuotas independientes. Se evaluó la estabilidad a temperatura ambiente a las 24 horas (h), 48 h y 72 h. Para analizar la estabilidad de la muestra refrigerada, se analizaron las muestras a las 24 h, a las 72 h y a los 7 días conservadas a 2–8°C. La estabilidad de las muestras congeladas a –20°C se analizó a los 30 días y 60 días. Se evaluaron 3 ciclos de congelación y descongelación. La estabilidad de los sobrenadantes en el autoinyector se estudió a las 24 h y a los 7 días. Debido a la inestabilidad del busulfán previamente reportada, se realizó un estudio de estabilidad a corto plazo. Para ello se analizaron las muestras de QC conservadas a temperatura ambiente (20–25°C) y a 2–8°C durante 2 h, 4 h, 6 h y 8 h.

La concentración media para cada QC y condición debió presentar una desviación máxima de $\pm 15\%$ respecto a la concentración nominal.

1.1.2. RESULTADOS

El tiempo de retención fue de 0,78 minutos para el busulfán y de 0,77 minutos para el IS. Se observaron formas de picos cromatográficos aceptables, que no presentaban ni colas ni interferencias. En la **tabla 1** se muestran los parámetros de masa para el analito y el IS.

Tabla 1. Configuración del detector de espectrometría de masas para el busulfán y su estándar interno, el [²H₈]-busulfán.

	Ión precursor (m/z)	Ión producto (m/z)	Voltajes cuadрупolos 1/3 (Voltios)	Energía de colisión (Voltios)	Tiempo de retención (min)
Analito	264,1	151,0	12/16	11	0,78
IS	272,1	159,0	13/17	13	0,77

Todas las curvas de calibración realizadas en la fase de validación fueron lineales en el intervalo de 0,03–5 mg/L ($R^2 = 0,9984$). Durante la fase de validación no se excluyó ningún calibrador. El CV para el LLOQ fue del 6%, y el sesgo del 2,7% ($n = 40$).

Tanto la imprecisión intraserial como interdiaria de las muestras de QC fueron inferiores al 8%, el sesgo fue inferior al 10% (**tabla 2**). Los resultados de los materiales de control externo mostraron una buena concordancia con los valores asignados ($n = 12$; $R^2 > 0,97$). El sesgo medio obtenido fue de -2,1%.

Tabla 2. Resultados de imprecisión intraserial e interdiaria, así como sesgo para diferentes concentraciones de busulfán ($n = 15$).

Concentración busulfán (mg/L)	Intraserial CV (%)	Interdiaria CV (%)	Sesgo (%)
LLOQ (0,03)	6,38	6,00	2,7
QC1 (0,09)	5,61	7,20	9,6
QC2 (0,75)	6,13	7,08	9,0
QC3 (1,50)	5,85	5,01	5,6
QC4 (4,00)	4,89	6,63	8,3

CV, Coeficiente de variación; LLOQ, límite bajo de cuantificación; QC, control de calidad.

En los materiales de blanco no se observaron interferencias en las transiciones¹ analizadas (n = 50).

El método se validó con muestras de plasma que contenían una elevada concentración de hemoglobina, Intralipid® o bilirrubina (**figura 27**). El % Interferencia medio fue de -3,1%, -3,2% y -1,5%, respectivamente. El sesgo máximo calculado en todas las concentraciones de interferente fue inferior al error total del busulfán a 1,5 mg/L, de 12,8%.

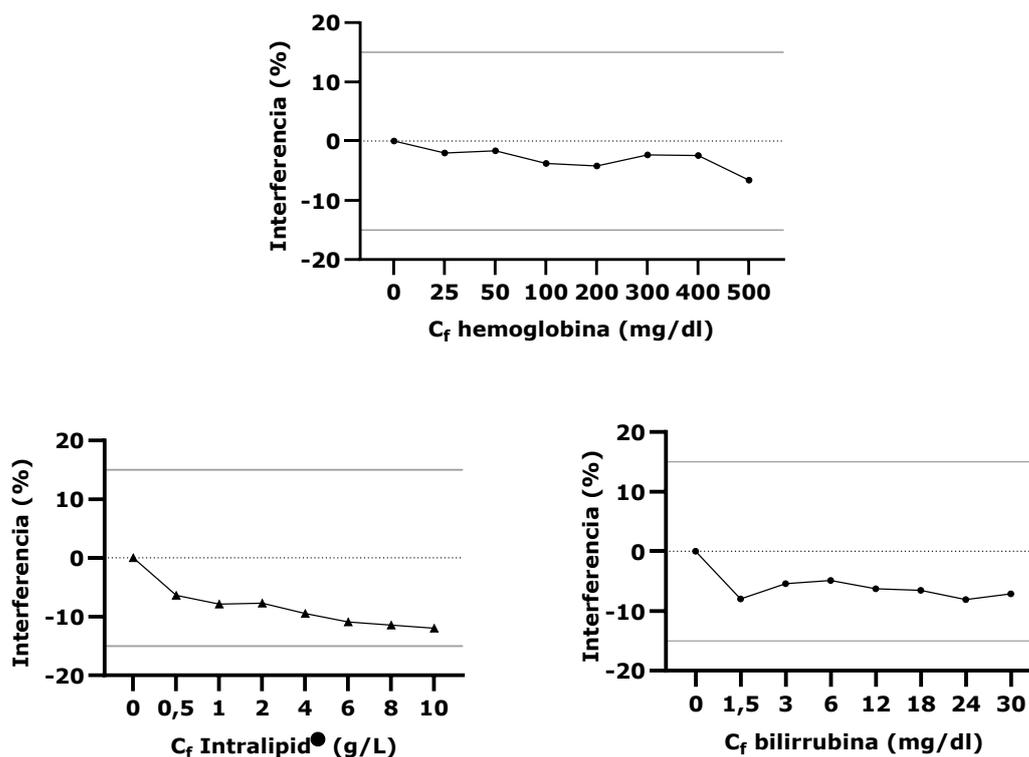


Figura 27. Interferogramas de hemoglobina, lipemia y bilirrubina a una concentración de busulfán de 1,5 mg/L. La línea gris representa el límite de aceptación, de $\pm 15\%$. Cf es la concentración del interferente en las soluciones: hemoglobina, Intralipid® o bilirrubina.

No se observó contaminación por arrastre por busulfán (n = 10) ni por IS (n = 10) en el material de blanco.

Los resultados del efecto matriz y la recuperación a diferentes concentraciones de busulfán normalizados por IS se muestran en la **tabla 3**.

¹ Una transición es una pareja de un ion precursor y un ion producto (o fragmento) en un analito medido por espectrometría de masas en tándem, modalidad en la que se puede seleccionar más de una relación m/z para aumentar la especificidad. Un analito puede caracterizarse a su vez por una o más transiciones.

Tabla 3. Resultados del estudio de la matriz. Todos los resultados se expresan como desviación porcentual normalizada por estándar interno.

Concentración de busulfán (mg/L)	Efecto matriz			Recuperación		
	N	Media (%)	CV (%)	N	Media (%)	CV (%)
0,09	18	92,9	3,7	18	94,6	1,8
1,5	18	100,2	4,3	18	103,3	4,8
4	18	99,8	10,1	N.D.		

CV, coeficiente de variación; N, tamaño muestral; N.D., no determinado.

El busulfán es estable en plasma durante al menos 8 h a temperatura ambiente, 24 h a 2–8°C, y hasta 2 meses a –20°C (**figura 28**). En cambio, el busulfán no es estable cuando se conserva a temperatura ambiente durante más de 24 h (resultados no mostrados). La concentración de busulfán disminuyó menos del 15% tras tres ciclos de congelación y descongelación (**figura 28**). El sobrenadante permaneció estable en el autoinyector durante 24 h: se observó una reducción del 13,7% y del 8,9% a concentraciones de busulfán de 0,09 mg/L y 1,5 mg/L, respectivamente. En cambio, ésta fue significativa a los 7 días: 18,9% para la concentración de 0,09 mg/L, y 16,8% para la concentración de 1,5 mg/L de busulfán.

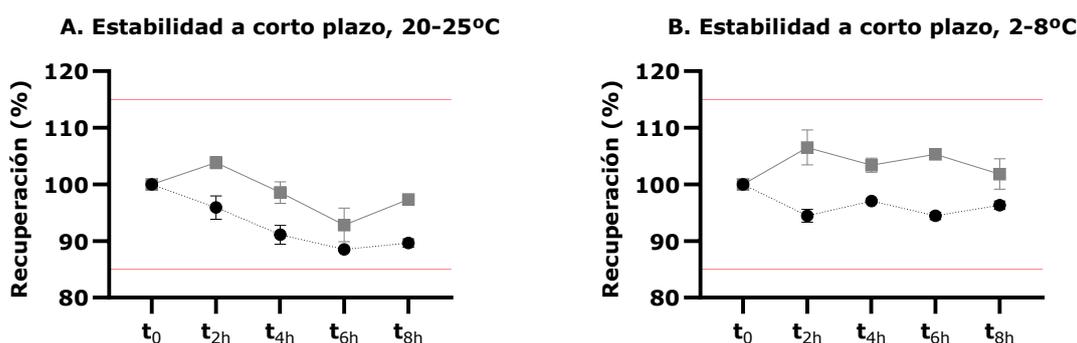


Figura 28. Estabilidad del busulfán a diferentes condiciones y a dos concentraciones diferentes (línea punteada, concentración de 0,09 mg/L y línea continua, concentración de 1,5 mg/L). En cada punto, se representa la media y el error estándar de los 3 replicados. La línea roja representa el límite de aceptación, de $\pm 15\%$.

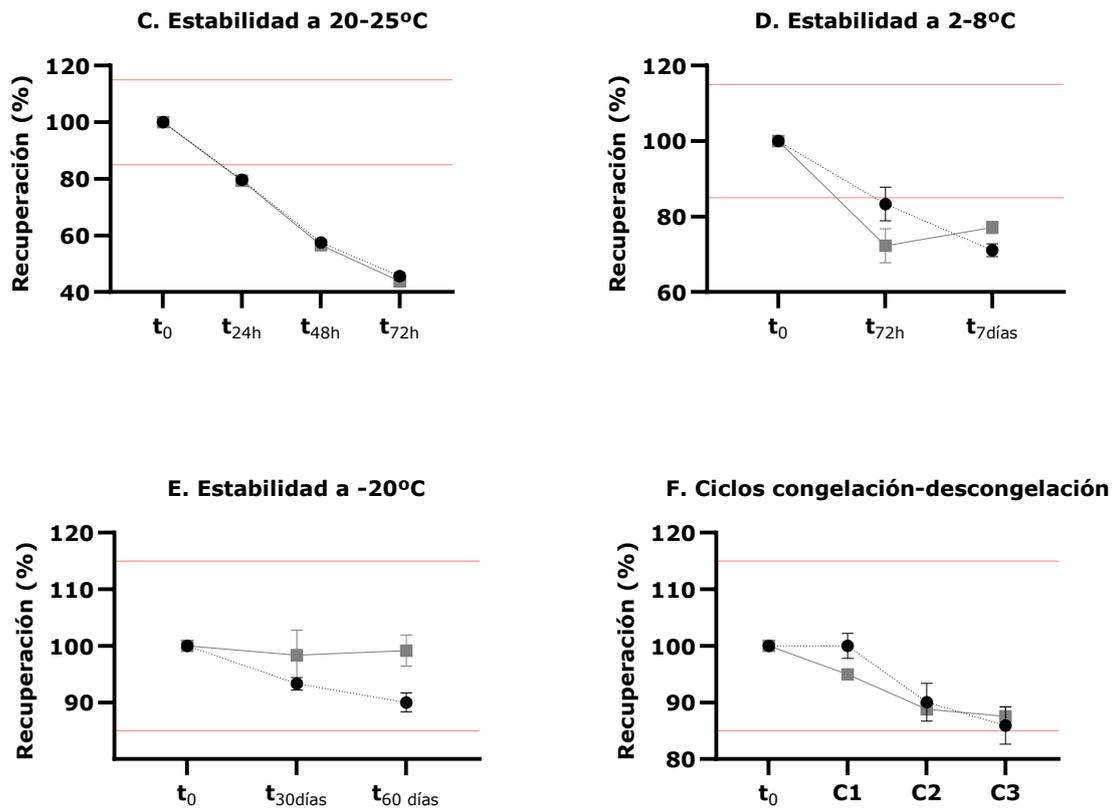


Figura 28 (continuación). Estabilidad del busulfán a diferentes condiciones y a dos concentraciones diferentes (línea punteada, concentración de 0,09 mg/L y línea continua, concentración de 1,5 mg/L). En cada punto, se representa la media y el error estándar de los 3 replicados. La línea roja representa el límite de aceptación, de $\pm 15\%$.

1.2. Ajuste de dosis del fármaco busulfán utilizado en regímenes de acondicionamiento en pacientes pediátricos receptores de trasplante de progenitores hematopoyéticos

1.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio únicamente pacientes pediátricos a los que se administró busulfán por vía intravenosa cuatro días consecutivos durante 3 h, junto con fludarabina¹²⁶, fludarabina y tiotepa¹²⁷, ciclofosfamida¹²⁸, melfalán¹²⁹, o ciclofosfamida y melfalán¹³⁰. La dosis inicial administrada se basó en el AUC objetivo ajustada al peso corporal de cada paciente y siguiendo nomogramas de dosificación personalizados, según el procedimiento descrito en estudios anteriores⁴⁹. El régimen de acondicionamiento incluyendo busulfán se inició en el día -7 previo al trasplante y finalizó el día -4. Los nomogramas de dosificación se diseñaron para lograr un régimen de acondicionamiento mieloablativo o no mieloablativo. Se procedió a la depleción de células T ex vivo con timoglobulina o alemtuzumab en todos los pacientes que iban a someterse a un HSCT por enfermedades no malignas y en aquellos pacientes con enfermedades malignas cuando el donante no era un familiar directo. Durante el tratamiento con busulfán no se administraron ni paracetamol ni azoles. Se administró levetiracetam como terapia profiláctica anticonvulsiva.

Para medir la concentración de busulfán en el plasma de los pacientes, se extrajeron muestras de sangre en tubos Vacutainer™ K3-EDTA (Becton Dickinson, Milan, Italia). A continuación, se transportaron las muestras a temperatura ambiente, se centrifugaron a 2.500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procesaron o congelaron inmediatamente. Para el cálculo del AUC, se extrajeron muestras de sangre inmediatamente antes de la infusión de busulfán (hora 0), al concluir la infusión, y 1 h, 2 h y 3 h tras la infusión⁴⁹. A partir del día 2, la dosis de busulfán se ajustó a partir de los resultados del AUC real obtenido el día anterior (**figura 29**).

El protocolo para la extracción, almacenamiento y análisis de sangre fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Vall d'Hebron [EOM(AG)027/2021(5825)]. Este estudio se realizó en conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki y las leyes y regulaciones españolas y europeas.

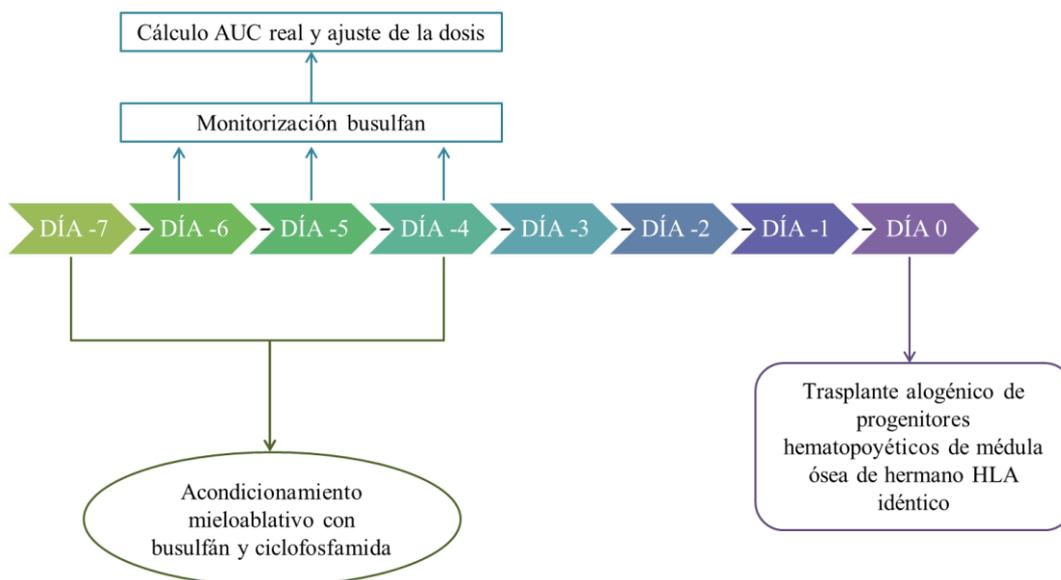


Figura 29. Representación del tratamiento con busulfán previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos en un paciente pediátrico real. AUC, área bajo la curva; HLA, sistema del antígeno leucocitario humano.

1.2.2. RESULTADOS

1.2.2.1. Validación clínica prospectiva

Se analizaron las concentraciones plasmáticas de busulfán en 15 pacientes pediátricos ($n = 75$ muestras; 7 niñas (46,7%); edad media: $4,4 \pm 3,5$ años, rango de edad de 6 meses a 12 años). La dosis inicial administrada fue de entre 3 y 5 mg/kg/24 h de busulfán, independientemente de la edad (**figura 30**).

Tras las dosis iniciales de busulfán de 3 mg/kg/24 h ($n = 3$ pacientes), 4 mg/kg/24 h ($n = 4$ pacientes) y 5 mg/kg/24 h ($n = 8$ pacientes), las AUC obtenidas para el primer día de tratamiento fueron de entre 2.140,0 y 4.376,3 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, entre 3.950,0 y 4.387,3 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, y entre 3.585,8 y 7.897,6 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, respectivamente. Las AUC acumuladas para los cuatro días de tratamiento fueron de entre 9.627,1 y 21.110,4 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, entre 15.799,9 y 22.211,4 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, y entre 19.234,7 y 27.173,58 $\mu\text{M} \cdot \text{min}$, respectivamente.

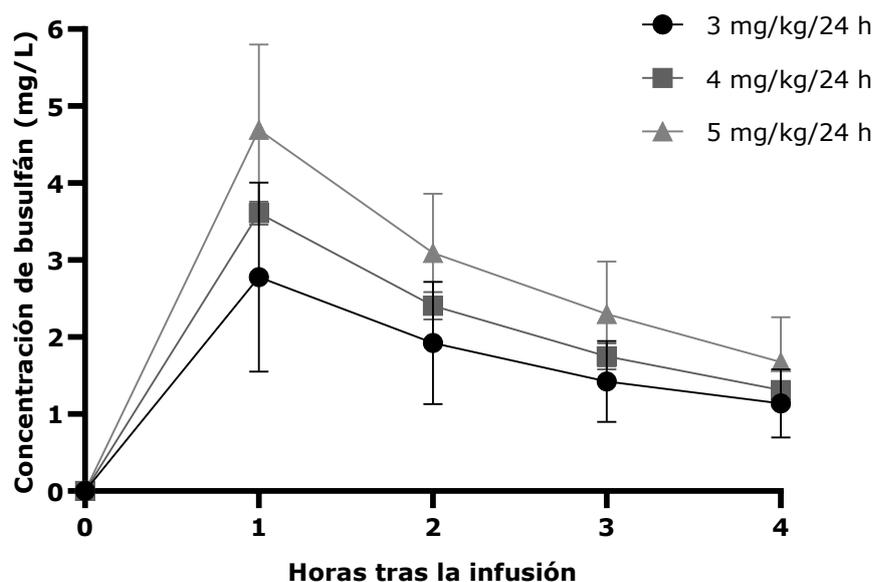


Figura 30. Representación de las AUC medidas en pacientes pediátricos, según la dosis inicial. Se representa la media y el error estándar de cada punto: inmediatamente después de la infusión (0h), 1h, 2h, 3h y 4h postinfusión.

1.2.2.2. Estudio observacional retrospectivo diciembre de 2020 – mayo de 2023

Se incluyeron en el estudio 41 pacientes pediátricos tratados con busulfán entre diciembre de 2020 y mayo de 2023 (29,3% mujeres; media de edad = 3 años, rango de edad 2 meses–16 años). Se analizaron un total de 705 muestras, correspondientes a 141 AUC. El cociente HSCT alogénico (aloHSCT)/autólogo (autoHSCT) fue de 4,9 (34:7). El AUC acumulado objetivo se fijó entre 65000 y 95000 ng/mL*h, para alcanzar un régimen de acondicionamiento mieloablativo o no mieloablativo dependiendo de la enfermedad en origen y el tipo de trasplante. La dosis inicial se fijó siguiendo nomogramas de dosificación personalizados y ajustando por peso (resultados no mostrados).

En la **tabla 4** se muestra un resumen de las principales indicaciones de trasplante hematopoyético en nuestra cohorte de pacientes (completada con el tipo de trasplante -autólogo o alogénico-, fármacos antineoplásicos administrados y exposición objetivo de busulfán). Las indicaciones más prevalentes para el acondicionamiento de busulfán previo a HSCT fueron neuroblastoma de alto riesgo (n = 7), anemia de células falciforme (n = 6), enfermedad granulomatosa crónica (n = 4) y linfocitosis hemofagocítica. Otras indicaciones menos prevalentes y no incluidas en la tabla han sido adrenoleucodistrofia ligada a X, síndrome de Hurler, o síndrome de Griscelli tipo II.

Tabla 4. Resumen de las indicaciones de trasplante hematopoyético, con referencia al tipo de trasplante (autólogo o alogénico), fármacos antineoplásicos administrados y exposición objetivo de busulfán.

Pacientes	Enfermedad	Tipo de trasplante	Otros fármacos antineoplásicos	Exposición objetivo a busulfán (ng/ml*h)
7	Neuroblastoma de alto riesgo	Autólogo	Melfalán	85.000
6	Anemia de células falciformes	Alogénico	Ciclofosfamida	85.000–95.000
4	Enfermedad granulomatosa crónica	Alogénico	Fludarabina	70.000
4	Linfocitosis hemofagocítica	Alogénico	Fludarabina	85.000–95.000 (n = 2) 70.000 (n = 2)
3	Inmunodeficiencia combinada grave	Alogénico	Fludarabina	65.000
3	Leucemia mieloblástica aguda	Alogénico	Melfalán y ciclofosfamida	85.000–95.000 (n = 2) 70.000–75.000 (n = 1)
3	Leucemia mielomonocítica juvenil	Alogénico	Melfalán y ciclofosfamida	85.000–95.000

A los pacientes incluidos en el estudio se les administró busulfán junto con otros fármacos quimioterapéuticos como fludarabina (n = 17), fludarabina y tiotepa (n = 4), ciclofosfamida (n = 7) o ciclofosfamida y melfalán (n = 6) en aloHSCT (**figura 31**). Para el tipo de trasplante autoHSCT, siempre se administró busulfán junto a melfalán (n = 7).

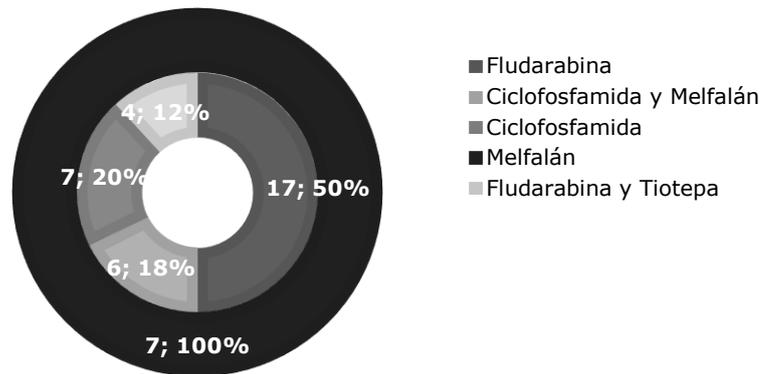


Figura 31. Regímenes de acondicionamiento administrados. Se representan los fármacos antineoplásicos administrados junto a busulfán.

