



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Determinación farmacocinética del ácido micofenólico
durante la coadministración de omeprazol en niños
mexicanos con trasplante renal”**

T E S I S

Que presenta

JOSE ANTONIO MANCILLAS QUIROZ

Para obtener el Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Dra. Mara Medeiros Domingo

Ciudad de México

Diciembre, 2018

La presente investigación se realizó bajo la dirección y apoyo del Dr. Gilberto Castañeda Hernández y la Dra. Mara Medeiros Domingo. Las instalaciones del Centro de investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, así como del Hospital Infantil de México Federico Gómez, fueron las adecuadas para llevar a cabo el desarrollo del proyecto.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para que este proyecto de investigación se lleve a cabo.

Dedicatorias

Blanca Estela Quiroz Cruz...

Nombre del ser más complicado, pero al mismo tiempo el más maravilloso a quién eh tenido la fortuna de conocer durante 26 años. Sin usted, yo no estaría escribiendo nada en este momento, sin su fuerza, yo no tendría la capacidad de vivir, sin sus enseñanzas, yo no tendría el valor de enfrentar el mundo, sin su amor, yo, simplemente no sabría cómo ser feliz. Hoy madre mía, Dios me da la oportunidad de ver su convicción, su fuerza, su voluntad, y aprender de ello. Hoy celebró que de entre millones de personas, Dios tuviera a bien dejarme en sus manos para que en mí y Laurita pusiera lo mejor de usted, hoy madre mía, celebro que de entre esas millones de personas, Dios la eligiera para ser mi madre, gracias por existir, usted sabe cuánto la amo, sin su ejemplo, créame, nada de esto sería posible.

Dedicatorias

Diana Laura Mancillas Quiroz...

Pequeño Goru, hermanita linda, no tienes idea todo lo que aprendo día con día de ti, tu, eres mi ejemplo, mi fuerza, un pequeño motorcito que me impulsa a seguir adelante, quiero que sepas que si he llegado a donde estoy, es en gran parte gracias a ti, te prometo que un día veras reflejado todo el esfuerzo e ímpetu que pones en tu vida, te amo.

A mi familia entera, a mis abuelitos maternos quienes nunca me han dejado caer y me han impulsado a salir adelante, a mis tíos que han estado ahí para darme un consejo, sobre todo a Héctor Rocha “el hetor”, quién ha sido para mí un gran ejemplo.

Especialmente a Dios. Para muchos la ciencia está peleada con él, para mí no. Yo agradezco que me dé la oportunidad de tratar de comprender lo que es para mí, su más fascinante creación, el ser humano.

Agradecimientos

Dr. Gilberto...

Por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por esas platicas amenas que enriquecen y por la formación adquirida. Que gran ejemplo de humildad y profesionalismo, me llevo muchas cosas buenas de usted, simplemente, gracias.

Dra. Mara...

Otro gran ejemplo de profesionalismo, muchísimas gracias por la confianza y todo el apoyo brindado para que este proyecto se realizará con éxito, gracias por abrirme las puertas del HIMFG y por permitirme aprender de un ambiente totalmente nuevo para mí.

Agradecimientos

Q.F.B. Maria de Lourdes...

Gracias por el gran apoyo técnico y por todas tus enseñanzas, eres una excelente persona, eh aprendido más que ciencia, eh aprendido el valor de ella.

Gracias a todos los doctores del departamento de Farmacología por compartir sus conocimientos en los cursos de prerrequisitos y de la maestría, en especial al Dr. Jose Luis Reyes y la Dra. Liliana Favari por participar como sinodales en este proyecto.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio 34, por sus consejos y por todo el conocimiento que compartieron conmigo, son excelentes personas.

Gracias a todo el equipo de la Dra. Maras en el HIMFG, siempre amables y atentas, fue un placer trabajar con ustedes.