En función del AUC real calculado a partir de las mediciones de busulfán, se ajustó la dosis en 37 de 41 pacientes (90%) para alcanzar el AUC objetivo. La dosis se aumentó de media un 10,2% el primer día. Entre el primer y el cuarto día hubo diferencias en la dosificación de entre $-51,5\%$ y $+75,5\%$ (figuras 32 y 33). En la figura 32 se representa la diferencia porcentual total en la dosis entre el cuarto y el primer día de tratamiento de los 37 pacientes. En la figura 33 se grafican los cambios producidos en los AUC medidos en 4 de los pacientes en los que se ajustó la dosis de busulfán.

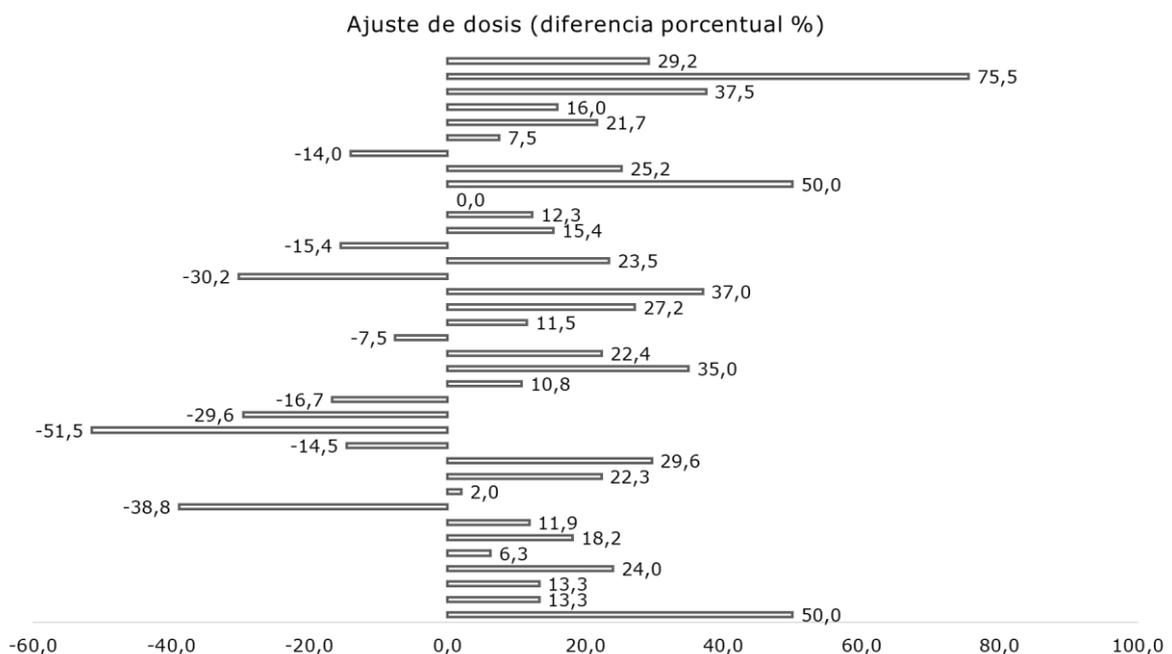


Figura 32. Ajuste de dosis para alcanzar el AUC acumulado objetivo, expresado como diferencia porcentual de la dosis de busulfán administrada entre el primer y el cuarto día.

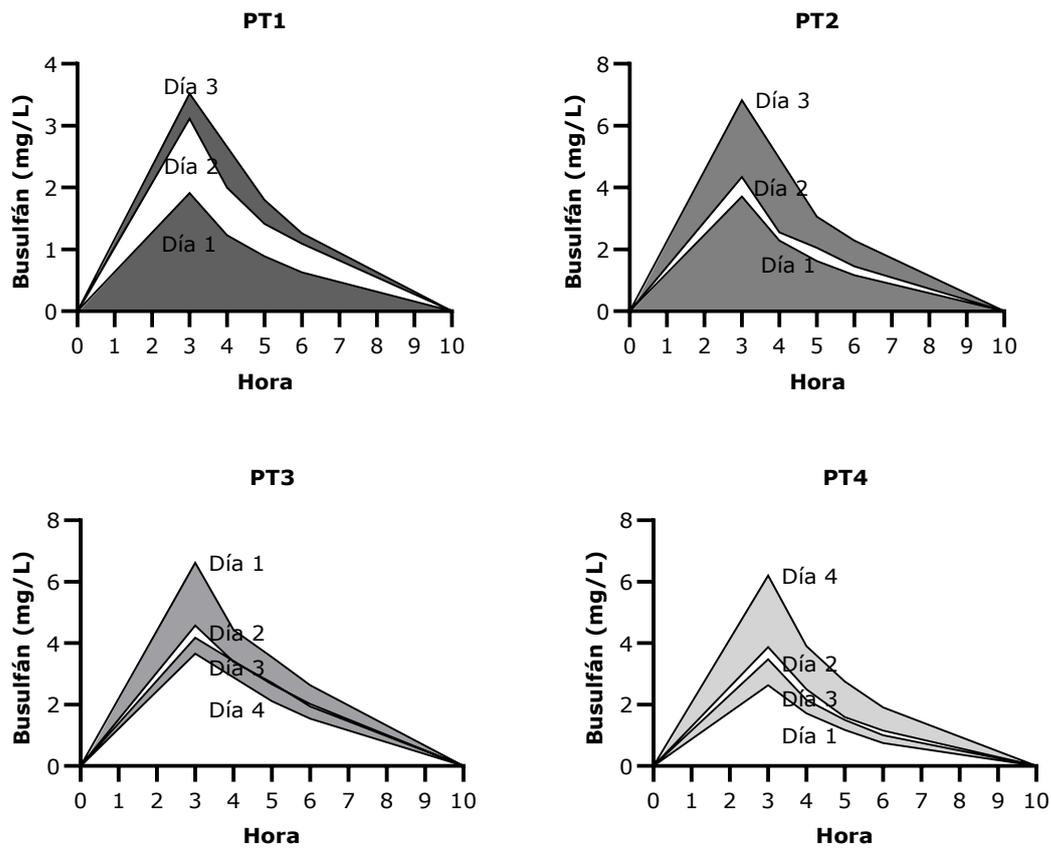


Figura 33. Evolución de las áreas bajo la curva medidas durante los días de tratamiento en cuatro pacientes pediátricos incluidos en el estudio. PT, paciente.

Los eventos adversos, incluidos el rechazo del injerto y/o fallecimiento, ocurrieron en 7 pacientes después del HSCT (19%), con un seguimiento de al menos 6 meses ($\text{tiempo}_{\text{seguimiento}}$ medio = 17 meses). La tasa de supervivencia fue del 89%.

2. Monitorización de antivirales utilizados en pacientes trasplantados como profilaxis frente al citomegalovirus

2.1. Desarrollo y validación de un método por LC-MS/MS para la medida de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir

2.1.1. MATERIALES Y MÉTODOS

Se han publicado diversos métodos para la medida de antivirales por HPLC-UV, HPLC-FLD y LC-MS/MS. Se han desarrollado métodos que miden tanto un único analito como paneles de diversos antivirales y sus metabolitos. En este trabajo se ha optado por la medida simultánea de los tres antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir por LC-MS/MS.

Reactivos

Las sustancias puras de ganciclovir, [$^2\text{H}_5$]-ganciclovir, aciclovir, [$^2\text{H}_4$]-aciclovir, letermovir y [$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-letermovir fueron suministradas por Alsachim (Estrasburgo, Francia). El acetonitrilo y el metanol de calidad LC/MS fueron suministrados por Honeywell (Charlotte, NC, Estados Unidos) y Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), respectivamente. Intralipid® fue suministrado por Fresenius Kabi España (Barcelona, España). El agua se obtuvo mediante un sistema de purificación Purelab® flex (ELGA LabWater, Wycombe, Reino Unido). Para preparar controles de calidad internos y calibradores, así como para los diferentes estudios de validación, se utilizaron sueros de pacientes no tratados con fármacos antivirales.

Equipamiento

Se utilizó para el análisis un cromatógrafo líquido Nexera X2 acoplado a un espectrómetro de masas en tándem Shimadzu LCMS-8060 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con una fuente de ionización por electrospray.

2.1.1.1. Desarrollo del método

El análisis cromatográfico se realizó en una columna NucleosilTM 120-3 C18 de 40x4,6 mm, 3 μm , de Macherey–Nagel (Duren, Alemania). La columna se mantuvo a una temperatura de 28°C. La fase móvil A contenía ácido fórmico (0,1% v/v) en agua; la fase móvil B contenía ácido fórmico (0,1% v/v) en metanol. La elución en gradiente se realizó a un caudal constante de 1 mL/min. El gradiente

consistió en varias etapas (**figura 34**): 1) aumento gradual de fase móvil B del 0% al 80% en 1,6 minutos. 2) Se mantuvo al 80% de fase móvil B durante 1,7 min, y posteriormente 3) se incrementó hasta el 90% durante 1,5 minutos. 4) Se mantuvo brevemente al 90% de fase móvil B (0,25 min). Por último, se restablecieron las condiciones iniciales durante un minuto. El tiempo total de elución cromatográfica fue de 6,5 minutos.

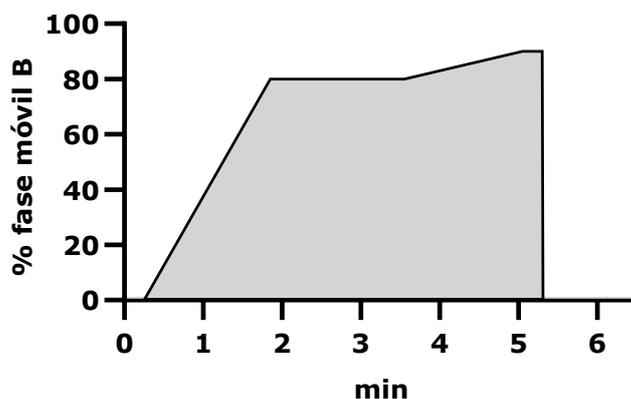


Figura 34. Gradiente cromatográfico, referido al porcentaje de la fase móvil B.

Las transiciones de masas de los analitos y sus IS se detectaron mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM) (se describen en la **tabla 5**).

Tabla 5. Parámetros optimizados del espectrómetro de masas para los tres fármacos antivirales y sus estándares internos.

Analito	Precursor	Producto	Voltajes	Energía de colisión
	(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)	cuadrupolos 1/3 (V)	(eV)
Ganciclovir	256,1	152,3	28/29	15
		135,3	10/10	31
Aciclovir	226,1	152,3	27/30	12
		135,3	11/10	28
Letermovir	573,2	424,3	28/29	32
		382,4	20/30	33
[² H ₅]-ganciclovir	261,1	152,3	28/29	15
[² H ₄]-aciclovir	230,1	152,3	27/30	12
[¹³ C, ² H ₃]-letermovir	577,2	424,3	28/29	32

La temperatura de la interfaz del espectrómetro de masas se estableció en 400°C, la temperatura de la línea de desolvatación se fijó en 250°C, y la temperatura del bloque térmico fue de 400°C. Como

gas nebulizador se empleó gas nitrógeno, a una velocidad de flujo de 3 L/min. También se empleó nitrógeno como gas de secado a una velocidad de flujo de 4 L/min, y aire seco para calentar, a una velocidad de flujo de 16 L/min. El detector de masas se ajustó al modo de iones positivos. Los datos se analizaron con el software LabSolutions™ de Shimadzu.

Preparación de la muestra

Las muestras de pacientes, los controles de calidad (QC) y los calibradores (100 µL) se mezclaron con la solución de estándar interno (25 µL) en un eppendorf. A continuación, se añadió acetónitrilo (400 µL) para precipitar las proteínas. Las muestras se agitaron en un mezclador tipo vortex durante 1 min y se centrifugaron a temperatura ambiente (6 min, 10.000 g). Se evaporó una alícuota de 100 µL del sobrenadante hasta sequedad y finalmente se reconstituyó en 400 µL de fase móvil A. Finalmente, sólo un microlitro del sobrenadante se inyectó en la columna.

La solución de IS consistió en [²H₅]-ganciclovir y [²H₄]-aciclovir a 10 mg/L, y [¹³C,²H₃]-letermovir a 1 mg/L, en metanol-agua (1:1, v/v).

2.1.1.2. Validación analítica del método

El estudio de validación se diseñó de acuerdo con las directrices de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), actualizadas en 2022¹³¹.

Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se procesaron curvas de calibración una vez al día durante 5 días. Para el ganciclovir y el aciclovir, se analizaron seis calibradores con concentraciones de 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L y 25 mg/L; para el letermovir, se evaluaron seis calibradores con concentraciones de 0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L y 2 mg/L. Las curvas de calibración se obtuvieron trazando la relación del área del pico de los analitos entre el IS frente a la concentración nominal de los calibradores. La linealidad se confirmó cuando la recta de regresión lineal ponderada ajustada rindió un coeficiente de correlación superior a 0,995.

Sensibilidad o límite bajo de cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se determinó evaluando la relación señal-ruido (>10:1) y calculando la imprecisión y el sesgo (criterio de aceptación para ambos: <15%). El coeficiente de variación se calculó a partir de replicados y el sesgo se calculó comparando las concentraciones obtenidas con la concentración nominal (n = 80).

Exactitud y precisión

El análisis de la exactitud y la precisión se realizó una vez al día durante 5 días no consecutivos. Se realizaron cinco duplicados a cuatro concentraciones de control de calidad. Se calcularon el sesgo y el CV a partir de los datos de cada serie y para cada concentración. El error analítico total se calculó como $|\text{sesgo} (\%)| + 1,96 \times \text{CV} (\%)$ (**ecuación 4**, capítulo 1.1). Los criterios de aceptación fueron un sesgo máximo del $\pm 15\%$ y un CV dentro del $\pm 15\%$.

La veracidad del ensayo se evaluó mediante la medición de muestras de programas de garantía de la calidad externa (*external quality assesment*, EQA) del programa SKML (Países Bajos) excepto para el LTV (programa EQA no disponible). El rendimiento se consideró aceptable si los resultados estaban dentro de $\pm 15\%$ de los valores consenso o asignados.

Selectividad y contaminación por arrastre

La selectividad del método se evaluó comparando las respuestas de las muestras LLOQ con las respuestas de los blancos. Los blancos se prepararon por triplicado a partir de 6 mezclas de sueros de pacientes (o lotes). La selectividad en matrices lipémicas y hemolizadas se evaluó analizando muestras a tres o cuatro concentraciones clínicamente significativas de fármaco antiviral (0,25, 0,6, 2,5 y 15 mg/L para ACV; 0,25, 1,25, 5 y 15 mg/L para GCV; y 0,25, 0,75 y 2 mg/L para LTV) en concentraciones crecientes de Intralipid® o hemoglobina, hasta 10 g/L de Intralipid® y hasta 500 mg/dl de hemoglobina. El porcentaje de interferencia se evaluó según la **ecuación 3** descrita en el capítulo 1.1. Se consideró aceptable una interferencia $< 15\%$.

La contaminación por arrastre se evaluó comparando el área del pico de una muestra de blanco de 3 lotes individuales inyectada inmediatamente después del calibrador más alto con el área del pico del LLOQ. Las muestras de blanco debían carecer de pico detectable para el analito o el estándar interno en el tiempo de retención esperado ($< 10\%$ de la respuesta o señal del analito; menos del 5% de la respuesta del IS).

Dilución

La integridad de la dilución se verificó añadiendo suero de pacientes no tratados a una concentración tres veces superior al límite superior de cuantificación para cada analito (75 mg/L para ACV y GCV, y 6 mg/L para LTV). Posteriormente, estas muestras de suero concentradas se diluyeron 3, 5 y 10 veces con suero de pacientes no tratados previamente a la preparación de la muestra y se analizaron inmediatamente después por quintuplicado. La exactitud se consideró aceptable si los resultados se encontraban entre el 85% y el 115% de las concentraciones nominales. La imprecisión no debió superar el 15%.

Efecto de la matriz y recuperación

Se prepararon muestras de QC en seis mezclas diferentes de suero humano de pacientes no tratados con antivirales. El efecto matriz se evaluó comparando el área de pico del QC en extractos² de muestras de suero con el área de pico del QC preparado en metanol-agua (1:1, v/v). La recuperación se determinó comparando el área de pico de las muestras de QC tratadas según el procedimiento habitual con el área de pico de QC en extractos de muestras de suero. El efecto matriz y la recuperación se consideraron aceptables si el CV era inferior al $\pm 15\%$.

Estabilidad

Las muestras de QC enriquecidas con todos los analitos a tres concentraciones para cada analito se prepararon en fresco y se analizaron por triplicado. Las muestras de QC se analizaron tras su almacenamiento durante 24 h y 48 h a temperatura ambiente (20–25°C) y durante 48 h, 7 días y 30 días a 2–8°C. Para determinar la estabilidad del sobrenadante, los sobrenadantes de las muestras de QC se almacenaron en el automuestreador o en la mesa de trabajo durante 24 h, 48 h y 72 h y, a continuación, se analizaron. Por último, se evaluaron tres ciclos de congelación-descongelación.

También se analizó la estabilidad de las muestras reales de pacientes almacenadas a -20°C , a los 30 y a los 60 días. La estabilidad se evaluó analizando las muestras el día 0 y un mes ($n = 10$) o dos meses ($n = 10$) después de su almacenamiento a -20°C .

A continuación, se comparó la respuesta de cada analito con la del día 0, se calculó la diferencia porcentual media y se definió como suficientemente estable si los resultados se encontraban dentro del $\pm 15\%$ de las concentraciones nominales.

Análisis de muestras

El análisis de las muestras se realizó después de la validación. Cada serie analítica incluyó algunos blancos, un calibrador cero y seis calibradores, 4 niveles de QC y las muestras de pacientes. Se revisaron las respuestas de los estándares internos y los tiempos de retención, y se prestó especial atención a la presencia de contaminación por arrastre. Se estableció como criterio para la aceptación de la serie que al menos el 75% de los QC procesados estuviesen dentro de un $\pm 15\%$ respecto a la concentración nominal.

² El término extracto se refiere a una muestra de blanco (sin fármaco) preparada de forma habitual mediante precipitación de proteínas y evaporación, a la que se añade el fármaco al final, en la etapa de reconstitución.

2.1.2. RESULTADOS

Se obtuvo una buena respuesta tanto para los analitos como para los IS con el aducto³ protonado [M+H]⁺. Para aumentar la especificidad, se seleccionaron dos transiciones de masa para los tres analitos (**tabla 5**). El tiempo de retención para GCV, ACV y LTV fue de 1,6, 1,7 y 3,4 min, respectivamente. El tiempo total de elución fue de 6,5 min. Los tres compuestos coeluyeron con sus equivalentes IS. El método propuesto permitió obtener una buena resolución y respuesta de la señal del analito, formas de pico simétricas y tiempos de análisis cortos (**figuras 35A, 35B y 35C**).

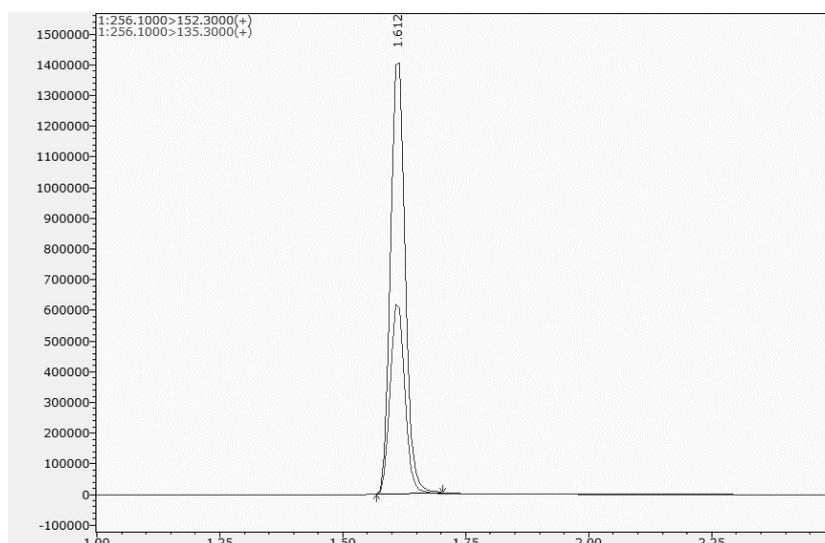


Figura 35A. Cromatograma del calibrador 3 (1 mg/L) de ganciclovir.

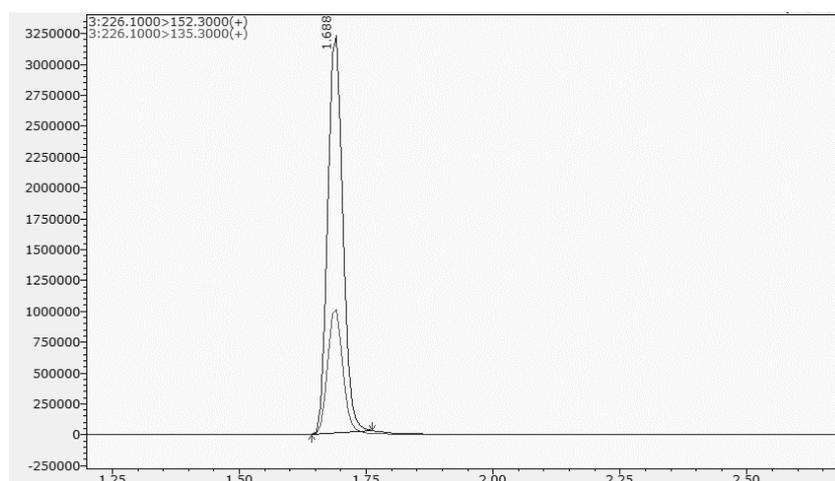


Figura 35B. Cromatograma del calibrador 3 (1 mg/L) de aciclovir.

³ Un aducto es un producto AB formado por la unión de dos moléculas A y B, sin que se produzcan cambios estructurales en ellas.

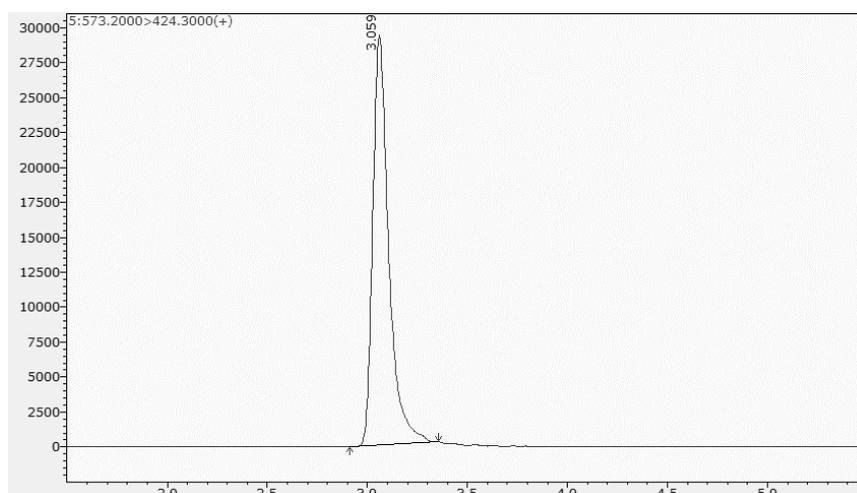


Figura 35C. Cromatograma del calibrador 3 (0,05 mg/L) de letermovir.

Se evaluó la linealidad mediante análisis de regresión lineal de GCV y ACV hasta 25 mg/L; y la linealidad de LTV hasta 2 mg/L. Se obtuvieron valores de coeficientes de correlación $R^2 > 0,993$ (**figura 36**). El LLOQ se definió como 0,1 mg/L para GCV y ACV, y 0,01 mg/L para LTV ($n = 80$), ambos seleccionados en función de la concentración clínicamente relevante. A estas concentraciones, la relación señal/ruido fue $>10:1$. No se observó contaminación por arrastre en ninguno de los analitos ($n = 15$) o ni de los IS ($n = 15$).

La imprecisión intraserial e interdiaria en todos los materiales de QC dio valores de CV $<8\%$ y $<11\%$ respectivamente. El sesgo fue inferior al 15% con respecto a la concentración nominal para todas las concentraciones y analitos. Los resultados se muestran en la **tabla 6**.