Muchísimas gracias a mis compañeritos de la maestría, sin su apoyo, consejos y amistad, no hubiera sido nada fácil esta etapa de mi vida, gracias Lalo, Vicky, Moni y Yare, los quiero, aunque no lo demuestre mucho, ustedes lo saben.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
Trasplante	1
Trasplantes renales en el Hospital Infantil de México	2
Terapia Farmacológica	3
Prednisona	4
Tacrolimus	4
Ácido micofenólico	5
Mecanismo de acción	6
Presentaciones y posología	6
Farmacocinética	7
Monitoreo clínico de AMF	8
Reacciones adversas	9
Comedicación	10
Uso concomitante de antiácidos (Inhibidores de la bomba de protones)	11
Métodos analíticos para la cuantificación de AMF	13
Cromatografía Líquida de Alta Resolución	14
Desarrollo de métodos analíticos por CLAR	16
Validación de métodos analíticos para cuantificar fármacos en matriz biológica con la técnica de CLAR	17
Selectividad	18
Curva de calibración:	19
Límite inferior de cuantificación (LIC)	19
Repetibilidad	20
Reproducibilidad	20
Estabilidad	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS PARTICULARES	23
MATERIALES	24
Material biológico	24
Equipo	24
Material instrumental	25
Sustancias de referencia, reactivos y solventes	25
MÉTODOS	26
Desarrollo y validación del método	27
Preparación de soluciones:	27
Preparación de la curva estándar y los puntos control	28
Extracción líquido-líquido	29

Validación del método.....	29
Obtención de las muestras plasmáticas.....	30
Criterios.....	31
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
IMDH	Inosin monofosfato deshidrogenasa
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
AMF	Ácido micofenólico
MMF	Micofenolato de mofetilo
Cmax	Concentración máxima
LIC	Límite inferior de cuantificación
TR	Tiempo de retención
CE-AMF	Ácido micofenólico con capa entérica
E.I.	Estándar interno
D.E.	Desviación estándar
Tmax	Tiempo máximo
RAE	Real Academia Española
CENATRA	Centro nacional de trasplantes
CENETEC	Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
CES	Carboxilesterasa
Ac-AMFG	Acil glucurónido del ácido micofenólico
AMFG	Glucurónido del ácido micofenólico
UGT	Uridinadifosfato glucuroniltransferasa
C0	Concentración a las 0 horas
C12	Concentración a las 12 horas
T1/2	Tiempo de vida media
EMIT	Ensayo inmunológico por Multiplicación enzimática

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la curva estándar y de los puntos control bajo, medio y alto.

Tabla 2. Selectividad endógena. Tiempos de retención (TR) representativos de fármacos de uso común con AMF. N/A=no aparece señal en el cromatograma obtenido.

Tabla 3. Variabilidad. Resultados de la relación promedio del ABC del AMF y el E.I. para cada concentración nominal de la curva de calibración.

Tabla 4. Límite inferior de cuantificación. Análisis por quintuplicado de la concentración más baja del rango de trabajo.

Tabla 5. Repetibilidad del método. Análisis por sextuplicado de la concentración Baja, Media, Alta y del LIC que se encuentran dentro del intervalo de trabajo en un mismo día y en tres corridas analíticas diferentes.

Tabla 6. Reproducibilidad del método. Análisis por sextuplicado de la concentración Baja, Media, Alta y del LIC que se encuentran dentro del intervalo de trabajo. En la tabla se encuentra el promedio de seis corridas analíticas en dos días diferentes.

Tabla 7. Estabilidad a corto plazo. Análisis por triplicado de los puntos control bajo y alto a las 24, 48 y 72h.

Tabla 8. Datos demográficos de los pacientes.

Tabla 9. Pruebas de normalidad. El ABC y Cmax son datos normales (paramétricos ($P>0.05$)), en contraparte, Tmax, C0 y C12 son datos con una distribución no normal (No paramétricos ($P<0.05$)).

Tabla 10. No existe diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) que determinen una diferencia en los parámetros farmacocinéticos entre el grupo de niños que toma omeprazol y el grupo que no lo hace.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido micofenólico.

Figura 2. Inhibición de la síntesis de *ново* de purinas por acción del AMF.

Figura 3. Disminución del ABC del AMF en un grupo de pacientes con trasplante de corazón que toman pantoprazol de manera concomitante con la terapia inmunosupresora en comparación con un grupo que no lo hace. Tomada de Kofler et al., 2009.

Figura 4. Perfil farmacocinético de AMF en un grupo de pacientes pediátricos chinos con trasplante renal que toman omeprazol y MMF (ABC= 19.71 μ g*h/mL) y un grupo que toma CE-AMF (ABC= 29.72 μ g*h/mL). Tomado de Xu et al., 2014.

Figura 5. Esquema representativo de la metodología que se llevó a cabo en este proyecto de investigación.

Figura 6. Cromatograma del AMF y su E.I. (Diclofenaco), con un tiempo de retención (TR) igual a 2.6min y 4.1min, respectivamente. La resolución entre los picos es mayor a 1.5.