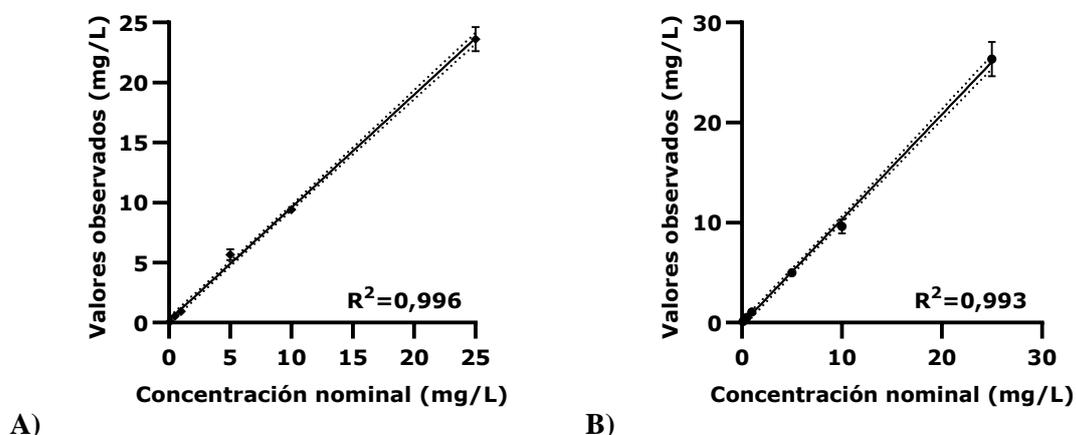
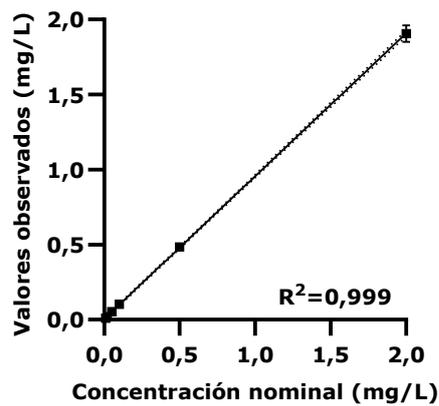


Figura 36. Rectas de regresión lineal en las que se representan la media de los valores obtenidos en diferentes curvas de calibración ($n = 3$) frente a los valores teóricos para ganciclovir (A), aciclovir (B) y letermovir (C).



C)

Figura 36 (continuación). Rectas de regresión lineal en las que se representan la media de los valores obtenidos en diferentes curvas de calibración ($n = 3$) frente a los valores teóricos para ganciclovir (A), aciclovir (B) y letermovir (C).

Tabla 6. Resultados de los estudios de precisión y exactitud, así como el error analítico total ($n = 25$).

			LLOQ	QC bajo	QC medio	QC alto
GCV	Intraserial	CV (%)	2,4	2,4	1,8	1,6
		Sesgo (%)	2,5	-4,0	-3,5	11,0
	Interdiaria	CV (%)	2,6	5,5	4,3	4,6
		Error total	%	6,5	8,2	6,5
ACV	Intraserial	CV (%)	6,7	5,7	5,5	4,6
		Sesgo (%)	7,4	6,8	6,7	10,4
	Interdiaria	CV (%)	7,6	8,4	7,5	10,6
		Error total	%	18,5	16,2	15,8
LTV	Intraserial	CV (%)	7,9	4,9	4,4	3,1
		Sesgo (%)	6,4	4,9	9,1	-5,5
	Interdiaria	CV (%)	7,7	5,2	6,9	7,0
		Error total	%	19,4	13,0	16,4

CV, coeficiente de variación; LLOQ, límite bajo de cuantificación; QC, control de calidad.

Los resultados obtenidos de las muestras de EQA mostraron una buena concordancia con los valores asignados ($n = 16$; $R^2 = 0,989$ para GCV y $R^2 = 0,971$ para ACV). Todos los resultados obtenidos se situaron dentro del $\pm 15\%$ de los valores asignados. El sesgo medio fue de $-7,8\%$ y $-8,5\%$ para GCV y ACV, respectivamente.

No se observaron interferentes en las muestras de blanco ($n = 18$). El sesgo medio de la medida del porcentaje de interferencia, incluso a altas concentraciones de interferente, fue aceptable, $<15\%$ para todos los analitos (**figura 37**).

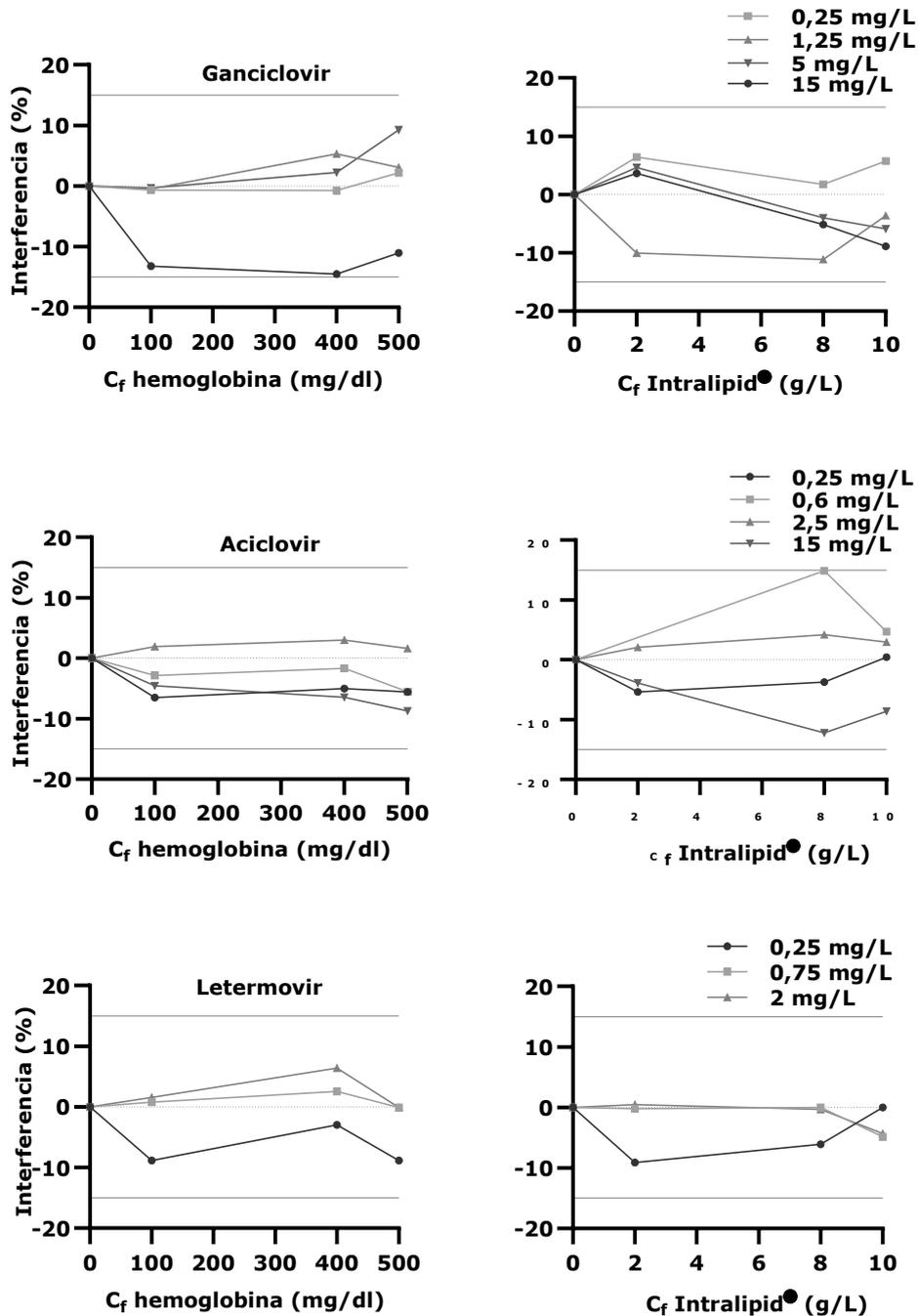


Figura 37. Interferogramas de hemoglobina y lipemia a cuatro concentraciones de ganciclovir y aciclovir, y a tres concentraciones de letermovir (media). La línea continua gris representa el límite aceptable de $\pm 15\%$. C_f es la concentración del interferente en las soluciones: hemoglobina e Intralipid®.

No se observó contaminación por arrastre en ninguno de los analitos ($n = 15$) ni estándares internos ($n = 15$). La concentración media y el CV (%) de las diluciones de QC fueron aceptables, por lo que

se podrían diluir las muestras de pacientes con sueros de pacientes no tratados hasta un factor de dilución de 10.

La media del efecto matriz y la recuperación normalizados por IS se muestran en la **figura 38**.

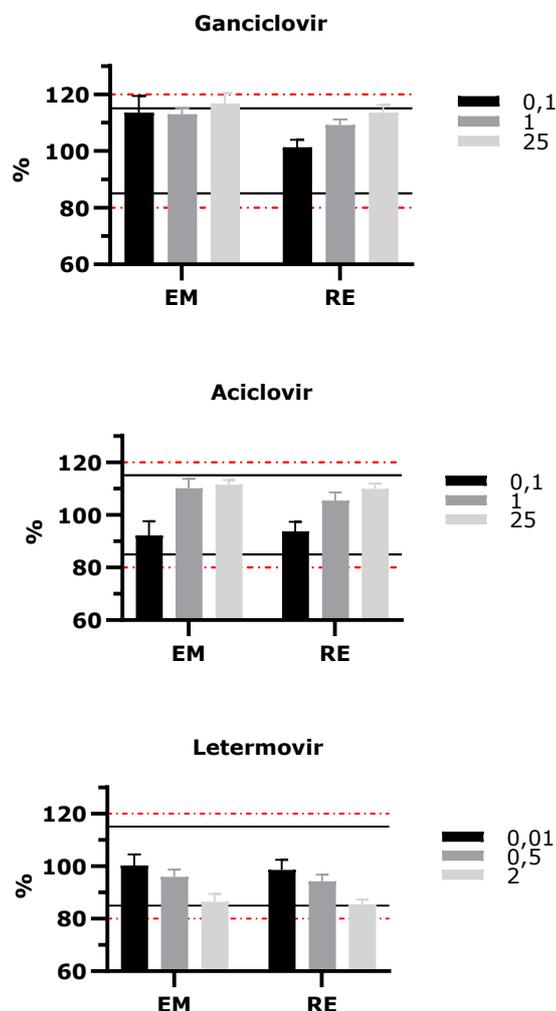


Figura 38. Representación de los resultados de recuperación (RE) y efecto matriz (ME) para cada analito. Se representa la media y el error estándar para cada concentración. Las líneas discontinuas rojas representan el $\pm 20\%$, mientras que las líneas continuas oscuras representan el $\pm 15\%$.

No se observó pérdida sistemática de sensibilidad para los analitos a temperatura ambiente, 2–8°C o –20°C. Las concentraciones disminuyeron menos de un 15% tras 3 ciclos de congelación/descongelación. Los sobrenadantes fueron estables en el automuestreador durante 72 h y a temperatura ambiente durante 7 días. Aunque la pérdida de señal fue significativa para los tres analitos, se compensó con la pérdida de señal equivalente del estándar interno. La variación media del experimento de reinyección en comparación con las concentraciones iniciales al mes y a los dos meses fue inferior al 10% para los tres analitos.

2.2. Utilidad clínica de la medida de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir en el paciente adulto trasplantado

2.2.1. MATERIALES Y MÉTODOS

La validación clínica consistió en un estudio observacional no dirigido, en el que se evaluó la necesidad de monitorizar, la posible variabilidad intra e interindividual y la interacción con otros fármacos.

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron adultos a los que se administró ganciclovir, aciclovir o letermovir por vía oral una o dos veces al día. El fármaco se midió en muestras de suero de pacientes tratados según la práctica clínica estándar de profilaxis antiviral del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España. Se calcularon las concentraciones mínimas (C_{mín}) para cada paciente. Se recogieron muestras de suero antes de la administración del fármaco en tubos de suero Vacutainer™ con gel separador (Becton Dickinson, Milán, Italia). La muestra se obtuvo en sangre periférica, se centrifugó a 4000 g durante 5 min y se congeló a -20°C hasta su análisis. Las muestras se analizaron en diferentes series analíticas.

Para la validación clínica del ganciclovir, se estudiaron las concentraciones del fármaco en 13 pacientes adultos trasplantados de pulmón (51 años, rango de edad 44–61 años) que recibieron valganciclovir (profármaco del ganciclovir) 450 mg dos veces al día. El 39% de los pacientes fueron mujeres. Para la validación de aciclovir y letermovir, se incluyeron 11 receptores adultos de trasplante de progenitores hematopoyéticos o enfermedad hematológica para cada uno de los fármacos. La dosis profiláctica de valaciclovir (profármaco del aciclovir) fue de 200 o 400 mg dos veces al día. El letermovir se suministró diariamente por vía oral en comprimidos de 480 mg. En la cohorte de pacientes tratados con valaciclovir, el 27% de los cuales fueron mujeres, la mediana de edad fue de 62 años (rango de edad 18–67 años). Los pacientes tratados con letermovir tuvieron una mediana de edad de 51 años (rango de edad 18–67 años), el 27% fueron mujeres. La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio fueron tratados con ambos antivirales simultáneamente.

Se evaluó la variabilidad intra e interindividual del letermovir en seis pacientes que tomaban aciclovir y letermovir de forma concomitante. Se realizaron un mínimo de 3 mediciones seriadas durante 15 días.

El protocolo de recogida, almacenamiento y análisis de las muestras fue aprobado por el Comité de Ética (CEIC) del Hospital Vall d'Hebron [EOM(AG)028/2024(6269)]. El estudio se realizó de acuerdo con la legislación española y europea, y los principios de la Declaración de Helsinki.

2.2.2. RESULTADOS

El método desarrollado se aplicó en 79 muestras clínicas obtenidas en el Hospital Universitario Vall d'Hebron. Se descartaron los pacientes con alteraciones hepáticas graves (definidas como Child–Pugh clase C) o moderadas (definidas como Child–Pugh clase B) junto con alteraciones renales moderadas (<50 ml/min).

En particular, se midieron las concentraciones de ganciclovir en 21 muestras de suero. La **tabla 7** muestra las características demográficas y las pruebas de laboratorio habituales de los pacientes. El 69,2% de los pacientes fueron seropositivos al CMV (n = 9). La carga viral de CMV fue no detectable mediante un ensayo por PCR a tiempo real (AltoStar®) en todos los pacientes y muestras. La Cmín mediana de los pacientes fue de 0,20 mg/L (0,10–0,85 mg/L). Los valores individuales se representan en la **figura 39**.

Se realizaron 26 mediciones de aciclovir en 11 pacientes. Sus características demográficas y pruebas adicionales de laboratorio se muestran en la **tabla 7**. La mediana de la Cmín fue de 0,28 mg/L. Las concentraciones variaron entre 0,10 mg/L y 0,73 mg/L (**figura 39**).

Por último, se midieron las concentraciones de letermovir en 32 muestras de suero de 11 pacientes. La **tabla 7** muestra las características demográficas y pruebas de laboratorio rutinarias. Todos los pacientes eran seropositivos a CMV. La carga viral de CMV en sangre total fue no detectable (n = 9), inferior a <500 UI/ml (n = 1) o ≥ 500 UI/ml (n = 1, 2.026 UI/ml). Los valores medidos correspondieron a Cmín de letermovir, con una concentración mediana de 0,29 mg/L (intervalo, 0,05–2,17 mg/L) (**figura 39**).

Tabla 7. Características demográficas y pruebas de laboratorio rutinarias de los pacientes tratados con ganciclovir, aciclovir y letermovir.

	Unidades	Ganciclovir	Aciclovir	Letermovir
<u>Sexo</u>	% mujeres	39 (n = 5)	27 (n = 3)	27 (n = 3)
<u>Edad</u>	Años	51 (46–56)	62 (38 – 65)	51 (31 – 65)
<u>Filtrado glomerular</u>	mL/min/ 1,73m ²			
G1	≥90, %	100 (n = 13)	72,7 (n = 8)	90,9 (n = 10)
G2	60–89, %	--	18,2 (n = 2)	9,1 (n = 1)
G3a	45–59, %	--	--	--
G3b	30–44, %	--	--	--
G4	15–29, %	--	9,1 (n = 1)	--
G5	<15, %	--	--	--
<u>Pruebas de laboratorio</u>				
ALT	U/L	42,0 (29,0–61,0)	43,0 (15,5–58,0)	21,0 (11,5 – 29,5)
AST	U/L	20,0 (15,0–30,0)	38,0 (19,0–41,5)	15,0 (14,0–28,5)
GGT	U/L	95 (57–152)	234 (178–348)	135 (80–218)
ALP	U/L	94 (60–121)	106 (82–142)	84 (66–116)
Bilirrubina directa	mg/dl	0,13 (0,10–0,17)	0,16 (0,14–0,26)	0,16 (0,10–0,27)
Bilirrubina total	mg/dl	0,39 (0,35–0,50)	0,42 (0,32–0,56)	0,42 (0,29–0,58)
Urea	mg/dl	47 (46–59)	27 (22–47)	19 (13–29)
Hemoglobina	g/dl	11,2 (10,3–11,6)	9,3 (8,4–10,4)	8,7 (8,0–9,4)
Recuento de leucocitos	x10 ⁹ /L	7,6 (6,9–9,8)	2,1(1,4–3,2)	1,9 (0,0–2,7)
Recuento de plaquetas	x10 ⁹ /L	398 (250–475)	40 (20–56)	47 (14–61)

G1–G5, categoría de enfermedad renal crónica (ERC) basadas en el filtrado glomerular (*glomerular filtration rate*, GFR) conforme a la guía KDIGO 2024. ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma-glutamil transferasa. La tabla incluye mediana y rango intercuartílico de las magnitudes.

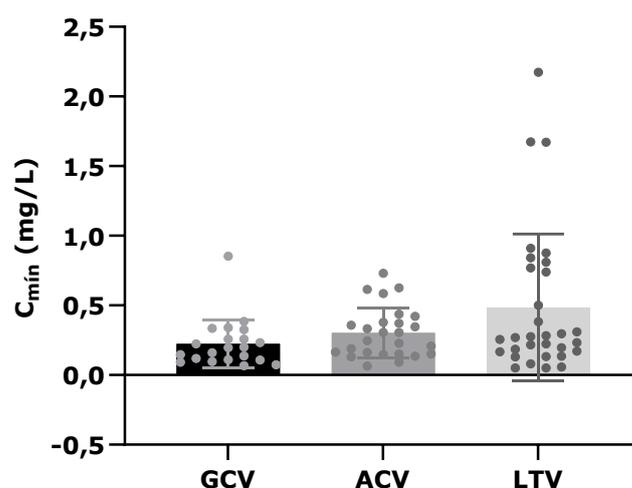


Figura 39. Mediciones individuales de los resultados de ganciclovir, aciclovir y letermovir. En la figura se representan la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos por fármaco. Cmín, concentración mínima de fármaco.

Finalmente, se observó una elevada variabilidad intraindividual en los resultados de pacientes tratados con letermovir, representados gráficamente en la **figura 40**.

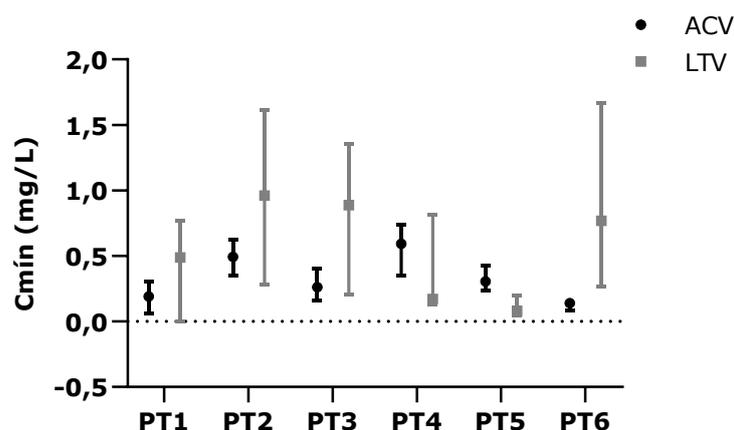


Figura 40. Mediana e intervalo intercuartílico de las mediciones de aciclovir (ACV) y letermovir (LTV) en seis pacientes adultos incluidos en el estudio. PT, paciente; Cmín, concentración mínima.

2.2.2.1. Hallazgos casuales en pacientes tratados con letermovir: interacción farmacológica y toxicidad hepática

Dado el reducido número de pacientes estudiados, solo se observó un caso de interacción con tacrolimus, pero de notable repercusión. Fue una paciente de 54 años, tratada profilácticamente con 480 mg de letermovir cada 24 horas durante 100 días. La PCR fue negativa para CMV mínimo durante 6 meses de seguimiento, con serología positiva. Tras el inicio del tratamiento con letermovir se obtuvieron Cmín de letermovir de 5,91 mg/L el día +3 y 11,28 mg/L el día +7, coincidiendo con elevaciones de la concentración del inmunosupresor tacrolimus a valores tóxicos (superiores a 20

ng/mL) los mismos días: 21,6 ng/ml el día +3 y 40,7 ng/ml el día +7. El tacrolimus se había mantenido sin cambio de dosis, presentación o vía de administración. Tras esta observación, se retiró el letermovir y las concentraciones de tacrolimus bajaron inmediatamente a 11,1 ng/ml el día de la retirada de letermovir, 11,8 ng/ml el día +10 tras la retirada y 10,9 ng/ml el día +14 tras la retirada. Presentaba función hepática completamente normal, función renal alterada (filtrado glomerular estimado de 30) y un peso corporal de sólo 38,8 kg.

También se observó un caso de toxicidad hepática en un paciente de 20 años tratado profilácticamente con 480 mg de letermovir cada 24 horas durante 100 días. La PCR fue negativa para CMV durante los 5 meses de seguimiento, con serología positiva. Tras el inicio de la administración de letermovir se obtuvieron $C_{mín}$ de 0,51 mg/L el día +20, 1,26 mg/L el día +32, 5,65 mg/L el día +45, y 4,78 mg/L el día +100. Se halló una destacada alteración de las enzimas hepáticas, coincidiendo con los cambios producidos en la concentración sérica de letermovir (**figura 41**).

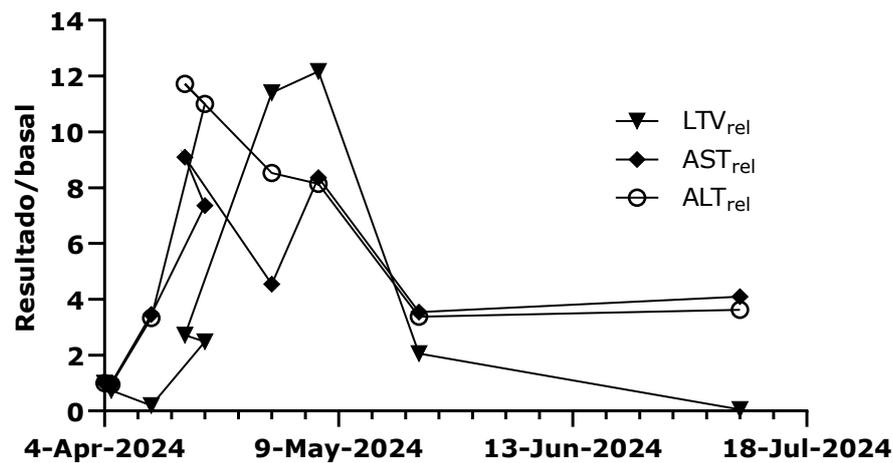


Figura 41. Evolución de las concentraciones séricas de letermovir y las enzimas hepáticas AST y ALT. ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; LTV, letermovir. Se expresan como concentración relativa, cociente entre resultado puntual y el resultado basal.

3. Optimización de la suplementación vitamínica en población adulta mediante la medida de las vitaminas A, E, B1 y B6

3.1 MATERIALES

Las cuatro vitaminas propuestas en este proyecto tienen en común su análisis rutinario por métodos cromatográficos. Aunque actualmente se siguen desarrollando métodos *in-house* para su medida, numerosos fabricantes de reactivos comercializan kits multianalitos por HPLC-UV, HPLC-FLD y LC-MS/MS completamente validados y preparados para su uso (Immuchrom, RECIPE, Chromsystems, Eureka, etc.). En este trabajo, se utilizará la metodología HPLC-UV para el análisis de vitaminas A y E, y HPLC-FLD para el análisis de vitaminas B1 y B6 mediante dos kits IVD comercializados por Chromsystems.

Se utilizó el kit Chromsystems *Vitamins A and E in Serum/Plasma HPLC Reagent* para medir simultáneamente la vitamina A (medida como retinol) y la vitamina E (medida como alfa-tocoferol, alfa-T); mientras que el TPP, vitámero⁴ de la vitamina B1, y el piridoxal 5'-fosfato, vitámero de la vitamina B6, se analizaron utilizando el kit de Chromsystems *Vitamin B1 in Whole Blood and Vitamin B6 in Whole Blood/Plasma - UHPLC Reagent* (Chromsystems Instruments & Chemicals, Munich, Alemania).

El fabricante proporcionó reactivos de pretratamiento, calibradores, estándares internos y controles de calidad internos en ambos kits de reactivos. Los métodos son trazables a materiales certificados y métodos de referencia por HPLC y se han validado de acuerdo con la normativa europea IVDR 2017/746. Nuestro laboratorio está acreditado según la norma UNE-EN ISO 15189:2022.

Los materiales de control externo fueron proporcionados por el programa EQA alemán Instand, con una periodicidad trimestral (<https://www.instand-ev.de/en/instand-eqas/eqa-program/>). Se utilizaron dos esquemas: Vitaminas 01–290 (suero, para vitaminas A y E) y Vitaminas 02–291 (sangre total, para vitaminas B1 y B6). El proveedor definió los valores objetivo y calculó el índice de desviaciones estándar (IDS o *Z-score*) respecto a otros participantes.

⁴ Los vitámeros son compuestos químicamente relacionados que tienen funciones vitamínicas, con diferente grado de actividad.

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Análisis por cromatografía líquida

El retinol y el alfa-tocoferol se detectaron mediante absorción ultravioleta, mientras que el TPP y el piridoxal 5'-fosfato (*pyridoxal 5'-phosphate*, PLP) se analizaron con un detector de fluorescencia. La separación cromatográfica se realizó con una o dos fases móviles, y en una columna de fase reversa. El tiempo total de elución cromatográfica fue de 4 minutos por muestra para el ensayo retinol/alfa-T y de 3,5 minutos para el ensayo TPP/PLP.

Verificación analítica del método

Se realizó el estudio de la precisión, la veracidad y el error total de las vitaminas A, E, B1 y B6 siguiendo las directrices de la Sociedad Española de Medicina del Laboratorio (SEQC^{ML})¹³²⁻¹³⁴. Se estimó la imprecisión interdiaria mediante la medición de dos controles internos (a diferente concentración) durante 15 días por duplicado ($n = 60$), abarcando un periodo mínimo de 3 meses (diferentes calibraciones, temperatura ambiental, etc.). Se estudió el error aleatorio (EA) midiendo la imprecisión intraserial con una n de 20 repeticiones del mismo vial con dos mezclas de muestras de pacientes. Se estudió la veracidad de los procedimientos de medida mediante el cálculo del error sistemático (ES) a partir de muestras de control de programas de EQA en un periodo de 6 meses o un mínimo de 12 resultados. Finalmente, se calculó el error total (ET) sumando el error aleatorio a la concentración de control más baja estudiada y el error sistemático (**ecuación 4**, capítulo 1.1). Las especificaciones de calidad para la aceptación de la precisión, la veracidad y el error total de las vitaminas se establecieron de acuerdo con las especificaciones de variabilidad biológica obtenidas de la página web <https://biologicalvariation.eu/>, de la European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Las especificaciones de calidad se describen en la **tabla 8**.

Tabla 8. Especificaciones de calidad para las vitaminas A, E, B1 y B6 según variabilidad biológica.

	$CV_{VB(\text{óptimo-mínimo})} (\%)$	$ES_{VB(\text{óptimo-mínimo})} (\%)$	$EMP_{VB(\text{óptimo-mínimo})} (\%)$
Vitamina A	1,5–4,6	3,0–9,1	5,2–15,7
Vitamina E	1,8–5,3	2,3–7,0	5,3–15,8
Vitamina B1	1,3–3,8	1,6–4,9	3,7–11,1
Vitamina B6	3,5–10,5	3,5–10,4	9,2–27,7

CV, coeficiente de variación; EMP, error máximo permitido; ES, error sistemático; VB, variabilidad biológica.

Para la imprecisión intraserial, se utilizó la especificación del fabricante (<3%). El error máximo permitido se calculó mediante la **ecuación 5**¹³⁵:

$$EMP = 1,65 \times CV_{MP} + S_{MP} \quad (5)$$

3.2.2. Sujetos

Se incluyeron en el estudio voluntarios adultos sanos con edades comprendidas entre 18 y 65 años. El reclutamiento tuvo lugar durante un año, desde el 1 de junio de 2023 hasta el 31 de mayo de 2024, en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Vall d'Hebron [PR(AG)188-2023] y se llevó a cabo de acuerdo con la legislación española y europea y los principios de la Declaración de Helsinki.

Los voluntarios para el estudio fueron trabajadores del hospital, incluyendo enfermeros, personal administrativo, de mantenimiento e informático, cocineros, médicos o técnicos de laboratorio. Fueron reclutados e informados por la Unidad Básica de Prevención (UBP) del hospital. Previamente a la extracción, los médicos del departamento les realizaron un cuestionario completo para verificar el estado de salud y hábitos saludables de los voluntarios (**ANEXO I**, cuestionario para el paciente). Por último, se firmó un consentimiento informado por escrito. Los criterios de inclusión fueron: 1) edad entre 18 y 65 años, 2) índice de masa corporal (IMC) inferior a 30 kg/m², 3) evaluación positiva del cuestionario de salud y 4) cumplimiento de un ayuno mínimo de 8 horas. Los criterios de exclusión fueron antecedentes patológicos como enfermedades malabsortivas (Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de intestino corto o cirugías relacionadas, hipercolesterolemia o enfermedad renal, tratamiento farmacológico crónico o de larga duración, y consumo de suplementos vitamínicos.

Se midieron otras magnitudes complementarias en la misma petición analítica. Las concentraciones séricas de las magnitudes bioquímicas, incluidas colesterol total (COL) y triglicéridos (TG), se midieron con reactivos y analizador Siemens (Atellica™ CH 930; Siemens Healthineers, Erlangen, Alemania); mientras que las concentraciones de magnitudes hematológicas, como la hemoglobina (Hb), se midieron con un analizador Sysmex XN-1000 (Sysmex Corporation, Kobe, Japón). Las magnitudes se clasificaron por perfil patológico y se revisaron para cada individuo con el objetivo de identificar y excluir sujetos con patología hepática, renal, malnutrición, dislipemias o inflamación. Finalmente, se calculó la mediana y el rango intercuartílico para cada una de ellas por sexo.

Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer™ con K2EDTA y Vacutainer™ Serum con gel separador (Becton Dickinson, Milán, Italia). Para la medida de las vitaminas, los tubos con gel separador se transportaron y centrifugaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz, y se congelaron a -20°C hasta su análisis; los tubos de K2EDTA se congelaron directamente a -20°C . Las muestras para el estudio se procesaron junto al resto de muestras rutinarias de pacientes, sin tratamiento especial o separación de las mismas. El criterio de aceptación de los resultados fue idéntico al criterio utilizado habitualmente para las muestras de pacientes.

El retinol y el alfa-T se midieron en muestras de suero y se prepararon mediante un único paso de precipitación de proteínas; el TPP y el PLP se midieron en muestras de sangre total. Para su medida, estas muestras requieren de un paso previo de derivatización con un fluoróforo previamente a la precipitación de proteínas y separación del sobrenadante.

3.2.3. Pruebas estadísticas

Los resultados se analizaron utilizando la versión 15.1 del programa estadístico STATA (StataCorp, College Station, Texas, Estados Unidos) y las imágenes se editaron en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, Estados Unidos), versión 10.2.3. Los intervalos de referencia se calcularon por prueba siguiendo el flujo de trabajo descrito en la **figura 42**.

Los valores atípicos se detectaron y excluyeron mediante la prueba de exclusión de Tukey. Para las distribuciones de datos paramétricas, se han utilizado las **ecuaciones 6A y 6B**. Para las distribuciones de datos no paramétricas, se han utilizado las **ecuaciones 6C y 6D**.

$$\text{Valor atípico en el LIN} = Q1 - 1,5 \times IQR \text{ (6A)}$$

$$\text{Valor atípico en el LSN} = Q3 + 1,5 \times IQR \text{ (6B)}$$

$$\text{Valor muy atípico en el LIN} = Q1 - 3 \times IQR \text{ (6C)}$$

$$\text{Valor muy atípico en el LSN} = Q3 + 3 \times IQR \text{ (6D)}$$

en las que LIN y LSN son los límites inferior y superior de normalidad, mientras que IQR, Q1 y Q3 son el intervalo intercuartílico o *interquartile range* en inglés, y los cuartiles 1 y 3 del conjunto de datos.

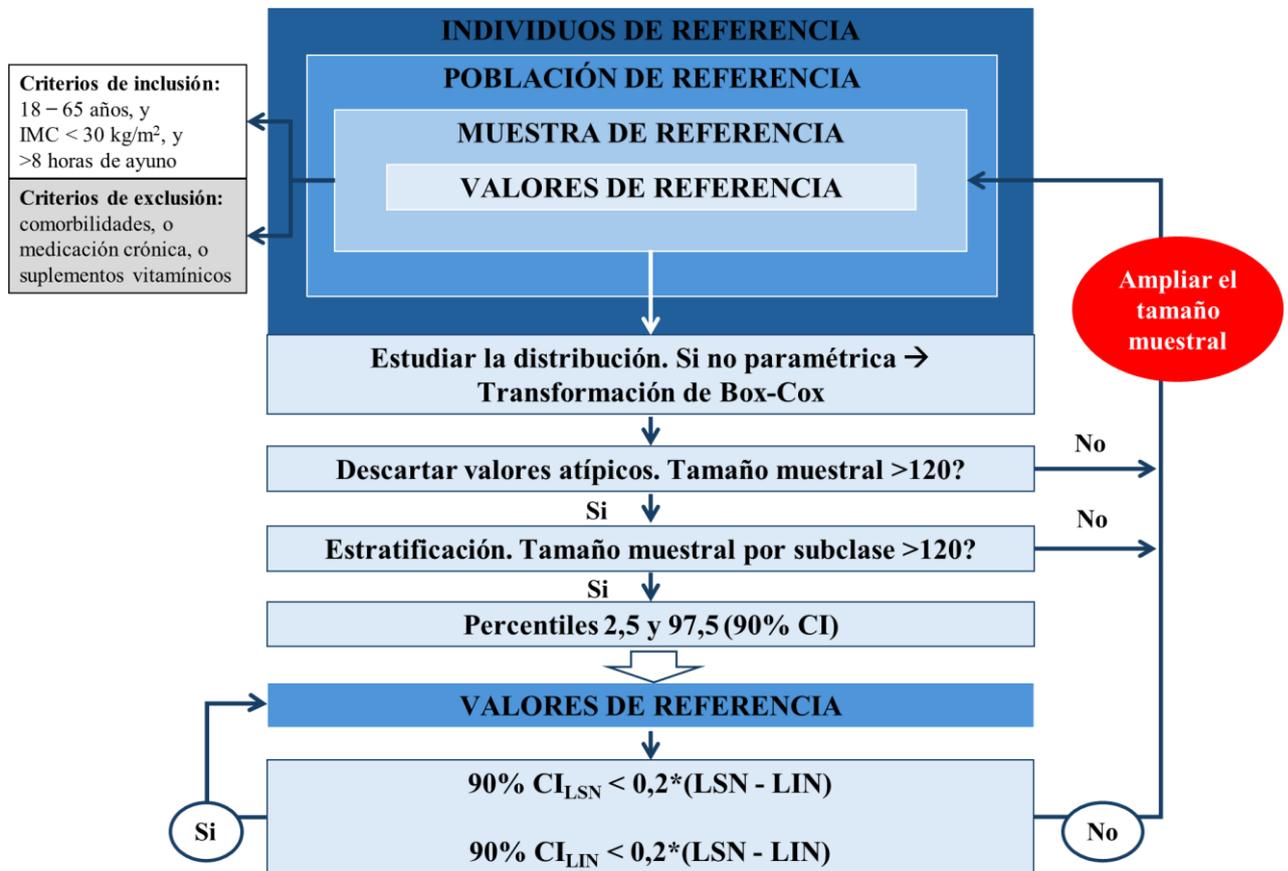


Figura 42. Flujo de trabajo para el cálculo de valores de referencia por metodología directa. Incluye los criterios de inclusión y exclusión establecidos en este estudio. CI, intervalo de confianza; IMC, índice de masa corporal; LIN, límite inferior de normalidad; LSN, límite superior de normalidad.

Se utilizó la inspección visual y estadísticas descriptivas para evaluar la necesidad de estratificación de las magnitudes (sexo y edad). Para comprobar la normalidad, se utilizó la prueba estadística de Saphiro–Wilk debido al tamaño de la muestra. Se consideró significación estadística un p-valor <0,05. Si la distribución fue no paramétrica, se normalizaron los datos mediante transformación de Box–Cox. Los límites inferior y superior de normalidad se estimaron como los percentiles 2,5 y 97,5. Se calcularon los intervalos de confianza al 90% (*90 percent confidence interval*, 90% CI) para ambos límites por magnitud y parámetro. Para las magnitudes con distribución no paramétrica, también se calcularon los valores de referencia utilizando el método no paramétrico recomendado por el CLSI¹¹⁵. Se calculó la relación de sesgos (*bias ratio*, BR) para los límites inferior y superior de los VR para evaluar las diferencias entre los actualmente usados y los calculados (**ecuaciones 7–9**).

$$SD_{IR} = \frac{LSN_{REF} - LIN_{REF}}{3,92} \quad (7)$$

$$BR_{LIN} = \frac{LIN_{REF} - LIN}{SD_{IR}} \quad (8)$$

$$BR_{LSN} = \frac{LSN_{REF} - LSN}{SD_{IR}} \quad (9)$$

en las que SD_{IR} es la desviación estándar del intervalo de referencia (IR). LIN y LSN son los límites inferior y superior de normalidad, mientras que REF es la referencia.

El alfa-T corregido por la concentración de lípidos se calculó a partir de la concentración de alfa-T ($\mu\text{mol/L}$) dividida entre el colesterol total (cociente alfa-T/COL, **ecuación 10**) o la concentración de lípidos totales (colesterol + triglicéridos, cociente alfa-T/LT, **ecuación 11**), en $\mu\text{mol}/\text{mmol}$. El TPP se corrigió mediante el cociente entre la concentración de TPP (ng/L) dividida por la hemoglobina (g/L), en ng/g de hemoglobina (**ecuación 12**).

$$\text{Cociente alfa-T/COL } (\mu\text{mol}/\text{mmol}) = \frac{\text{concentración de alfa-T en suero } (\mu\text{M})}{\text{concentración de colesterol en suero } (\text{mM})} \quad (10)$$

$$\text{Cociente alfa-T/LT } (\mu\text{mol}/\text{mmol}) = \frac{\text{concentración de alfa-T en suero } (\mu\text{M})}{\text{concentración de colesterol en suero } (\text{mM}) + \text{concentración de triglicéridos en suero } (\text{mM})} \quad (11)$$

$$\text{Cociente TPP/Hb } (\text{ng}/\text{g}) = \frac{\text{concentración de TPP en sangre total } (\text{ng}/\text{L})}{\text{concentración de hemoglobina } (\text{g}/\text{L})} \quad (12)$$

Validación clínica de los intervalos de referencia

Se extrajeron del SIL los resultados de las cuatro vitaminas entre los años 2019 y 2024. Se seleccionaron únicamente muestras de adultos, con preanalítica correcta y resultado cuantificable (se excluyó si estaba fuera del intervalo de medida). También se eliminaron los duplicados (pacientes únicos). El tamaño muestral final fue de 5984 pacientes para la vitamina A, 6398 pacientes para la vitamina E, 2945 para la vitamina B1 y 2053 para la vitamina B6. Se aplicaron ambos VR, los actualmente informados y los calculados. Se calcularon los resultados patológicos o *flagging rates*,

es decir, los resultados de pacientes que se encuentran fuera del intervalo de referencia, y se compararon las proporciones por el test de Chi-cuadrado.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Verificación analítica del método

Los resultados del programa EQA-Instand en los años de duración de estudio, 2023 y 2024, fueron satisfactorios (IDS <2 para todos los resultados).

Los resultados de error aleatorio, imprecisión interdiaria, error sistemático y error total se detallan en la **tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de error aleatorio, error sistemático y error total para las cuatro vitaminas estudiadas.

	<i>EA_[baja]</i> (CV, %)	<i>EA_[alta]</i> (CV, %)	<i>CV_[baja]</i> (%)	<i>CV_[alta]</i> (%)	<i>ES_{QCexterno}</i> (%)	<i>ET</i> (%)
<i>Vitamina A</i>	3,11	1,93	3,92	5,97	8,2	13,3
<i>Vitamina E</i>	4,27	2,82	5,83	6,98	-0,4	7,4
<i>Vitamina B1</i>	0,44	0,39	4,73	5,58	-1,5	2,2
<i>Vitamina B6</i>	0,56	0,39	5,49	4,97	-2,0	2,9

CV, coeficiente de variación; EA, error aleatorio; ES, error sistemático; ET, error total; QC, control de calidad.

3.3.2. Cálculo de valores de referencia para vitaminas y parámetros relacionados

Los datos demográficos y las pruebas analíticas de los sujetos incluidos en el estudio se detallan en la **tabla 10**. Las mujeres representaron el 63,7% de todos los participantes, con una mediana de edad de 39,2 años; la proporción de hombres fue del 36,3%, con una mediana de edad de 41,6 años. Para evaluar la variable confusora edad, los participantes se dividieron en cuatro grupos: 18–29 años (n = 33, 22,6%), 30–39 años (n = 40, 27,4%), 40–49 años (n = 38, 26,0%) y 50–65 años (n = 35, 24,0%). No se excluyó ningún voluntario por perfil patológico. Todas las magnitudes bioquímicas mostraron diferencias estadísticamente significativas por sexo a excepción del colesterol. Ni el recuento de linfocitos ni los marcadores de inflamación—recuento de leucocitos, neutrófilos y plaquetas—mostraron diferencias estadísticamente significativas por sexo ($p > 0,05$).

Tabla 10. Estadística descriptiva y comparativa de pruebas de laboratorio entre voluntarias y voluntarios, expresadas como mediana y rango intercuartílico (entre paréntesis).

	Unidades	Mujeres	Hombres	p-valor
<u>Sexo</u>	%	63,7 (n = 93)	36,3 (n = 53)	0,0014
<u>Edad</u>	Años	39,2 (11,5)	41,6 (10,7)	0,1595
18–29	%	26,9	15,1	0,1269
30–39	%	25,8	30,2	
40–49	%	26,9	24,5	
50–65	%	20,4	30,2	
<u>Función hepática</u>				
ALT	U/L	15 (6)	24 (15)	<0,0001
AST	U/L	18 (6)	22 (7)	0,0004
GGT	U/L	14 (6)	21 (14)	0,0186
ALP	U/L	56 (20)	62 (21)	0,0250
<u>Función renal</u>				
Creatinina	mg/dl	0,7 (0,1)	0,9 (0,2)	<0,0001
Urea	mg/dl	32 (9)	37 (10)	0,0013
<u>Factores nutricionales</u>				
Eritrocitos	$\times 10^{12}/L$	4,5 (0,4)	4,9 (0,3)	<0,0001
Hemoglobina	g/dl	13,3 (1,2)	14,9 (0,9)	<0,0001
Linfocitos	$\times 10^9/L$	1,8 (0,7)	1,8 (0,6)	0,9700
<u>Metabolismo lipídico</u>				
Colesterol	mg/dl	178 (35)	189 (50)	0,4453
Colesterol-HDL	mg/dl	68 (14)	55 (21)	<0,0001
Colesterol-LDL	mg/dl	101 (32)	109 (44)	0,0162
Triglicéridos	mg/dl	64 (37)	79 (41)	0,0056
<u>Marcadores de inflamación</u>				
Recuento de leucocitos	$\times 10^9/L$	5,5 (1,8)	5,8 (1,8)	0,3973
Recuento de neutrófilos	$\times 10^9/L$	3,0 (1,2)	3,0 (1,2)	0,6306
Recuento de plaquetas	$\times 10^9/L$	239 (66)	233 (73)	0,8118

Se consideró significación estadística $p < 0,05$. Las variables continuas se expresan como mediana y rango intercuartílico (IQR). Se utilizó el test de Mann–Whitney para evaluar las diferencias entre variables continuas. Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para evaluar las variables categóricas. ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; HDL, lipoproteína de alta densidad; GGT, gamma-glutamil transferasa; LDL, lipoproteína de baja densidad.

Los valores atípicos detectados según las ecuaciones 6A–D se muestran en la tabla 11. El porcentaje de valores atípicos fue de entre el 2,2% y el 5,9%. En la tabla, se especifican el tamaño muestral inicial y final por magnitud y cociente. Estratificados por intervalos de edad y sexo, los porcentajes de valores atípicos por subclase fueron de máximo un 4,1% para el alfa-T en el intervalo de edad de entre 50 y 65 años.

Tabla 11. Resumen de los valores atípicos detectados, estratificados por sexo y rangos de edad.

	TPP	PLP	Retinol	Alfa-T	TPP/Hb	Alfa-T/COL	Alfa-T/LT
<i>Tamaño muestral inicial</i>	146	146	146	146	139	142	140
<i>Tamaño muestral final</i>	141	138	137	139	135	138	137
<i>Valores atípicos</i>	3,3% (n = 5)	5,3% (n = 8)	5,9% (n = 9)	4,6% (n = 7)	3,0% (n = 4)	2,9% (n = 4)	2,2% (n = 3)
<i>M</i>	2,1% (n = 3)	3,4% (n = 5)	3,4% (n = 5)	2,1% (n = 3)	0,7% (n = 1)	0,7% (n = 1)	1,5% (n = 2)
<i>F</i>	1,4% (n = 2)	2,1% (n = 3)	2,7% (n = 4)	2,7% (n = 4)	0,7% (n = 1)	2,2% (n = 3)	0,7% (n = 1)
<i>18–29</i>	1,4% (n = 2)	1,4% (n = 2)	0,7% (n = 1)	0%	0,7% (n = 1)	0,7% (n = 1)	0,7% (n = 1)
<i>30–39</i>	0%	1,4% (n = 2)	1,4% (n = 2)	0%	0%	0%	0,7% (n = 1)
<i>40–49</i>	0%	2,1% (n = 3)	1,4% (n = 2)	0,7% (n = 1)	0%	0%	0%
<i>50–65</i>	2,1% (n = 3)	0,7% (n = 1)	2,7% (n = 4)	4,1% (n = 6)	0,7% (n = 1)	2,2% (n = 3)	0,7% (n = 1)

Alfa-T, alfa-tocoferol; COL, colesterol; Hb, hemoglobina; LT, lípidos totales; PLP, piridoxal 5'-fosfato; TPP, tiamina pirofosfato. M, sexo masculino; F, sexo femenino.

Las cuatro vitaminas incluidas en este estudio mostraron una distribución paramétrica (**figura 43**) tras descartar los valores atípicos, mientras que los cocientes mostraron desviación de la normalidad ($p > 0,05$). En la figura se muestran ejemplos de cada distribución mediante una gráfica cuantil-cuantil. Si la distribución de la variable es paramétrica, se obtiene una línea recta de puntos (ejemplo de la TPP y el retinol). Si la distribución es no paramétrica, se observan desviaciones de la recta central que representa la distribución normal teórica (ejemplo de los cocientes alfa-T/COL y TPP/Hb).

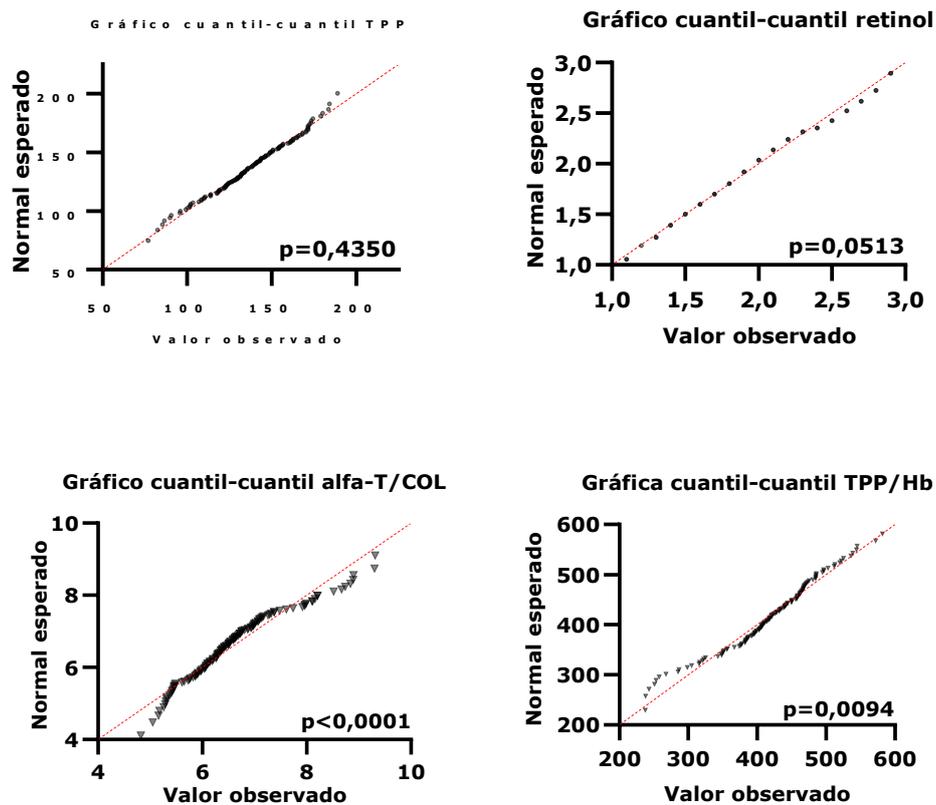


Figura 43. Gráficos cuantil-cuantil para tiamina pirofosfato (TPP), retinol, cociente alfa-tocoferol/colesterol (alfa-T/COL), y cociente TPP/Hb. El p-valor hace referencia a la prueba estadística de normalidad de Saphiro–Wilk.

No se realizó ninguna partición por sexo (**figura 44**) o edad (**figura 45**). En ambas figuras, el valor de $L(\lambda)$ es igual a 1,727214 para el cociente TPP/Hb, $-1,14114$ para el cociente alfa-T/LT, y $-1,142716$ para el cociente alfa-T/COL, conforme a la transformación de Box–Cox realizada.

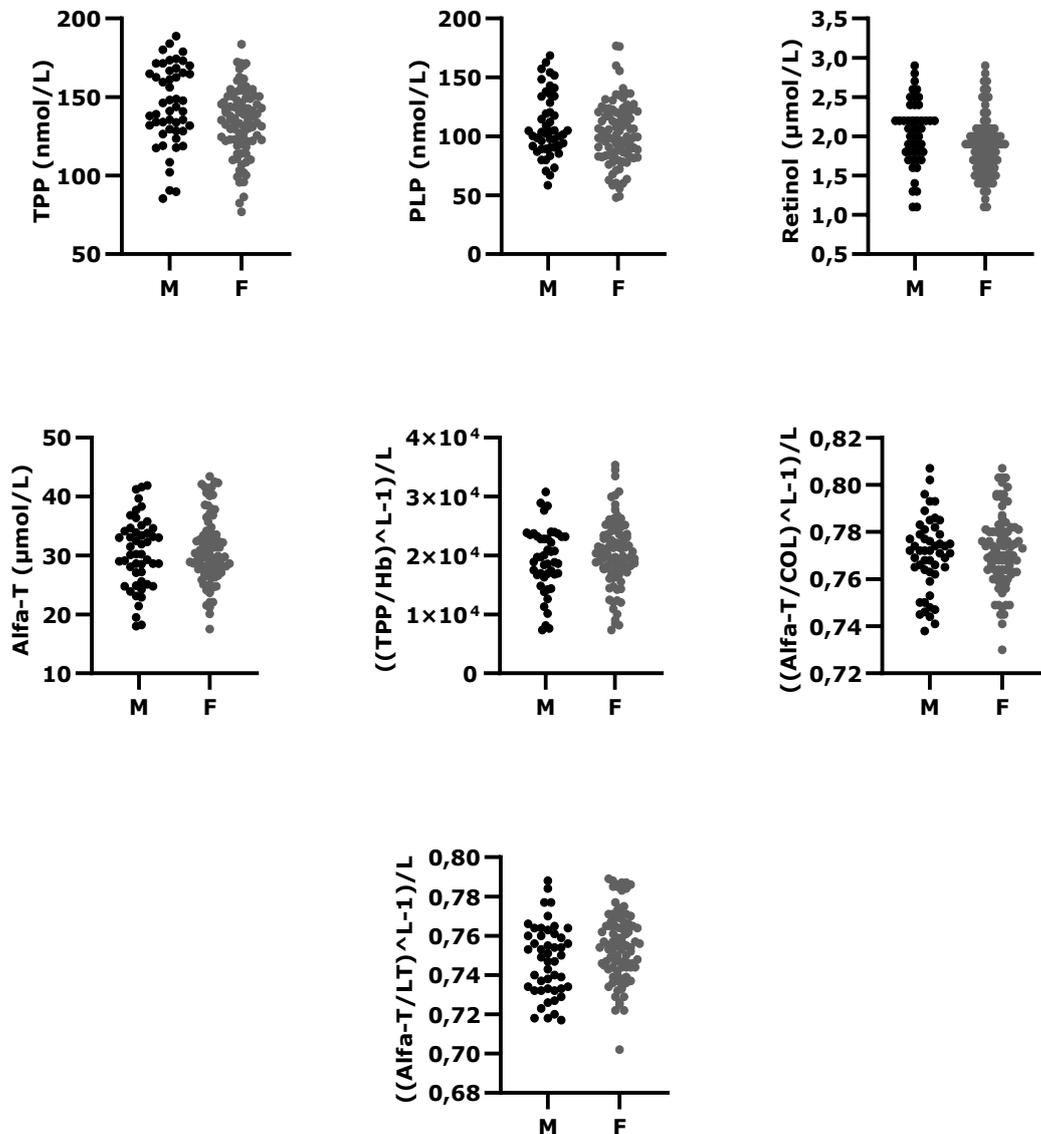


Figura 44. Distribución de los datos por sexo para todas las vitaminas y cocientes. M, sexo masculino; F, sexo femenino. Alfa-T, alfa-tocoferol; COL, colesterol; Hb, hemoglobina; LT, lípidos totales; PLP, piridoxal 5'-fosfato; TPP, tiamina pirofosfato.

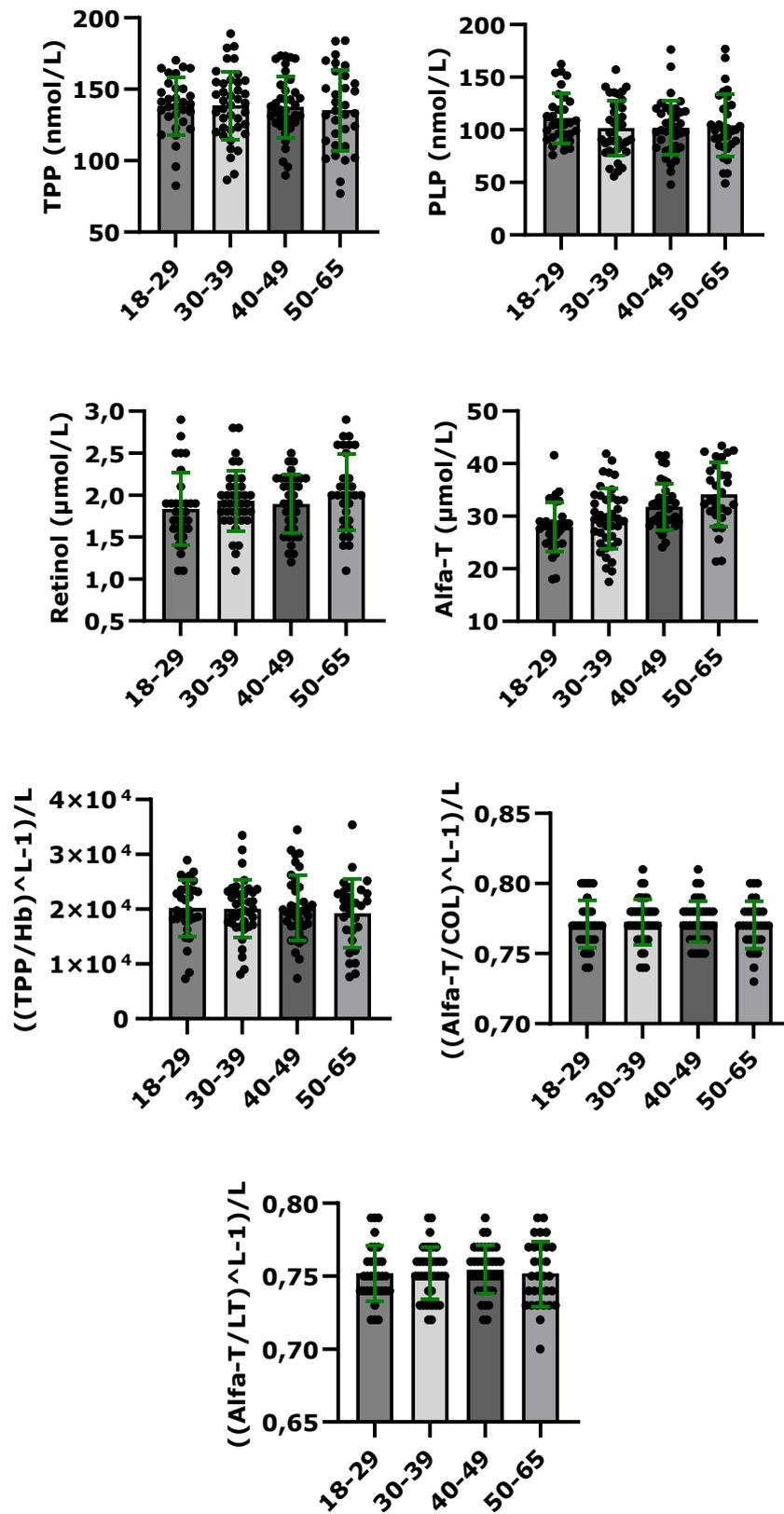


Figura 45. Distribución de los datos por edad para todas las vitaminas y cocientes. Alfa-T, alfa-tocoferol; COL, colesterol; Hb, hemoglobina; LT, lípidos totales; PLP, piridoxal 5'-fosfato; TPP, tiamina pirofosfato. Las líneas verdes representan la desviación estándar de la media de cada subgrupo de datos.

Los intervalos de referencia calculados se detallan en la **tabla 12**, que especifica el tamaño muestral para cada vitamina y cociente tras la eliminación de valores atípicos. Se estimaron los 90% CI para los límites de referencia inferior y superior (detallados bajo cada límite de referencia, en la **tabla 12**). Todos los límites inferior y superior fueron estadísticamente diferentes a los límites utilizados actualmente ($BR > 0,375$), excepto en los casos del límite inferior de alfa-T y PLP. En todos los límites de referencia, la anchura del 90% CI fue inferior a 0,2 veces la anchura del intervalo de referencia.

Tabla 12. Intervalos de referencia actualmente informados e intervalos de referencia calculados para vitaminas y cocientes. Para cada límite inferior y superior se indican intervalos de confianza al 90% (90% CI).

Vitamina/Cociente	Unidades	VR _{informados}	n	LIN	LSN
Retinol (Vitamina A)	$\mu\text{mol/L}$	1,6–2,5	137	1,1	2,8
				1,1–1,3	2,7–2,9
Alfa-T (Vitamina E)	$\mu\text{mol/L}$	18,6–46,2	139	18,9	42,2
				17,6–21,4	41,6–43,2
Cociente alfa-T/COL	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	N.I.	138	5,2	8,9
				4,9–5,3	8,6–9,3
Cociente alfa-T/LT	$\mu\text{mol}/\text{mmol}$	N.I.	137	4,5	7,4
				4,2–4,6	7,3–7,5
TPP (Vitamina B1)	nmol/L	78–144	141	85,9	181,6
				78,1–95,8	173,3–187,8
Cociente TPP/Hb	ng/g	N.I.	135	246,2	561,1
				237,4–269,7	535,0–588,8
PLP (Vitamina B6)	nmol/L	51–183	138	57,0	165,7
				48,2–60,9	155,2–176,6

Alfa-T, alfa-tocoferol; COL, colesterol; Hb, hemoglobina; LIN, límite inferior de normalidad; LSN, límite superior de normalidad; LT, lípidos totales; PLP, piridoxal 5'-fosfato; TPP, tiamina pirofosfato; VR, valores de referencia. N.I., no informado.

Los cocientes TPP/Hb, alfa-T/COL y alfa-T/LT mostraron una distribución no paramétrica de los datos y por lo tanto los VR se calcularon además por el método no paramétrico. Los LIN para los cocientes TPP/Hb, alfa-T/COL y alfa-T/LT fueron 243 ng/g, 5,2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, y 4,5 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$; mientras que los LSN fueron de 572 ng/g, 8,8 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ y 7,4 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$, respectivamente.

Ningún límite inferior ni superior mostró diferencias significativas respecto a los límites calculados mediante percentiles (BR $\ll 0,375$).

3.3.3. Aplicación clínica de los intervalos de referencia

En cuanto a la aplicación clínica de los VR calculados, se encontraron porcentajes de resultados patológicos de hasta un 53,3% y un 51,8% para la vitamina A y la vitamina B1 aplicando los VR informados actualmente, que se redujo hasta un 26,7% y un 23,5%, respectivamente, aplicando los VR calculados en este estudio. Para las vitaminas E y B6, en cambio, los *flagging rates* fueron superiores aplicando los VR calculados (**tabla 13**).

Tabla 13. Porcentaje de resultados patológicos en una cohorte independiente de pacientes.

		Resultados patológicos (<i>flagging rates</i>)		
		Según VR actualmente informados	Según VR calculados	p-valor
Retinol (Vitamina A)	n	3188	1589	<0,001
n total = 5984	%	53,3	26,7	
Alfa-T (Vitamina E)	n	878	1230	<0,001
n total = 6398	%	13,7	19,2	
TPP (Vitamina B1)	n	1525	692	<0,001
n total = 2945	%	51,8	23,5	
PLP (Vitamina B6)	n	265	386	<0,001
n total = 2053	%	12,9	18,8	

VR, valores de referencia.

Por otro lado, se obtuvieron porcentajes de resultados patológicos del 27% para el cociente alfa-T/COL, 23,9% para alfa-T/LT, y 25,1% para TPP/Hb.

DISCUSIONES

Capítulo 1

Para garantizar una exposición adecuada, en pediatría se han establecido diferentes nomogramas basados en el peso corporal para determinar la dosis de busulfán^{49,136}. Además de los nomogramas, se puede utilizar la monitorización del fármaco, que mide las concentraciones plasmáticas y estima los parámetros farmacocinéticos de busulfán¹³⁷. En la actualidad, la TDM se aplica en la práctica clínica en diversos hospitales y tiene como objetivo garantizar la exposición terapéutica deseada en función del tipo de trasplante y la enfermedad de base, mediante la individualización del ajuste de dosis en función del cálculo de aclaramiento de la dosis anterior¹³⁶. En nuestro hospital la dosis inicial de busulfán en pediatría se selecciona en función de nomogramas ajustados por peso corporal, y el ajuste de dosis en función de la TDM¹³⁸.

Se presenta en este proyecto un método analítico rápido, sencillo y robusto para monitorizar las concentraciones de busulfán en muestras de plasma por LC-MS/MS. El método descrito cumple los requisitos de veracidad y precisión y se ha validado para su aplicación en la práctica clínica.

Durante la monitorización farmacoterapéutica, es importante minimizar los tiempos de medición, ya que los resultados de los análisis deben ser enviados rápidamente, con el fin de que se puedan realizar cambios en el tratamiento, si fuese preciso. Este método presenta varias ventajas con respecto a otros métodos publicados para la monitorización de la concentración de busulfán mediante LC-MS/MS¹³⁹⁻¹⁴⁷, entre los que se encuentran un menor tiempo de medición. Los resultados se obtienen en menos de una hora y media. En este tiempo se incluyen el transporte y la recepción de la muestra, la preparación del analizador y de la muestra y el tiempo necesario para la verificación de los resultados. Con respecto a los procedimientos de preparación de la muestra, la duración total del tiempo de análisis es de 45 minutos. Otra diferencia importante es que este método emplea elución isocrática con una única fase móvil, por lo que requiere un menor consumo de reactivos y simplifica el procesamiento del método. Además, el intervalo de medida es amplio, reduciendo el número de muestras que es necesario diluir, lo que simplifica aún más la preparación de las muestras y el proceso analítico. También se han evaluado compuestos interferentes endógenos comunes y se han realizado estudios de estabilidad a corto plazo. El método ha mostrado un buen rendimiento analítico entre los años 2020 y 2024.

Respecto a la validación clínica, en las diferentes series de muestras reales no se observaron interferencias endógenas ni exógenas, y tampoco se observó contaminación por arrastre, lo que garantiza la aplicabilidad del método en la práctica clínica. Los resultados de AUC correlacionaron con la dosis administrada (**figura 30**). Tras la administración de 3 mg/kg/24 h, 4 mg/kg/24 h y 5 mg/kg/24 h de busulfán, las AUC obtenidas para el primer día de tratamiento fueron de entre 2.140,0 y 4.376,3 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, entre 3.950,0 y 4.387,3 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, y entre 3.585,8 y 7.897,6 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, respectivamente. Bartelink estableció un AUC acumulado de entre 78 y 101 mg/L \cdot h o 19.001 y 24.604 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$ para garantizar la eficacia y seguridad del paciente⁴⁹. Equivaldría, extrapolado al AUC objetivo diario para un tratamiento de 4 días, a 19,25–25,25 mg/L \cdot h (4.750–6.151 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$)³⁹. En el presente estudio, en cuatro pacientes se fijó un objetivo menor, de 65–75 mg/L \cdot h (15.834–18.270 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), y en once pacientes, de 85–95 mg/L \cdot h (20.706–23.142 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$), dependiendo del régimen de acondicionamiento requerido. Las AUC acumuladas para los cuatro días de tratamiento, tras ajuste de dosis, fueron en global de entre 9.627,1 y 27.173,58 $\mu\text{M}\cdot\text{min}$, alcanzando el objetivo terapéutico el 80% de los pacientes (12/15). Si se tiene en cuenta únicamente el AUC del primer día, sólo seis pacientes habrían alcanzado la exposición deseada a busulfán (40%).

Por otra parte, se realizó un estudio observacional retrospectivo en el que se incluyeron 41 pacientes pediátricos tratados con busulfán entre diciembre de 2020 y mayo de 2023. Este estudio no incluyó pacientes adultos por ser el tratamiento mucho más heterogéneo que en niños, y producirse de forma más frecuente errores preanalíticos en la extracción de muestra. La cohorte de pacientes incluyó niños de diferentes edades, enfermedades de base y regímenes de acondicionamiento (**tabla 4**).

En función del AUC real calculado a partir de las mediciones de busulfán, el ajuste de dosis fue necesario hasta en un 90% de los pacientes para alcanzar el AUC objetivo. La dosis se aumentó de media un 10,2% el primer día. Entre el primer y el cuarto día hubo diferencias en la dosificación de entre –51,5% y +75,5% (**figura 32**). Similares resultados se han observado en otros grupos. En el artículo de Chen et al., el ajuste de dosis fue necesario en el 86% de los pacientes siguiendo una estrategia de ajuste de dosis por TDM¹⁴⁸. En una cohorte de 62 pacientes pediátricos, fue necesario ajustar la dosis de busulfán en un 54% de los pacientes, aunque la exposición adecuada a busulfán no se relacionó con mejores resultados clínicos¹⁴⁹; mientras que en otra cohorte de 34 pacientes pediátricos, se produjo ajuste de dosis en el 68% de los pacientes¹⁵⁰. En otra publicación, compararon la exposición a busulfán midiendo las concentraciones del fármaco únicamente un día frente a la medida durante dos días, y obtuvieron AUC calculadas más próximas a las AUC objetivo en el grupo que se monitorizó durante dos días. En el primer grupo, un 87,6% de los pacientes alcanzaron una exposición terapéutica al busulfán tras ajuste de dosis, respecto al 97,4% en el segundo grupo¹⁵¹.

Respecto a los resultados clínicos, los eventos adversos, considerando el rechazo del injerto y/o fallecimiento, ocurrieron en un 19% de los pacientes, mientras que la tasa de supervivencia fue del 89%. Los resultados obtenidos contrastan con los previamente publicados, en los que la administración de busulfán oral sin monitorización resultó en un porcentaje de eventos adversos mayor, del 30%, y una tasa de supervivencia global significativamente menor, del 53%¹⁵². Nuestros resultados son consistentes con las series en las que se monitoriza busulfán: en una cohorte de 53 pacientes pediátricos sometidos a HSCT se obtuvo una tasa de supervivencia del 96% cuando se monitorizaban diariamente¹⁵³. Iemura et al. estudiaron dos grupos de pacientes tratados con regímenes de acondicionamiento diferentes (busulfán y ciclofosfamida frente a busulfán y fludarabina). Compararon la tasa de supervivencia entre pacientes utilizando por un lado una estrategia de dosificación fija de busulfán y por otro lado una estrategia de dosificación guiada por monitorización. Para los pacientes con régimen de acondicionamiento busulfán y ciclofosfamida, no encontraron diferencias significativas en la tasa de supervivencia. En cambio, en los pacientes tratados con busulfán y fludarabina, obtuvieron una tasa de supervivencia del 57% para el grupo de pacientes con una dosis fija de busulfán, y un 75,1% para los pacientes en los que hubo monitorización¹⁵⁴. Finalmente, aunque no ha sido objeto de nuestro estudio evaluar la toxicidad, puesto que no disponemos de grupo control, la bibliografía nos arroja más información sobre la necesidad de monitorizar el busulfán en niños en este aspecto. En un grupo de 172 niños sometidos a HSCT divididos en dosificación de busulfán por nomogramas según peso (n = 46) y en dosificación guiada por TDM (n = 126), se encontró una proporción significativamente mayor de enfermedad veno-oclusiva en los pacientes sin monitorizar, del 29% frente al 15%, respectivamente¹⁵⁵.

Este estudio está respaldado por profesionales de la Unidad de Oncohematología Pediátrica y el método se está implementando actualmente en la unidad de farmacocinética. Este método permitirá diseñar en el futuro estudios farmacocinéticos, de manera que se minimice la toxicidad, se aumente la eficacia de los tratamientos y se mejoren los resultados de los trasplantes.

La principal limitación de este estudio fue que no se incluyeron pacientes control en el estudio observacional descriptivo, por lo que los resultados obtenidos en cuanto a eventos adversos únicamente se pueden comparar con otros trabajos publicados, pero no con nuestra propia población no monitorizada.

Capítulo 2

Este estudio se diseñó en respuesta a una necesidad clínica y se decidió desarrollar un método para medir simultáneamente ganciclovir, aciclovir y letermovir, antivirales que los clínicos utilizan habitualmente en los receptores de trasplantes.

Se han utilizado diferentes sistemas de medida para analizar los fármacos antivirales, entre ellos la HPLC-UV, HPLC-FLD, y LC-MS/MS son los más ampliamente usados. La LC-MS/MS se considera el método de referencia. A pesar de sus inconvenientes (requiere una elevada inversión inicial, personal experto y es más sensible a posibles incidencias), es exacta, selectiva, precisa y sensible. Nosotros decidimos desarrollar un método rápido y sencillo por LC-MS/MS. Respecto a las publicaciones anteriores, presenta diversas ventajas. Respecto a los métodos por HPLC-UV, es más rápido, sensible y específico (no se han observado interferencias por compuestos endógenos ni exógenos)^{70,156}. Respecto a los métodos por HPLC-FLD, es más rápido y requiere menor volumen de muestra^{157,158}. Este último punto es especialmente importante en hospitales con pacientes pediátricos. Finalmente, respecto a los métodos por LC-MS/MS¹⁵⁹⁻¹⁶⁴, presenta ventajas equivalentes como reducido volumen de muestra, tiempos de elución cortos, análisis de diferentes antivirales simultáneamente y uso de estándares internos marcados isotópicamente para cada analito. A diferencia de los métodos publicados previamente por LC-MS/MS, se ha comprobado la viabilidad del método en la práctica clínica analizando interferencias endógenas comunes, incluyendo tres cohortes homogéneas de pacientes reales, evaluando la estabilidad a diferentes concentraciones y condiciones, así como en muestras de pacientes tratados con antivirales, y verificando la exactitud del método para el aciclovir y el ganciclovir utilizando materiales de control de un programa de aseguramiento de la calidad externo.

El desarrollo de métodos para analizar fármacos estructuralmente diferentes es un reto en nuestro contexto profesional para optimizar los recursos hospitalarios. En este estudio nos enfrentamos a dos retos: la diferencia de hidrofobicidad de las moléculas medidas y el rango terapéutico desconocido del letermovir. En primer lugar, el letermovir es hidrófobo, mientras que el ganciclovir y el aciclovir son hidrófilos (unión a proteínas para GCV y ACV de 1–2 y 9–33%, respectivamente, y de 99% para LTV; el coeficiente de reparto ($\log P$) es $-1,8$ para GCV, $-0,95$ para ACV y $4,58$ para LTV). Por esta razón, se ha añadido un paso final al pretratamiento, en el que el sobrenadante se evapora hasta sequedad y se reconstituye con la fase móvil A. De esta manera, se mejoró significativamente la recuperación del letermovir respecto a la simple dilución del sobrenadante (resultados no mostrados). En segundo lugar, el letermovir está indicado únicamente como profiláctico y no como tratamiento, por lo que las concentraciones esperadas eran bajas. Esta hipótesis se confirmó en nuestro estudio,

lo que condujo a establecer un intervalo de medida menor, con un LLOQ de 0,01 mg/L, respecto a los antivirales ganciclovir y aciclovir. El intervalo de medida seleccionado en este método incluyó tanto concentraciones subterapéuticas como supratrapéuticas y, por lo tanto, cubrió los intervalos de concentración clínicamente útiles. El intervalo de linealidad también abarcó tanto las $C_{mín}$ como las concentraciones máximas ($C_{máx}$) para ACV y GCV (resultados no mostrados para $C_{máx}$).

La precisión y exactitud del método cumplieron las especificaciones de la EMA¹³¹. El efecto matriz fue cercano al 115% para el ganciclovir en las tres concentraciones estudiadas. Por el contrario, el efecto matriz y la recuperación se aproximaron al 85% para concentraciones elevadas de letermovir. En ambos casos, se comprobó la reproducibilidad y el CV (%) fue inferior al 15%. El método demostró ser selectivo, sin que se observaran interferencias significativas. En series de muestras reales no se observó contaminación por arrastre, la variabilidad del estándar interno fue inferior al 10% y la variabilidad del tiempo de retención del analito y del estándar interno fue inferior al 2%. El estudio de integridad de la dilución mostró un rendimiento adecuado, garantizando una medición correcta de la $C_{máx}$ para todos los fármacos, e incluso en caso de extracciones incorrectas.

Respecto a los estudios de estabilidad, no se observó pérdida sistemática de sensibilidad para los analitos a temperatura ambiente, 2–8°C o –20°C. Otros grupos han obtenido las mismas conclusiones para letermovir^{156,160}, aciclovir^{158,164,165} y ganciclovir^{158,164,165}.

Este estudio exploró la monitorización de las concentraciones en la optimización de la terapia preventiva con fármacos antivirales en tres cohortes de receptores de trasplantes. Se encontraron concentraciones mínimas medianas de 0,2 mg/L para ganciclovir, 0,29 mg/L para letermovir y 0,28 mg/L para aciclovir. Estos hallazgos son acordes a estudios previos. Katada et al. estudiaron las concentraciones mínimas de ganciclovir en 24 receptores de trasplantes de pulmón. Encontraron una mediana de 0,38 mg/L en 21 pacientes sin leucopenia, y una mediana de 1,61 mg/L en 3 pacientes con leucopenia¹⁶⁶. En otra publicación, en la que se incluyeron 36 receptores de trasplante renal tratados con 450 mg de valganciclovir al día, se obtuvo una mediana de $C_{mín}$ de ganciclovir de 0,4 mg/L (rango 0,1–2,7)¹⁶⁷. Royston et al. hallaron una $C_{mín}$ de 0,286 mg/L (IQR: 0,131–0,591) en una cohorte de 40 adultos receptores de trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos que recibieron letermovir por vía oral¹⁶⁸. Marty et al. encontraron una mediana más alta de letermovir, de 0,506 mg/L, en 34 pacientes que recibieron 240 mg de letermovir al día¹⁶⁹.

Por otro lado, se inspeccionó visualmente las medidas seriadas de seis pacientes con tratamiento concomitante de letermovir y aciclovir, y se observó una elevada variabilidad intraindividual en las concentraciones séricas de letermovir (**figura 40**) respecto a la variabilidad observada para el

aciclovir en los mismos pacientes. Sin embargo, el coeficiente de variación intraindividual no se ha podido calcular debido al reducido tamaño muestral. En la literatura, Royston *et al.* estimaron la variabilidad interindividual e intraindividual del letermovir en un 84% y un 114%, respectivamente, con una mediana de 8 valores por paciente¹⁶⁸. Aunque la eficacia y la seguridad del letermovir han quedado demostradas en diferentes estudios^{79,170-173}, la elevada variabilidad intraindividual en cohortes homogéneas que reciben la misma dosis sugiere incluso una mayor variabilidad en pacientes complejos con comorbilidades. Se necesitan más estudios para investigarlo y evaluar cómo afecta a los resultados clínicos.

Los casos clínicos de pacientes tratados con letermovir expuestos en este estudio muestran la utilidad de monitorizar el letermovir en pacientes complejos. En el primer caso, la introducción de letermovir produce en el paciente un aumento de la concentración de tacrolimus por encima de niveles nefrotóxicos por probable inhibición del metabolismo a través del CYP3A4. Únicamente se normaliza la concentración de tacrolimus cuando se retira el letermovir. En el segundo caso, a raíz de una alteración hepática probablemente por infección por virus Epstein-Barr, la concentración sérica del letermovir aumenta más de diez veces el nivel basal, prácticamente de forma simultánea a las enzimas hepáticas ALT y AST. Aunque en este paciente no se identificaron interacciones medicamentosas, se puede deducir del comportamiento inductor del fármaco que una larga exposición a concentraciones elevadas de letermovir, afectaría aumentando y/o disminuyendo las concentraciones plasmáticas de fármacos concomitantes con rutas metabólicas y de transporte relacionadas. Por otro lado, se desconoce si la exposición a elevadas concentraciones de letermovir en sangre conlleva efectos secundarios en el paciente.

Los dos hallazgos clínicos encontrados ponen de manifiesto la necesidad de monitorizar la concentración sérica del letermovir e incluso estudiar la farmacocinética del letermovir en determinados casos. Este descubrimiento está en consonancia con artículos publicados previamente. Robbins *et al.* encontraron que el tratamiento crónico con rifampicina contribuía a la disminución del letermovir debido a la inducción del transportador OATP1B¹⁷⁴. Malespini *et al.* propusieron la reducción en la dosificación del tacrolimus cuando los pacientes son tratados concomitantemente con letermovir e inductores moderados del CYP3A4, como fármacos antifúngicos¹⁷⁵. Otro estudio probó que la coadministración de letermovir y atorvastatina incrementó la concentración plasmática de atorvastatina exponiendo así a los pacientes a un mayor riesgo de eventos adversos¹⁷⁶.

Por el contrario, la seguridad y eficacia se ha comprobado en diferentes poblaciones y cohortes de pacientes trasplantados que no han requerido ajustes en la medicación o interrupción del letermovir^{173,177,178}.

Este estudio no está exento de limitaciones. Se ha realizado una validación clínica del método, pero no un estudio farmacocinético, por lo que no se han podido relacionar las concentraciones obtenidas con la infección por antivirales durante el tratamiento completo o a largo plazo. Además, no se han incluido concentraciones máximas de los fármacos, debido a que las medidas realizadas a $C_{máx}$ han sido limitadas o los grupos de pacientes monitorizados muy heterogéneos para un fármaco en concreto.

Capítulo 3

En este estudio, se ha utilizado la metodología HPLC-UV para el análisis de vitaminas A y E, y HPLC-FLD para el análisis de vitaminas B1 y B6 mediante dos kits IVD comercializados por Chromsystems. Aunque actualmente se siguen desarrollando métodos *in-house* para su medida¹⁷⁹⁻¹⁸⁵, la normativa europea 2017/746 exige una clara justificación analítica o clínica del desarrollo de métodos para aquellos analitos que dispongan de métodos comerciales. En el caso de las vitaminas incluidas en este trabajo, los kits comerciales presentan un excelente rendimiento analítico, cumpliendo las especificaciones de calidad en base a la variabilidad biológica y cubriendo las necesidades clínicas de los pacientes.

Se calcularon valores de referencia mediante un enfoque directo para vitaminas que se analizan de forma rutinaria en el laboratorio clínico, así como cocientes que pueden ayudar a la interpretación del resultado. En nuestro laboratorio, que atiende a 1,5 millones de personas, es necesario y obligatorio establecer valores normales para interpretar los resultados de vitaminas, debido a la complejidad y variedad de pacientes tratados. Los valores de referencia (VR) se utilizan habitualmente como límites de decisión, y se asocian a estados de deficiencia, subóptimos o tóxicos¹⁸⁶. Parece que existe consenso sobre los puntos de corte de deficiencia en las vitaminas incluidas en este estudio^{102,187-189}, pero no existen VR ampliamente aceptados para ellos. Se eligió la aproximación directa para el cálculo de VR debido a que las pruebas de vitaminas sólo pueden ser solicitadas por especialistas (pacientes hospitalizados y procedentes de consultas externas, quedando excluida la atención primaria), por lo que los datos del SIL disponibles no cumplirían el requisito básico para el cálculo de VR por métodos indirectos: una elevada proporción de individuos sanos en la base de datos. Como alternativas a la metodología directa, se podrían realizar estudios multicéntricos^{190,191} o utilizar la metodología indirecta siempre que sea posible^{192,193}.

Se reclutaron 146 individuos sanos utilizando criterios de inclusión y exclusión bien establecidos. Para describir la población seleccionada e identificar posibles sesgos en nuestros resultados, se exportaron diversas pruebas de laboratorio relacionadas con el estado nutricional del individuo, clasificadas por grupos patológicos. Los resultados, resumidos en la **tabla 10**, confirmaron la ausencia de enfermedad aguda (marcadores inflamatorios negativos) o crónica (marcadores de función renal y hepática normales). Los voluntarios tampoco mostraron indicios de malnutrición.

Se evaluó la adecuación del tamaño de la muestra para todos los VR calculados. En todos los límites de referencia, la anchura del intervalo de confianza al 90% fue inferior a 0,2 veces la anchura del intervalo de referencia, como recomienda el CLSI¹¹⁵. Este punto es sumamente importante en el cálculo de VR y está influenciado por el tamaño muestral y la dispersión de los datos. Si los intervalos de confianza de los VR no son suficientemente estrechos, sería recomendable aumentar el tamaño muestral, así como realizar una revisión de los valores extremos, como se expone en la **figura 42**. En cuanto a la exclusión de valores atípicos, que tiene un gran impacto en el intervalo de referencia obtenido, el porcentaje de valores excluidos por prueba fue de máximo un 6%, e inferior al 4% si los valores atípicos se estratificaban por subclase (edad y sexo). Por último, no se realizaron particiones por edad ni sexo, ya que no se observaron diferencias ni tendencias positivas o negativas entre los grupos establecidos (**figuras 44 y 45**). Este hallazgo es acorde a estudios anteriores en los que no se recomendaba la estratificación por sexo o edad en las vitaminas estudiadas¹⁹⁴⁻¹⁹⁶.

En nuestro estudio, el intervalo de referencia para la vitamina A fue más amplio que el intervalo utilizado actualmente, mientras que para la vitamina E fue ligeramente más estrecho. Los VR para TPP y PLP mostraron diferencias moderadas para los límites inferiores de normalidad, pero diferencias significativas para los límites superiores sugeridos por el fabricante. Todos los límites inferiores y superiores calculados fueron estadísticamente diferentes a los establecidos por el fabricante mediante el cálculo de la razón de sesgos, excepto para el límite inferior de alfa-tocoferol y PLP. Para las cuatro vitaminas, los VR utilizados actualmente no se ajustan a nuestra población, lo cual podría resultar en diagnósticos erróneos de hipo o hipervitaminosis, exceso de visitas a los especialistas o retrasos en el ajuste de la suplementación vitamínica en aquellos pacientes que lo requieran.

En particular, los VR para la vitamina A fueron de 1,1–2,8 $\mu\text{mol/L}$. El límite inferior fue comparable pero el superior fue inferior a los publicados en un estudio multicéntrico de cinco países europeos, 1,07–3,55 $\mu\text{mol/L}$ para los hombres y 1,07–3,32 $\mu\text{mol/L}$ para las mujeres¹⁹⁷. En otro estudio saudí, los VR hallados para los hombres fueron de 1,05–3,39 $\mu\text{mol/L}$ (>20 años) y, para las mujeres, de 0,73–2,66 $\mu\text{mol/L}$ (10–30 años) y 0,83–2,84 $\mu\text{mol/L}$ (>30 años)¹⁹⁸. Las diferencias observadas

podrían deberse a diferencias en la población seleccionada, como factores dietéticos, ambientales o genéticos. El intervalo de referencia calculado para alfa-T y cociente alfa-T/COL observados en el presente estudio, 18,9–42,2 $\mu\text{mol/L}$ y 5,2–8,9 $\mu\text{mol/mol}$, fueron más estrechos que los valores previamente publicados de 24,62–54,67 $\mu\text{mol/L}$ y 5,11–11,27 $\mu\text{mol/mol}$ ¹⁹⁹. Un artículo reciente realizado en población española utilizando un enfoque indirecto obtuvo VR para alfa-T entre 17,3 $\mu\text{mol/L}$ y 50,9 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁹⁶. En comparación con nuestros resultados, el límite superior de ambos estudios fue superior, lo que apoya la idea de que no sólo la muestra de referencia y la población seleccionadas, sino también la metodología utilizada y el tratamiento estadístico de los datos tienen una gran influencia en los VR obtenidos. Por otro lado, obtuvimos un intervalo similar pero ligeramente más estrecho para la TPP, 85,9–181,6 nmol/L , en comparación con los valores publicados anteriormente de 85–203 nmol/L ¹⁹⁴. Lu *et al.* obtuvieron VR más bajos, de 70–179 nmol/L ²⁰⁰. En pacientes con manifestaciones clínicas atípicas de encefalopatía de Wernicke o sin antecedentes de consumo de alcohol, el diagnóstico puede confirmarse mediante la medida de las concentraciones de tiamina en sangre²⁰¹. En estos casos, es de suma importancia definir correctamente los VR específicos de la población, especialmente el límite inferior de referencia. Por último, el intervalo de referencia obtenido para la PLP osciló entre 57,0 nmol/L y 165,7 nmol/L . van Zelst *et al.* utilizaron dos intervalos de referencia para la PLP en sangre total^{202,203}, 35–110 nmol/L y 51–183 nmol/L : los primeros, probablemente propios, pero no publicados; los segundos, calculados por Steen *et al.* utilizando reactivos Chromsystems²⁰⁴.

En este estudio, se calcularon VR para cocientes que corrigen la concentración de vitamina E en función del metabolismo lipídico. La fuerte asociación entre el alfa-T y los lípidos séricos se ha descrito previamente²⁰⁵. Thurnman *et al.* (1986) evaluaron diferentes cocientes lipídicos comparando un grupo de pacientes control ($n = 40$) y un grupo de pacientes alcohólicos ($n = 85$)²⁰⁶. Utilizando estas cohortes y realizando un análisis de regresión, calcularon puntos de corte para la deficiencia de vitamina E en los diferentes cocientes. Utilizaron como referencia el cociente entre la concentración sérica del alfa-T y la suma de las concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. Concluyeron que el cociente alfa-T/LT, seguido del cociente alfa-T/COL, eran los cocientes con mayor capacidad diagnóstica para detectar la deficiencia de vitamina E (sensibilidad y especificidad del 95% y 99%, y del 86% y 94%, respectivamente). En publicaciones recientes se ha utilizado uno u otro, el cociente alfa-T/LT o el cociente alfa-T/COL^{106,205,207,208}. Para evaluar la capacidad diagnóstica y aplicabilidad clínica de dichos cocientes, analizamos los porcentajes de resultados patológicos de la vitamina E y de ambos cocientes, alfa-T/COL y alfa-T/LT, en una cohorte independiente de 6398 pacientes. Obtuvimos un 19,2% de resultados patológicos en la vitamina E, un 27% en el cociente alfa-T/COL y un 23,9% en alfa-T/LT aplicando los VR calculados a la cohorte

de pacientes. Las diferencias entre dichos porcentajes fueron muy significativas ($p < 0,001$). Al desglosar estos porcentajes según el límite de normalidad, las diferencias son aún mayores, pasando de un 8,3% en el LIN para la vitamina E a un 12,2% en el cociente alfa-T/COL y un 19% en alfa-T/LT. Cuando se revisan los datos detalladamente, se observan tanto concentraciones lipídicas bajas que aumentan la concentración de vitamina E en consecuencia (falso positivo), como concentraciones lipídicas muy elevadas con una concentración de vitamina E baja (falso negativo). Ford *et al.* sólo recomendaron el uso del cociente alfa-T/COL para evaluar el estado de la vitamina E en pacientes con enfermedades que conducen a una elevación del colesterol LDL, como colestasis, insuficiencia pancreática o trasplante hepático, pero no recomendaron el cálculo del cociente en todos los pacientes¹⁰⁶. En general, sería recomendable añadirlo a criterio facultativo, y siempre en pacientes con hipo- o hiper-trigliceridemia/colesterolemia. Dependiendo de la información adicional del paciente, como el uso de estatinas o la colestasis, también podrían ser de gran utilidad para evitar falsos positivos y falsos negativos que conduzcan a una interpretación inexacta del resultado.

Por otro lado, se evaluó la relación entre la vitamina B1 y la hemoglobina y se obtuvo el intervalo de referencia correspondiente, entre 246,2 ng/g y 561,1 ng/g de hemoglobina. Utilizando una cohorte de pacientes independiente con un tamaño muestral de 2945, se calculó un porcentaje de resultados patológicos similar para la vitamina B1 y para el cociente de TPP/Hb, del 23,5 y 25,1%, respectivamente. Estos porcentajes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,152$). En cambio, sí son significativas cuando se separan por límite inferior y superior. Es decir, mientras que 118 pacientes presentaban una vitamina B1 baja, sólo 42 tuvieron un cociente TPP/Hb disminuido. Por el contrario, 574 pacientes presentaron una vitamina B1 aumentada, mientras que 696 tuvieron un cociente elevado. Al menos 12 pacientes de esta cohorte mostraron sintomatología franca de síndrome de Wernicke por alcoholismo. Todos presentaron una vitamina B1 baja, pero 2 presentaron un cociente TPP/Hb normal. Por lo tanto, por el porcentaje de patológicos detectados podríamos deducir que el cociente es más sensible que la medida de vitamina B1, pero esta última es más específica. Evliyaoglu *et al.* publicaron un análisis retrospectivo en el que consideraron la inclusión de la corrección de la hemoglobina en la medición de la vitamina B1 en pacientes no anémicos debido a la posibilidad de errores postanalíticos que dieran lugar a resultados falsamente elevados²⁰⁹. Talwar *et al.* recomendaron el análisis de vitamina B1 en sangre total sólo cuando fuese acompañado de la concentración de hemoglobina en un análisis prospectivo en el Reino Unido¹⁰⁸. Según los resultados del presente estudio, sería recomendable informar ambos resultados siempre que sea posible para complementar la información sobre el estado nutricional del paciente.

El presente estudio presenta algunas limitaciones. En primer lugar, aunque el intervalo de edad elegido es el recomendado por el CLSI, la población mundial es cada vez más anciana y el límite

superior de 65 años se queda demasiado corto. En segundo lugar, en este estudio no se tuvieron en cuenta factores como el tabaquismo o el embarazo, que podrían afectar a las concentraciones de vitaminas. Sin embargo, por lo que sabemos, no se incluyó a ninguna mujer embarazada. Finalmente, la proporción de mujeres en nuestro estudio es mayor (64%), debido a una mayor dificultad para reclutar hombres en el estudio.

DISCUSIÓN GLOBAL

En este proyecto se han evaluado tres aplicaciones de la medicina de precisión e individualizada utilizando como herramientas la cromatografía líquida y la espectrometría de masas en el laboratorio clínico. Se han utilizado por su gran versatilidad, su capacidad para cuantificar amplios intervalos de medida, la preparación sencilla de muestra y su elevado rendimiento analítico. En cuanto a las aplicaciones estudiadas, se han seleccionado en función de las necesidades clínicas en nuestro hospital.

Se han evaluado y monitorizado las concentraciones de fármacos (busulfán, ganciclovir, aciclovir y letermovir) y vitaminas (A, E, B1 y B6) para el ajuste de dosis o suplementación. La monitorización de busulfán ha supuesto ajustes de dosis en el 90% de los pacientes estudiados, de hasta un cincuenta o un setenta por ciento en algunos pacientes. Se ha demostrado que la aplicación de estrategias basadas en el peso no es suficiente para alcanzar la exposición deseada en cada paciente. Además, la TDM se ha relacionado con mayores tasas de supervivencia y menores tasas de eventos adversos. Por otro lado, la monitorización de antivirales ha expuesto una elevada variabilidad intraindividual para el letermovir, que podría afectar especialmente a pacientes complejos o más vulnerables (por ejemplo, en el caso clínico de la paciente que presentaba un IMC bajo). Finalmente, los intervalos de referencia calculados para las cuatro vitaminas han sido estadísticamente diferentes a los VR utilizados actualmente, que no se ajustan a nuestra población y pueden resultar en diagnósticos erróneos. Se han definido VR para los cocientes alfa-T/COL y alfa-T/LT, útiles en dislipidemias, y para B1/hemoglobina, aplicable en pacientes con alteraciones de la hemoglobina.

Las cohortes de pacientes incluidos, la metodología y la interpretación de los resultados son diferentes, pero todos convergen en un aumento de la seguridad del paciente y de la eficacia del tratamiento. También convergen en su utilidad selectiva, es decir, que la necesidad de monitorizar estos fármacos y vitaminas es específica para algunos pacientes. Las terapias guiadas por monitorización son especialmente prometedoras para los pacientes vulnerables o con características atípicas que afecten a la absorción, distribución, metabolismo o excreción del fármaco o vitamina.

Algunos ejemplos son los neonatos, los obesos, los pacientes oncológicos, los enfermos críticos, o sometidos a una cirugía mayor. También requerirán un ajuste en la dosificación o tratamientos terapéuticos personalizados individuos con polimorfismos genéticos, o pacientes con enfermedad hepática o renal grave²¹⁰. En estos pacientes, la estrategia guiada por monitorización se hace indispensable, pues no suelen formar parte de los ensayos clínicos en la mayoría de los fármacos comercializados, tienen un manejo especialmente complejo, y su respuesta al fármaco puede ser completamente imprevisible.

La decisión del facultativo clínico responsable del paciente sobre el ajuste de la dosis se basará en la concentración del fármaco y en algoritmos para el ajuste de dosis. Para evaluar la utilidad del TDM, se deben tener en cuenta la fiabilidad de los métodos de análisis y la calidad de los algoritmos. Los rangos terapéuticos son específicos de una población y no del paciente, por lo que en ocasiones no coincidirán las concentraciones del paciente con el rango terapéutico establecido a una dosis fija. Es más, se ha propuesto que el intervalo objetivo para cada paciente varíe individualmente en función de sus características demográficas y su estado clínico²¹¹.

La administración personalizada de fármacos y vitaminas es un objetivo de la medicina de precisión, que tiene en cuenta la variabilidad de los genes, el entorno y el estilo de vida de cada individuo, lo cual permite seleccionar la dosis y el tratamiento adecuados adaptados a cada paciente y a su enfermedad. El objetivo principal de la medicina personalizada es optimizar los beneficios y minimizar los perjuicios de una intervención, mediante el uso de datos genómicos y otros datos ómicos para apoyar la personalización de los tratamientos. La monitorización de fármacos y vitaminas puede constituir uno de los cimientos del tratamiento personalizado, abarcando aspectos que no contemplan la farmacogenómica y el análisis de datos masivos, como las interacciones farmacológicas, alteraciones imprevistas en la absorción o metabolismo de fármacos y vitaminas, situaciones agudas del paciente, etc.

La aplicación rutinaria de la TDM es compleja, por la falta de pruebas disponibles, la logística del muestreo e incluso la interpretación de los resultados. La cromatografía líquida y la espectrometría de masas permiten superar estas limitaciones ampliando el número de ensayos de fármacos y reduciendo el volumen de muestra necesario.

A medida que la cromatografía líquida y los espectrómetros de masas se incorporen al laboratorio clínico como analizadores habituales, la TDM se convertirá en una herramienta más extendida, con mayor número de aplicaciones, y potencial no solo para medir sino para desarrollar nuevos fármacos, en la era de la medicina de precisión²¹².

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico por LC-MS/MS para la medición del fármaco antineoplásico busulfán que cumple las especificaciones del laboratorio y los criterios de aceptación de las características metrológicas según la guía europea para la validación de métodos bioanalíticos.
2. En la cohorte de pacientes pediátricos evaluados, se ha modificado la dosis terapéutica en un 90% de los casos para alcanzar la exposición a busulfán objetivada.
3. La tasa de supervivencia global y la tasa de supervivencia libre de eventos adversos en los pacientes pediátricos monitorizados en el estudio ha sido elevada, y mayor que en las tasas reportadas en la bibliografía en cohortes similares no monitorizadas.
4. Se ha desarrollado y validado analíticamente un método para la detección y cuantificación simultánea de los antivirales ganciclovir, aciclovir y letermovir. Las características metrológicas evaluadas, a destacar la reproducibilidad, la sensibilidad y la especificidad, cumplen las especificaciones del laboratorio y los criterios de aceptación según la guía europea para la validación de métodos bioanalíticos.
5. Se ha demostrado la aplicabilidad clínica del método para la medida de antivirales en diferentes series analíticas y cohortes de pacientes trasplantados. No se han observado interferencias ni contaminación por arrastre, y el intervalo de medida ha sido adecuado y suficiente para cuantificar las concentraciones de todas las muestras y pacientes incluidos.
6. Se ha observado una elevada variabilidad intraindividual del letermovir, y se han observado interacciones farmacológicas no informadas por el distribuidor al menos en dos pacientes, con importantes consecuencias en el curso clínico y el pronóstico de los pacientes.
7. Se han calculado valores de referencia para las vitaminas A, E, B1 y B6 específicos para nuestra población. Estos difieren significativamente de los informados por el laboratorio con anterioridad, lo que conlleva infra y supradiagnósticos del estado nutricional del paciente.
8. Se han obtenido límites de decisión para parámetros nutricionales que permitirán una mejor interpretación del estado nutricional del paciente, siendo de especial interés en pacientes complejos con alteraciones subclínicas y niveles normales o en zona gris de las vitaminas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dolsten M, Sjøgaard M. Precision medicine: an approach to R&D for delivering superior medicines to patients. *Clin Transl Med.* 2012 May 30;1(1):7.
2. Blackstone EH. Precision Medicine Versus Evidence-Based Medicine. *Circulation.* 2019 Oct 8;140(15):1236–1238.
3. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Mar 1;142(3):321–346.
4. König IR, Fuchs O, Hansen G, et al. What is precision medicine? *Eur Respir J.* 2017 Oct 19;50(4):1700391.
5. Wang X. New strategies of clinical precision medicine. *Clin Transl Med.* 2022 Feb;12(2):e135.
6. Zhang L, Parvin R, Fan Q, et al. Emerging digital PCR technology in precision medicine. *Biosens Bioelectron.* 2022 Sep 1;211:114344.
7. Rabbani N, Kim GYE, Suarez CJ, et al. Applications of machine learning in routine laboratory medicine: Current state and future directions. *Clin Biochem.* 2022 May;103:1–7.
8. Pascual J, Attard G, Bidard FC, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2022 Aug;33(8):750-768.
9. Yin Y, Butler C, Zhang Q. Challenges in the application of NGS in the clinical laboratory. *Hum Immunol.* 2021 Nov;82(11):812–819.
10. Verougstraete N, Stove CP. Volumetric absorptive microsampling as a suitable tool to monitor tyrosine kinase inhibitors. *J Pharm Biomed Anal.* 2022 Jan 5;207:114418.
11. Molloy MP, Hill C, O'Rourke MB, et al. Proteomic Analysis of Whole Blood Using Volumetric Absorptive Microsampling for Precision Medicine Biomarker Studies. *J Proteome Res.* 2022 Apr 1;21(4):1196–1203.
12. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin Biochem Rev.* 2011 Feb;32(1):5–31.
13. Dondelinger RM. Liquid Chromatography Systems. *Biomed Instrum Technol.* 2012 Jul;46(4):299–306.
14. Alsaleh M, Barbera TA, Andrews RH, et al. Mass Spectrometry: A Guide for the Clinician. *J Clin Exp Hepatol.* 2019 Sep;9(5):597–606.

15. Blum F. High performance liquid chromatography. *Br J Hosp Med*. 2014 Feb;75(2):C18–C21.
16. Briones-Vázquez CA, Álvarez-Hernández A. Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones. *Pädi ICBI*. 2021 Jul 5;9(17):9–16.
17. Le Goff C, Farre-Segura J, Stojkovic V, et al. The pathway through LC-MS method development: In-house or ready-to-use kit-based methods? *Clin Chem Lab Med*. 2020 Jun 25;58(6):1002–1009.
18. Kahles A, Goldschmid H, Volckmar AL, et al. Structure and content of the EU-IVDR. *Pathologie (Heidelb)*. 2023 Nov 3;44(S2):73–85.
19. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, et al. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers*. 2022 Dec 8;2(1):96.
20. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. *Anal Chem*. 2003 Jul 1;75(13):3019–3030.
21. Charrière K, Pazart L. Clinical evidence requirements according to the IVDR 2017/746: practical tools and references for underpinning clinical evidence of IVD-MDs. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Jun 27;61(7):1150–1157.
22. The European Parliament. Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on in vitro diagnostic medical devices and repealing Directive 98/79/EC and Commission Decision 2010/227/EU [Internet]. 2017. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R0746>. Acceso 13 de junio de 2024.
23. Kahles A, Goldschmid H, Volckmar AL, et al. Regulation (EU) 2017/746 (IVDR): practical implementation of annex I in pathology. *Pathologie (Heidelb)*. 2023 Nov 4;44(S2):86–95.
24. Spitzenberger F, Patel J, Gebuhr I, et al. Laboratory-Developed Tests: Design of a Regulatory Strategy in Compliance with the International State-of-the-Art and the Regulation (EU) 2017/746 (EU IVDR [In Vitro Diagnostic Medical Device Regulation]). *Ther Innov Regul Sci*. 2022 Jan 21;56(1):47–64.
25. Vanstapel FJLA, Boursier G, Cobbaert CM. In-house diagnostic devices under the EU IVDR and unwanted side-effects of intentional transparency. *Clin Chem Lab Med*. 2024 Jan 26;62(1):e1–e3.
26. Clarke NJ. Mass Spectrometry in Precision Medicine: Phenotypic Measurements Alongside Pharmacogenomics. *Clin Chem*. 2016 Jan 1;62(1):70–76.
27. Momper JD, Wagner JA. Therapeutic Drug Monitoring as a Component of Personalized Medicine: Applications in Pediatric Drug Development. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Feb 19;95(2):138–140.

28. Jang S, Yan Z, Lazor J. Therapeutic drug monitoring: A patient management tool for precision medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2016 Feb 9;99(2):148–150.
29. Liang WS, Beaulieu-Jones B, Smalley S, et al. Emerging therapeutic drug monitoring technologies: considerations and opportunities in precision medicine. *Front Pharmacol.* 2024 Mar 13;15:1348112.
30. Cremers S, Guha N, Shine B. Therapeutic drug monitoring in the era of precision medicine: opportunities! *Br J Clin Pharmacol.* 2016 Oct 9;82(4):900–902.
31. Lee SY. Therapeutic Drug Monitoring of Biologic Agents in the Era of Precision Medicine. *Ann Lab Med.* 2020 Mar 1;40(2):95–96.
32. Ordovas JM, Ferguson LR, Tai ES, et al. Personalised nutrition and health. *BMJ.* 2018 Jun 13;361:bmj.k2173.
33. He HY, Liu MZ, Zhang YL, et al. Vitamin Pharmacogenomics: New Insight into Individual Differences in Diseases and Drug Responses. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2017 Apr 1;15(2):94–100.
34. De Toro-Martín J, Arsenault B, Després JP, et al. Precision Nutrition: A Review of Personalized Nutritional Approaches for the Prevention and Management of Metabolic Syndrome. *Nutrients.* 2017 Aug 22;9(8):913.
35. Amini Y, Saif N, Greer C, et al. The Role of Nutrition in Individualized Alzheimer’s Risk Reduction. *Curr Nutr Rep.* 2020 Jun 10;9(2):55–63.
36. Hoy SM, Lyseng-Williamson KA. Intravenous busulfan: in the conditioning treatment of pediatric patients prior to hematopoietic stem cell transplantation. *Paediatr Drugs.* 2007;9(4):271-8.
37. Chandy M, Balasubramanian P, Ramachandran S V, et al. Randomized trial of two different conditioning regimens for bone marrow transplantation in thalassemia – the role of busulfan pharmacokinetics in determining outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2005 Nov 1;36(10):839–845.
38. Bouligand J, Boland I, Valteau-Couanet D, et al. In children and adolescents, the pharmacodynamics of high-dose busulfan is dependent on the second alkylating agent used in the combined regimen (melphalan or thiotepa). *Bone Marrow Transplant.* 2003 Nov 1;32(10):979–986.
39. Lawson R, Staatz CE, Fraser CJ, et al. Review of the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous Busulfan in Paediatric Patients. *Clin Pharmacokinet.* 2021 Jan 30;60(1):17–51.
40. Andersson BS, Thall PF, Madden T, et al. Busulfan systemic exposure relative to regimen-related toxicity and acute graft-versus-host disease: Defining a therapeutic window for i.v.

- BuCy2 in chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002 Sep;8(9):477–485.
41. Dalle JH, Giralt SA. Hepatic Venous Occlusive Disease after Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Risk Factors and Stratification, Prophylaxis, and Treatment. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016 Mar;22(3):400–409.
 42. Geddes M, Kangaroo SB, Naveed F, et al. High Busulfan Exposure Is Associated with Worse Outcomes in a Daily i.v. Busulfan and Fludarabine Allogeneic Transplant Regimen. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Feb;14(2):220–228.
 43. Krivoy N, Hoffer E, Lurie Y, et al. Busulfan Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Pharmacology, Dose Adjustment, Safety and Efficacy in Adults and Children. *Curr Drug Saf.* 2008 Jan 1;3(1):60–66.
 44. Zao JH, Schechter T, Liu WJ, et al. Performance of Busulfan Dosing Guidelines for Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Aug;21(8):1471–1478.
 45. Lankester AC, Albert MH, Booth C, et al. EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity. *Bone Marrow Transplant.* 2021 Sep 5;56(9):2052–2062.
 46. Booth BP, Rahman A, Dagher R, et al. Population Pharmacokinetic–Based Dosing of Intravenous Busulfan in Pediatric Patients. *J Clin Pharmacol.* 2007 Jan 7;47(1):101–111.
 47. Scott LJ, Hoy SM, Lyseng-Williamson KA. Intravenous Busulfan: A Guide to Its Use as Conditioning Treatment before Transplantation of Haematopoietic Progenitor Cells. *Clin Drug Investig.* 2012 Sep 13;32(9):641–648.
 48. McCune JS, Holmberg LA. Busulfan in hematopoietic stem cell transplant setting. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 Aug 17;5(8):957–969.
 49. Bartelink IH, Boelens JJ, Bredius RGM, et al. Body Weight-Dependent Pharmacokinetics of Busulfan in Paediatric Haematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *Clin Pharmacokinet.* 2012 May 1;51(5):331–45.
 50. Haidar G, Boeckh M, Singh N. Cytomegalovirus Infection in Solid Organ and Hematopoietic Cell Transplantation: State of the Evidence. *J Infect Dis.* 2020 Mar 5;221(Suppl 1):S23–S31.
 51. Dziedzic M, Sadowska-Krawczenko I, Styczynski J. Risk Factors for Cytomegalovirus Infection After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Malignancies: Proposal for Classification. *Anticancer Res.* 2017 Dec;37(12):6551–6556.
 52. Limaye AP, Babu TM, Boeckh M. Progress and Challenges in the Prevention, Diagnosis, and Management of Cytomegalovirus Infection in Transplantation. *Clin Microbiol Rev.* 2020 Oct 28;34(1):e00043-19.

53. Märtson AG, Edwina AE, Kim HY, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Ganciclovir: Where Are We? *Ther Drug Monit.* 2022 Feb 1;44(1):138–147.
54. Foulongne V, Turrière C, Diafouka F, et al. Ganciclovir resistance mutations in UL97 and UL54 genes of Human cytomegalovirus isolates resistant to ganciclovir. *Acta Virol.* 2004;48(1):51-55.
55. Hall Sedlak R, Castor J, Butler-Wu SM, et al. Rapid Detection of Human Cytomegalovirus UL97 and UL54 Mutations Directly from Patient Samples. *J Clin Microbiol.* 2013 Jul;51(7):2354-2359.
56. Wong DD, Ho SA, Domazetovska A, et al. Evidence supporting the use of therapeutic drug monitoring of ganciclovir in transplantation. *Curr Opin Infect Dis.* 2023 Dec 1;36(6):505–513.
57. Piret J, Boivin G. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence, and Management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb;55(2):459-472.
58. Kabut T, Weinbergerová B, Folber F, et al. High-dose aciclovir in CMV infection prophylaxis after allogeneic HSCT: a single-center long-term experience. *Bone Marrow Transplant.* 2023 Nov;58(11):1229-1236.
59. Izzedine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral Drug-Induced Nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis.* 2005 May;45(5):804-817.
60. Vonberg FW, Dawson A, Scott G, et al. Aciclovir-induced neurotoxicity. *Pract Neurol.* 2023 Apr;23(2):157-159.
61. Stewart AG, Kotton CN. What’s New: Updates on Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation.* 2024 Apr 30;108(4):884–897.
62. Ljungman P, de la Camara R, Robin C, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with haematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7). *Lancet Infect Dis.* 2019 Aug;19(8):e260-e272.
63. Inagaki K, Vander Lugt MT, Riggsbee D, et al. Nephrotoxicity of Intravenous Ganciclovir in Pediatric Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Pediatr Infect Dis J.* 2024 Jul 23.
64. Raval AD, Kistler KD, Tang Y, et al. Burden of neutropenia and leukopenia among adult kidney transplant recipients: A systematic literature review of observational studies. *Transpl Infect Dis.* 2023 Feb;25(1):e14000.
65. Silva Junior HT, Tokat Y, Cai J, et al. Epidemiology, management, and burden of cytomegalovirus in solid organ transplant recipients in selected countries outside of Europe and North America: A systematic review. *Transpl Infect Dis.* 2023 Aug;25(4):e14070.

66. Navarro D. Expanding role of cytomegalovirus as a human pathogen. *J Med Virol*. 2016 Jul 5;88(7):1103–1112.
67. Caldés A, Colom H, Armendariz Y, et al. Population Pharmacokinetics of Ganciclovir after Intravenous Ganciclovir and Oral Valganciclovir Administration in Solid Organ Transplant Patients Infected with Cytomegalovirus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Nov;53(11):4816–4824.
68. Franck B, Woillard J, Théorêt Y, et al. Population pharmacokinetics of ganciclovir and valganciclovir in paediatric solid organ and stem cell transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol*. 2021 Aug 19;87(8):3105–3114.
69. Li QY, van den Anker J, Wu YE, et al. Optimizing ganciclovir and valganciclovir dosing regimens in pediatric patients with cytomegalovirus infection: a spotlight on therapeutic drug monitoring. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2023 Aug 3;16(8):727–739.
70. Franzin M, Ruoso R, Del Savio R, et al. Development and Validation of an HPLC-UV Method for the Quantification of Acyclovir and Ganciclovir in the Plasma of Pediatric Immunocompromised Patients. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 26;25(5):2685.
71. Malagola M, Radici V, Farina M, et al. CMV prophylaxis with letermovir significantly improves graft and relapse free survival following allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2024 Jan 19;59(1):138–140.
72. Grossi PA, Peghin M. Recent advances in cytomegalovirus infection management in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant*. 2024 Apr 1;29(2):131-137.
73. Hopff SM, Wingen-Heimann SM, Classen AY, et al. Real-world experience with letermovir for cytomegalovirus-prophylaxis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: A multi-centre observational study. *J Infect*. 2024 Aug;89(2):106220.
74. Deleenheer B, Spriet I, Maertens J. Pharmacokinetic drug evaluation of letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2018 Dec 2;14(12):1197–1207.
75. El Helou G, Razonable R. Letermovir for the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients: an evidence-based review. *Infect Drug Resist*. 2019 Jun 4;12:1481-1491.
76. Ohmoto A, Fuji S. Letermovir for cytomegalovirus infection in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: tips and notes for effective use in clinical practice. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2024 Apr 2;22(4):169–178.
77. Galaverna F, Baccelli F, Zama D, et al. Letermovir for Cytomegalovirus infection in pediatric patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a real-life study by the Infectious Diseases Working Group of Italian Association of Pediatric Hematology-Oncology (AIEOP). *Bone Marrow Transplant*. 2024 Apr 25;59(4):505–512.

78. Richert-Przygonska M, Jaremek K, Debski R, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus Infection in Children After Hematopoietic Cell Transplantation. *Anticancer Res.* 2022 Jul 5;42(7):3607–3612.
79. Limaye AP, Budde K, Humar A, et al. Letermovir vs Valganciclovir for Prophylaxis of Cytomegalovirus in High-Risk Kidney Transplant Recipients. *JAMA.* 2023 Jul 3;330(1):33.
80. Wang Y, Chen D, Hartmann G, et al. PBPK Modeling Strategy for Predicting Complex Drug Interactions of Letermovir as a Perpetrator in Support of Product Labeling. *Clin Pharmacol Ther.* 2019 Feb 11;105(2):515–523.
81. Menzel K, Kothare P, McCrea JB, et al. Absorption, Metabolism, Distribution, and Excretion of Letermovir. *Curr Drug Metab.* 2021;22(10):784-794.
82. Menzel K, Kuo Y, Chen D, et al. Developing a mechanistic understanding of the nonlinear pharmacokinetics of letermovir and prospective drug interaction with everolimus using physiological-based pharmacokinetic modeling. *Clin Transl Sci.* 2023 Jun 21;16(6):1039–1048.
83. Märtson AG, Edwina AE, Burgerhof JGM, et al. Ganciclovir therapeutic drug monitoring in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Aug 12;76(9):2356-2363.
84. Ritchie BM, Barreto JN, Barreto EF, et al. Relationship of Ganciclovir Therapeutic Drug Monitoring with Clinical Efficacy and Patient Safety. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Feb 26;63(3):e01855-18.
85. Rousseau A, Boutolleau D, Titier K, et al. Recurrent herpetic keratitis despite antiviral prophylaxis: A virological and pharmacological study. *Antiviral Res.* 2017 Oct;146:205-212.
86. Pérez Marín M, Decosterd LA, Andre P, et al. Compassionate Use of Letermovir in a 2-Year-Old Immunocompromised Child With Resistant Cytomegalovirus Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2020 Feb 28;9(1):96-99.
87. Strenger V, Sperl D, Kubesch K, et al. Letermovir in paediatric HSCT recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Sep 1;74(9):2820-2821.
88. Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients—Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* 2019 Sep 28;33(9):e13512.
89. Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, et al. The Third International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-organ Transplantation. *Transplantation.* 2018 Jun;102(6):900–931.
90. Hill A, Elke G, Weimann A. Nutrition in the Intensive Care Unit—A Narrative Review. *Nutrients.* 2021 Aug 19;13(8):2851.
91. Barker T. Vitamins and Human Health: Systematic Reviews and Original Research. *Nutrients.* 2023 Jun 26;15(13):2888.

92. Venturelli S, Leischner C, Helling T, et al. Vitamins as Possible Cancer Biomarkers: Significance and Limitations. *Nutrients*. 2021 Nov 1;13(11):3914.
93. Martínez VG, Salas AA, Ballestín SS. Vitamin Supplementation and Dementia: A Systematic Review. *Nutrients*. 2022 Feb 28;14(5):1033.
94. Sinopoli A, Caminada S, Isonne C, et al. What Are the Effects of Vitamin A Oral Supplementation in the Prevention and Management of Viral Infections? A Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *Nutrients*. 2022 Oct 1;14(19):4081.
95. Carazo A, Macáková K, Matoušová K, et al. Vitamin A Update: Forms, Sources, Kinetics, Detection, Function, Deficiency, Therapeutic Use and Toxicity. *Nutrients*. 2021 May 18;13(5):1703.
96. Rigotti A. Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med*. 2007 Oct;28(5–6):423–436.
97. Sherwin JC, Reacher MH, Dean WH, et al. Epidemiology of vitamin A deficiency and xerophthalmia in at-risk populations. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012 Apr;106(4):205–214.
98. Malik A, Eggersdorfer M, Trilok-Kumar G. Vitamin E status in healthy population in Asia: A review of current literature. *Int J Vitam Nutr Res*. 2021 Jun;91(3-4):356-369.
99. Calderón-Ospina CA, Nava-Mesa MO. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin. *CNS Neurosci Ther*. 2020 Jan 6;26(1):5–13.
100. Peterson CT, Rodionov DA, Osterman AL, et al. B Vitamins and Their Role in Immune Regulation and Cancer. *Nutrients*. 2020 Nov 4;12(11):3380.
101. Mrowicka M, Mrowicki J, Dragan G, et al. The importance of thiamine (vitamin B1) in humans. *Biosci Rep*. 2023 Oct 31;43(10):BSR20230374.
102. Reddy P. Preventing Vitamin B6–Related Neurotoxicity. *Am J Ther*. 2022 Nov;29(6):e637–e643.
103. Frank LL. Thiamin in Clinical Practice. *J Parenter Enteral Nutr*. 2015 Jul;39(5):503-520.
104. Berger MM, Shenkin A, Dizdar OS, et al. ESPEN practical short micronutrient guideline. *Clin Nutr*. 2024 Mar 1;43(3):825-857.
105. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, et al. Vitamin E: Regulatory Redox Interactions. *IUBMB Life*. 2019 Apr;71(4):430-441.
106. Ford L, Farr J, Morris P, et al. The value of measuring serum cholesterol-adjusted vitamin E in routine practice. *Ann Clin Biochem*. 2006 Mar;43(Pt 2):130-134.
107. Greaves RF, Woollard GA, Hoad KE, et al. Laboratory medicine best practice guideline: vitamins a, e and the carotenoids in blood. *Clin Biochem Rev*. 2014 May;35(2):81–113.

108. Talwar D, Davidson H, Cooney J, et al. Vitamin B(1) status assessed by direct measurement of thiamin pyrophosphate in erythrocytes or whole blood by HPLC: comparison with erythrocyte transketolase activation assay. *Clin Chem*. 2000 May;46(5):704-710.
109. Doyle K, Bunch DR. Reference intervals: past, present, and future. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2023 Aug 18;60(6):466–482.
110. Ozarda Y, Higgins V, Adeli K. Verification of reference intervals in routine clinical laboratories: practical challenges and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Dec 19;57(1):30–37.
111. Ozarda Y. Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016;26(1):5-16.
112. Leitner-Ferenc V, Atamaniuk J, Jansen-Skoupy S, et al. CLSI-Based Validation of Manufacturer-Derived Reference Intervals on the Cobas 8000 Platform. *Lab Med*. 2017 May;48(2):e30–e35.
113. Bawua SA, Ichihara K, Keatley R, et al. Derivation of sex and age-specific reference intervals for clinical chemistry analytes in healthy Ghanaian adults. *Clin Chem Lab Med*. 2022 Aug 26;60(9):1426–1439.
114. Martinez-Sanchez L, Marques-Garcia F, Ozarda Y, et al. Big data and reference intervals: rationale, current practices, harmonization and standardization prerequisites and future perspectives of indirect determination of reference intervals using routine data. *Adv Lab Med*. 2020 Aug 8;2(1):9-25.
115. Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, et al. EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2010.
116. Higgins V, Nieuwesteeg M, Adeli K. Reference intervals: theory and practice. Edited by: Clarke W, Marzinke MA. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. Fourth edition. United States: Elsevier; 2020. p. 37–56.
117. Jones GRD, Haeckel R, Loh TP, et al. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clin Chem Lab Med*. 2018 Dec 19;57(1):20–29.
118. Ozarda Y, Ichihara K, Jones G, et al. Comparison of reference intervals derived by direct and indirect methods based on compatible datasets obtained in Turkey. *Clin Chim Acta*. 2021 Sep;520:186–195.
119. Ma S, Yu J, Qin X, et al. Current status and challenges in establishing reference intervals based on real-world data. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2023 Aug 18;60(6):427–441.
120. Wilschanski M, Munck A, Carrion E, et al. ESPEN-ESPGHAN-ECFS guideline on nutrition care for cystic fibrosis. *Clin Nutr*. 2024 Feb 1;43(2):413-445.

121. Ikizler TA, Burrowes JD, Byham-Gray LD, et al. KDOQI Clinical Practice Guideline for Nutrition in CKD: 2020 Update. *Am J Kidney Dis.* 2020 Sep;76(3 Suppl 1):S1-S107.
122. Mechanick JI, Apovian C, Brethauer S, et al. Clinical practice guidelines for the perioperative nutrition, metabolic, and nonsurgical support of patients undergoing bariatric procedures - 2019 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology, The Obesity Society, American Society for Metabolic & Bariatric Surgery, Obesity Medicine Association, and American Society of Anesthesiologists. *Surg Obes Relat Dis.* 2020 Feb;16(2):175-247.
123. Pironi L, Cuerda C, Jeppesen PB, et al. ESPEN guideline on chronic intestinal failure in adults – Update 2023. *Clin Nutr.* 2023 Oct 1;42(10):1940-2021.
124. Muhamad R, Akrivaki A, Papagiannopoulou G, et al. The Role of Vitamin B6 in Peripheral Neuropathy: A Systematic Review. *Nutrients.* 2023 Jun 21;15(13):2823.
125. European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on Bioanalytical Method Validation.* European Medicines Agency, London, UK (2011).
126. Suh JK, Koh YK, Kang SH, et al. Favorable outcomes with durable chimerism after hematopoietic cell transplantation using busulfan and fludarabine-based reduced-intensity conditioning for pediatric patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood Res.* 2022 Jun 30;57(2):152–157.
127. Cseh A, Galimard J, de la Fuente J, et al. Busulfan–fludarabine- or treosulfan–fludarabine-based conditioning before allogeneic HSCT from matched sibling donors in paediatric patients with sickle cell disease: A study on behalf of the EBMT Paediatric Diseases and Inborn Errors Working Parties. *Br J Haematol.* 2024 Jan 5;204(1):e1-e5.
128. Benítez-Carabante MI, Beléndez C, González-Vicent M, et al. Matched sibling donor stem cell transplantation for sickle cell disease: Results from the Spanish group for bone marrow transplantation in children. *Eur J Haematol.* 2021 Mar 4;106(3):408–416.
129. Sakaguchi H, Muramatsu H, Hasegawa D, et al. Comparison of conditioning regimens for autologous stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia: A nationwide retrospective study in Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2019 Jan 30;66(1):e27459.
130. Lucchini G, Labopin M, Beohou E, et al. Impact of Conditioning Regimen on Outcomes for Children with Acute Myeloid Leukemia Undergoing Transplantation in First Complete Remission. An Analysis on Behalf of the Pediatric Disease Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation.* 2017 Mar;23(3):467–474.
131. European Medicines Agency, International Council for Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. *ICH guideline M10 on bioanalytical*

- method validation and study sample analysis*. European Medicines Agency, London, UK (2022).
132. Gella Tomás F, Álvarez Dominguez L, Blanco Font A, et al. Verificación y validación de los procedimientos analíticos en los laboratorios clínicos. Recomendación. 2019.
 133. Canalias Reverter F, Boned Juliani B, Esteve Poblador S, et al. Estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Recomendación. 2014.
 134. Izquierdo Álvarez S, Gella Tomás F, Canalias Reverter F, et al. Recomendaciones para el estudio de la veracidad de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico mediante la participación en programas de evaluación externa de la calidad. Recomendación. 2011.
 135. Gella Tomás FJ, Alonso Nieva N, Andrés Otero MJ, et al. Establecimiento de especificaciones para la exactitud de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Recomendación. 2018.
 136. Combarel D, Tran J, Delahousse J, et al. Individualizing busulfan dose in specific populations and evaluating the risk of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2023 Feb 1;19(2):75–90.
 137. Salman B, Al-Za'abi M, Al-Huneini M, et al. Therapeutic drug monitoring-guided dosing of busulfan differs from weight-based dosing in hematopoietic stem cell transplant patients. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017 Jun;10(2):70–78.
 138. Villena-Ortiz Y, Castellote-Bellés L, Martínez-Sánchez L, et al. Rapid and accurate method for quantifying busulfan in plasma samples by isocratic liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Adv Lab Med*. 2022 Jun 13;3(3):263-281.
 139. Ialongo C, Mozzi AF, Bernardini S. An LC-MS Assay with Isocratic Separation and On-Line Solid Phase Extraction to Improve the Routine Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Plasma. *J Med Biochem*. 2017 Apr 1;36(2):113–121.
 140. Xiao Y, Li X, Fu X. A rapid and simple LC-MS/MS method for personalized busulfan dosing in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Clin Chim Acta*. 2018 Apr;479:190-195.
 141. Parise RA, Covey JM, Hollingshead MG, et al. Development and validation of an LC-MS/MS generic assay platform for small molecule drug bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2021 Sep 5;203:114185.
 142. Cafaro A, Pigliasio F, Baiardi G, et al. Development and Validation of a Novel LC-MS/MS Method for a TDM-Guided Personalization of HSCT Conditioning with High-Dose Busulfan in Children. *Biomedicines*. 2023 Feb 11;11(2):530.
 143. Pablo A, Breaud AR, Clarke W. Analysis of Busulfan in Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Curr Protoc Toxicol*. 2020 Jun 29;84(1):e93.

144. Jinjie Y, Sun N, Zhang S, et al. A rapid HPLC–MS/MS method for determining busulfan in hemolytic samples from children with hematopoietic stem cell transplantation. *Biomed Chromatogr.* 2020 Sep;34(9):e4898.
145. Peake RWA, Law T, Esposito CL, et al. Towards a random-access LC-MS/MS model for busulfan analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2017 Jun 27;55(7):e154-e157.
146. Schofield RC, Landau HJ, Giralt SA, et al. Measurement of the DNA alkylating agents busulfan and melphalan in human plasma by mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019 Sep 1;1125:121711.
147. Nadella TR, Suryadevara V, Lankapalli SR, et al. LC–MS/MS method development for quantification of busulfan in human plasma and its application in pharmacokinetic study. *J J Pharm Biomed Anal.* 2016 Feb 20;120:168-174.
148. Chen RL, Fang LH, Yang XY, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Busulfan in Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplantation: A Pilot Single-Center Study in Taiwan. *Pharmaceuticals (Basel).* 2021 Jun 26;14(7):613.
149. Malis J. The importance of Therapeutic Drug Monitoring (TDM) for parenteral busulfan dosing in conditioning regimen for Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in children. *Ann Transplant.* 2014 May 9;19:214-224.
150. Malär R, Sjö F, Rentsch K, et al. Therapeutic drug monitoring is essential for intravenous busulfan therapy in pediatric hematopoietic stem cell recipients. *Pediatr Transplant.* 2011 Sep 8;15(6):580–588.
151. Bognår T, Bartelink IH (Imke), van der Elst KCM, et al. Busulfan Exposure Target Attainment in Adults Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Single Day Versus a Multiple Day Therapeutic Drug Monitoring Regimen. *Transplant Cell Ther.* 2024 Jul 25;S2666-6367(24)00546-3.
152. Bartelink IH, Bredius RGM, Ververs TT, et al. Once-Daily Intravenous Busulfan with Therapeutic Drug Monitoring Compared to Conventional Oral Busulfan Improves Survival and Engraftment in Children Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008 Jan;14(1):88–98.
153. Shao D fang, Li J hui, Hu T, et al. Clinical outcomes of individualized busulfan-dosing in hematopoietic stem cell transplantation in Chinese children undergoing with therapeutic drug monitoring. *Bone Marrow Transplant.* 2022 Mar 17;57(3):473–478.
154. Iemura T, Kondo T, Ueda A, et al. Effects of combined test dose and therapeutic drug monitoring strategy in exposure-directed busulfan. *Ann Hematol.* 2023 Oct 13;102(10):2909–2922.

155. Gurlek Gokcebay D, Arman Bilir O, Şahin S, et al. Role of therapeutic drug monitoring of intravenous Busulfan for prevention of sinusoidal obstructive syndrome in children. *Pediatr Transplant*. 2022 Aug 28;26(5):e14266.
156. Isberner N, Aghai F, Schirmer D, et al. Quantification of letermovir in human serum using high-performance liquid chromatography with diode array detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 Nov 30;1159:122399.
157. Dao Y jun, Jiao Z, Zhong M kang. Simultaneous determination of aciclovir, ganciclovir, and penciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008 May 15;867(2):270–276.
158. Perrottet N, Beguin A, Meylan P, et al. Determination of aciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography–spectrofluorimetric detection and stability studies in blood samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Jun 1;852(1–2):420–429.
159. Pigliasco F, Cafaro A, Simeoli R, et al. A UHPLC–MS/MS Method for Therapeutic Drug Monitoring of Aciclovir and Ganciclovir in Plasma and Dried Plasma Spots. *Biomedicines*. 2021 Oct 2;9(10):1379.
160. Belabbas T, Yamada T, Tsuchiya Y, et al. Development and Full Validation of a Bioanalytical Method for Quantifying Letermovir in Human Plasma Using Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2021 Jul 1;69(7):646-651.
161. Kacirova I, Urinovska R, Sagan J. Therapeutic monitoring of serum concentrations of acyclovir and its metabolite 9-(carboxymethoxymethyl) guanine in routine clinical practice. *Biomed Pharmacother*. 2022 Dec;156:113852.
162. Takeda S, Ueno S, Zenda R, et al. Simultaneous analysis of acyclovir and its metabolite using hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2024 May 20;48(4):204–209.
163. Yadav M, Upadhyay V, Singhal P, et al. Stability evaluation and sensitive determination of antiviral drug, valacyclovir and its metabolite acyclovir in human plasma by a rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009 Mar 15;877(8–9):680–688.
164. Ärlemalm A, Helldén A, Karlsson L, et al. Rapid determination of acyclovir, its main metabolite 9-carboxymethoxymethylguanine, ganciclovir, and penciclovir in human serum using LC–MS/MS. *Biomed Chromatogr*. 2022 Apr 28;36(4):e5315.
165. Teshima D, Otsubo K, Yoshida T, et al. A simple and simultaneous determination of acyclovir and ganciclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2003 Dec 20;17(8):500–503.

166. Katada Y, Nakagawa S, Nagao M, et al. Trough ganciclovir concentration as predictor of leukopenia in lung transplant recipients receiving valganciclovir prophylaxis. *Transpl Infect Dis.* 2023 Dec 28;25(6):e14141.
167. Manuel O, Pascual M, Perrottet N, et al. Ganciclovir exposure under a 450 mg daily dosage of valganciclovir for cytomegalovirus prevention in kidney transplantation: a prospective study. *Clin Transplant.* 2010 Nov 2;24(6):794–800.
168. Royston L, Masouridi-Levrat S, Gotta V, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Orally Administered Letermovir Prophylaxis in Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Aug 16;66(8):e0065722.
169. Marty FM, Ljungman P, Chemaly RF, et al. Letermovir Prophylaxis for Cytomegalovirus in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2017 Dec 21;377(25):2433–2444.
170. Martinez S, Sindu D, Nailor MD, et al. Evaluating the efficacy and safety of letermovir compared to valganciclovir for the prevention of human cytomegalovirus disease in adult lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2024 Jun 14;26(3):e14279.
171. Li WW, Zhang YM, Shen MZ, et al. Efficacy and safety of letermovir prophylaxis for cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Sci.* 2024 Jan 10;6(1):e00178.
172. Russo D, Schmitt M, Pilorge S, et al. Efficacy and safety of extended duration letermovir prophylaxis in recipients of haematopoietic stem-cell transplantation at risk of cytomegalovirus infection: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2024 Feb;11(2):e127–e135.
173. Groll AH, Schulte JH, Antmen AB, et al. Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Adolescent Hematopoietic Cell Transplantation Recipients. *Pediatr Infect Dis J.* 2024 Mar 19;43(3):203–208.
174. Robbins JA, Menzel K, Lassman M, et al. Acute and Chronic Effects of Rifampin on Letermovir Suggest Transporter Inhibition and Induction Contribute to Letermovir Pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2022 Mar 15;111(3):664–675.
175. Malespini J, Lei M, Tavares E, et al. Letermovir and tacrolimus interaction effects in hematopoietic cell transplantation recipients receiving moderate cytochrome P450 3A4 inhibitors for antifungal prophylaxis. *J Oncol Pharm Pract.* 2023 Oct 17;29(7):1574–1579.
176. McCrea JB, Menzel K, Adedoyin A, et al. Drug-Drug Interaction of Letermovir and Atorvastatin in Healthy Participants. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022 Apr 14;11(4):420–428.
177. Goodlet KJ, Garcia R. Effect of letermovir initiation on tacrolimus concentrations among lung transplant recipients receiving concomitant azole antifungal prophylaxis. *Transpl Infect Dis.* 2024 Apr;26(2):e14267.

178. Chen TT, David AP, Barthelmess EK, et al. Letermovir for Cytomegalovirus prophylaxis in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatr Blood Cancer*. 2023 Nov 7;70(11):e30608.
179. Nguyen VL, Darman M, Ireland A, et al. A high performance liquid chromatography fluorescence method for the analysis of both pyridoxal-5-phosphate and thiamine pyrophosphate in whole blood. *Clin Chim Acta*. 2020 Jul;506:129–134.
180. Kahoun D, Fojtíková P, Vácha F, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for determination of B vitamins and some its derivatives in whole blood. *PLoS One*. 2022 Jul 14;17(7):e0271444.
181. Zhang M, Liu H, Huang X, Shao L, Xie X, Wang F, Yang J, Pei P, Zhang Z, Zhai Y, Wang Q, Zhang T, Huang J, Cui X. A novel LC-MS/MS assay for vitamin B1, B2 and B6 determination in dried blood spots and its application in children. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2019 Apr 1;1112:33–40.
182. Urinovska R, Sistik P, Buzga M, et al. Fast and Easy Simultaneous Determination of Riboflavin, Folic Acid, All-Trans-Retinol and α -Tocopherol in Human Serum by LC/MS/MS for Bariatric Patients. *J Chromatogr Sci*. 2024 Jun 6;bmae035.
183. Peersman N, Elslande J Van, Lepage Y, et al. UPLC-MS/MS method for determination of retinol and α -tocopherol in serum using a simple sample pretreatment and UniSpray as ionization technique to reduce matrix effects. *Clin Chem Lab Med*. 2020 Apr 28;58(5):769–779.
184. Wang HB, Xiao X, He XY, et al. Advancing towards practice: A novel LC-MS/MS method for detecting retinol in dried blood spots. *Talanta*. 2024 Oct 1;278:126491.
185. Boulet L, Alex B, Clavey N, et al. Simultaneous analysis of retinol, six carotenoids, two tocopherols, and coenzyme Q10 from human plasma by HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2020 May 29;1151:122158.
186. Lamers Y. Approaches to improving micronutrient status assessment at the population level. *Proc Nutr Soc*. 2019 May 15;78(02):170–176.
187. Marley A, Smith SC, Ahmed R, et al. Vitamin A deficiency: experience from a tertiary referral UK hospital; not just a low- and middle-income country issue. *Public Health Nutr*. 2021 Dec 12;24(18):6466–6471.
188. Traber MG. Vitamin E Inadequacy in Humans: Causes and Consequences. *Adv Nutr*. 2014 Sep;5(5):503–514.
189. Smith TJ, Johnson CR, Koshy R, et al. Thiamine deficiency disorders: a clinical perspective. *Ann N Y Acad Sci*. 2021 Aug 10;1498(1):9–28.
190. Xia L, Chen M, Liu M, et al. Nationwide Multicenter Reference Interval Study for 28 Common Biochemical Analytes in China. *Medicine*. 2016 Mar;95(9):e2915.

191. Ozarda Y, Ichihara K, Aslan D, et al. A multicenter nationwide reference intervals study for common biochemical analytes in Turkey using Abbott analyzers. *Clin Chem Lab Med.* 2014 Jan 1;52(12):1823-1833.
192. Wosniok W, Haeckel R. A new indirect estimation of reference intervals: truncated minimum chi-square (TMC) approach. *Clin Chem Lab Med.* 2019 Nov 26;57(12):1933–1947.
193. Martinez-Sanchez L, Cobbaert CM, Noordam R, et al. Indirect determination of biochemistry reference intervals using outpatient data. *PLoS One.* 2022 May 19;17(5):e0268522.
194. Evliyaoglu O, van Helden J, Imöhl M, et al. Mining the Age-Dependent Reference Intervals of B Vitamins from Routine Laboratory Test Results. *Lab Med.* 2019 Jan 1;50(1):54–63.
195. Albahrani A, Greaves RF, Ward G, et al. Vitamin A and E gender and age stratification in adults. *Clin Chem Lab Med.* 2020 Feb 25;58(3):e79-e82.
196. Rigo-Bonnin R, Aliart-Fernández I, Escalante-Vilanova A, et al. Calculation of reference intervals for the concentrations of α -tocopherol and retinol in serum using indirect data-mining procedures. *Clin Chim Acta.* 2024 Jul 15;561:119822.
197. Olmedilla B, Granado F, Southon S, et al. Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr.* 2001 Feb 9;85(2):227–238.
198. Al-Saleh, El-Doush, Billedo. Age and Gender-Related Reference Values for Serum dl- α -Tocopherol and All-Trans-Retinol Levels in Saudi Population. *Int J Vitam Nutr Res.* 2007 Sep 1;77(5):326–335.
199. Veres G, Szpisjak L, Bajtai A, et al. The establishment of tocopherol reference intervals for Hungarian adult population using a validated HPLC method. *Biomed Chromatogr.* 2017 Sep 7;31(9).
200. Lu J, Frank EL. Rapid HPLC Measurement of Thiamine and Its Phosphate Esters in Whole Blood. *Clin Chem.* 2008 May 1;54(5):901–906.
201. Bagash H, Marwat A, Marwat A, et al. A Case of Chronic Wernicke Encephalopathy (WE): An Underdiagnosed Phenomena. *Cureus.* 2021 Oct 28;13(10):e19100.
202. van Zelst BD, de Jonge R. A stable isotope dilution LC–ESI-MS/MS method for the quantification of pyridoxal-5'-phosphate in whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012 Aug 15;903:134–141.
203. van Zelst BD, de Beer RJACR, Neele M, et al. A multicenter comparison of whole blood vitamin B6 assays. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Jan 1;54(4):609-616.
204. Steen G, Vlasveld L, Poot C, et al. Onderzoek naar referentiewaarden van laboratoriumonderzoek in een algemeen ziekenhuis: resultaten en bevindingen. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2009;34:35–43.

205. Cheng WY, Fu ML, Wen LJ, et al. Plasma retinol and a-tocopherol status of the Taiwanese elderly population. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2005;14(3):256–262.
206. Thurnham DI, Davies JA, Crump BJ, et al. The Use of Different Lipids to Express Serum Tocopherol: Lipid Ratios for the Measurement of Vitamin E Status. *Ann Clin Biochem.* 1986 Sep 29;23(5):514–520.
207. Kang* MJ, Lin* YC, Pan WH, et al. Vitamin E status and its dietary determinants in Taiwanese. *Eur J Nutr.* 2004 Apr 1;43(2):86–92.
208. Jeon D, Son M, Shim J. Dynamics of Serum Retinol and Alpha-Tocopherol Levels According to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Status. *Nutrients.* 2021 May 19;13(5):1720.
209. Evliyaoglu O, van Helden J, Imöhl M, et al. Vitamin B1 interpretation: Erroneous higher levels in non-anemic populations. *Nutrition.* 2019 Apr;60:25–29.
210. Karvaly GB, Vásárhelyi B. Therapeutic Drug Monitoring and Pharmacokinetics-Based Individualization of Drug Therapy. *Pharmaceutics.* 2024 Jun 11;16(6):792.
211. Seyfinejad B, Jouyban A. Overview of therapeutic drug monitoring of immunosuppressive drugs: Analytical and clinical practices. *J Pharm Biomed Anal.* 2021 Oct 25;205:114315.
212. Gaspar VP, Ibrahim S, Zahedi RP, et al. Utility, promise, and limitations of liquid chromatography-mass spectrometry-based therapeutic drug monitoring in precision medicine. *J Mass Spectrom.* 2021 Nov 4;56(11):e4788.

ANEXO I. CUESTIONARIO.

CUESTIONARIO PARA EL PACIENTE

Edad

Sexo (F/M)

Ayuno ≥ 8 horas (SI/NO)[†]

Obesidad ó IMC ≥ 30 (SI/NO)[†]

1. Tiene o ha tenido alguna de las siguientes patologías (Marcar si la respuesta es SI):

Enfermedad renal[†]

Síndrome de intestino corto/Cirugías relacionadas[†]

Colitis ulcerosa/Enfermedad de Crohn[†]

Hipercolesterolemia[†]

Celiaquía

Úlcera gástrica

Diabetes mellitus

Hipotiroidismo

Hipertensión arterial

Anemia

Otras enfermedades autoinmunes

2. Hábitos de vida saludables (Marcar si la respuesta es SI):

Ingesta esporádica de alcohol (nada o menos de una UBE/día. Responder SI en caso de que se confirme la ingesta esporádica)

Ejercicio físico regular (20-30 min diarios)

Alimentación variada

3. Tratamientos farmacológicos habituales (Marcar si tratamiento actual):

Suplementos vitamínicos[†]

AINEs

Diuréticos

Antihipertensivos

Estatinas

Anticoagulantes orales

Antidiabéticos (metformina, insulina, etc.)

[†]Criterios excluyentes. Una o más opciones marcadas, excluye al individuo del estudio.

the 1990s, the number of people with a mental health problem has increased in the UK (Mental Health Act 1983, 1990).

There is a growing awareness of the need to improve the lives of people with mental health problems. The Department of Health (1999) has set out a strategy for mental health care in the UK. The strategy is based on the following principles:

- People with mental health problems should be treated as individuals.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to participate in decisions about their care and treatment.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to live in their own homes and communities.

The strategy also states that people with mental health problems should be given the opportunity to work and to contribute to society.