Figura 7. Selectividad endógena. A) Cromatograma representativo de la muestra blanco en seis plasmas. B) Cromatograma representativo de la muestra cero en seis plasmas con la adición del E.I.

Figura 8. Curva de calibración (Promedio \pm D.E., n=3), evaluada para la cuantificación de AMF en plasma, se observa un coeficiente de correlación igual a 0.9999 y el modelo matemático $y = 0.1228x + 0.0275$.

Figura 9. Reporte del estudio farmacocinético de AMF. El reporte incluye el ABC0-12h, Cmax, Tmax, C0 y C12.

Figura 10. Perfil farmacocinético (Promedio \pm D.E.) de pacientes que toman MMF sin omeprazol (n=23) y con omeprazol (n=26), no existen diferencia estadística entre ambos grupos (p= 0.7562).

RESUMEN

Introducción. El ácido micofenólico (AMF) es utilizado en la terapia inmunosupresora de mantenimiento en receptores de trasplante renal, actúa como agente antiproliferativo inhibiendo de manera reversible la inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), es un fármaco con ventana terapéutica estrecha y se debe realizar su monitoreo clínico, para ello, se mide el ABC_{0-12h} ($30-60\mu g \cdot h/mL$) o la concentración valle ($1-3.5\mu g/mL$). Existen diversos factores que pueden modificar la concentración del AMF en sangre, la administración de fármacos concomitantes es uno de ellos, por ende, es necesario comprobar si existe modificación en los parámetros farmacocinéticos del AMF en niños mexicanos con trasplante renal que toman omeprazol junto con la terapia inmunosupresora.

Materiales y métodos. Se reclutaron pacientes del HIMFG cuyo tratamiento incluyera o no omeprazol, se realizó la extracción de muestras plasmáticas, posteriormente se cuantificó AMF con el desarrollo y validación de un método analítico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR). Se obtuvo el perfil farmacocinético de cada paciente generando el análisis no compartamental por medio del software WinNonlin®. El análisis estadístico para comparar ambos grupos se realizó empleando el software GraphPad Prism®.

Resultados. El grupo que toma AMF en concomitancia con omeprazol ($n=26$), presenta un ABC_{0-12h} promedio de $41.10 \pm 31.17\mu g \cdot h/mL$ y el grupo que no lo hace ($n=23$), presenta un ABC_{0-12h} promedio de $42.48 \pm 29.32\mu g \cdot h/mL$.

Conclusiones. El ABC_{0-12h} promedio de ambos grupos se encuentra dentro del rango de referencia que se asocia a seguridad y eficacia, sin embargo, es importante analizar los parámetros farmacocinéticos de forma individual, ya que existen pacientes con valores muy por debajo de la ventana terapéutica y otros muy por encima. El promedio es menor en el grupo que toma omeprazol, sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.7562$) que demuestre que el omeprazol modifica el ABC_{0-12h} del AMF en pacientes pediátricos con trasplante renal.

ABSTRACT

Introduction. Mycophenolic acid (MPA) is used in maintenance immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. It acts as an antiproliferative agent, reversibly inhibiting Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH). It is a drug with a narrow therapeutic window, its clinical monitoring must be carried out, for this, the AUC_{0-12h} ($30-60\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) or the trough concentration ($1-3.5\mu\text{g}/\text{mL}$) is measured. There are several factors that can modify the concentration of MPA in blood, the administration of concomitant drugs is one of them, and therefore it is necessary to check if there is modification in the pharmacokinetic parameters of MPA in Mexican children with kidney transplant who take omeprazole together with the immunosuppressive therapy.

Materials and methods. Patients were recruited from HIMGF whose treatment included or not omeprazole. The extraction of plasma samples was performed, and then MPA was quantified with the development and validation of an analytical method of High Resolution Liquid Chromatography (HPLC). The pharmacokinetic profile of each patient was obtained generating the non-compartmental analysis using the WinNonlin® software. The statistical analysis to compare both groups was performed using the GraphPad Prism® software.

Results. The group that takes MPA in concomitance with omeprazole ($n = 26$), has an average AUC_{0-12h} of $41.10 \pm 31.17\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ and the group that does not ($n = 23$), presents an average AUC_{0-12h} of $42.48 \pm 29.32\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$.

Conclusion. AUC_{0-12h} average of both groups is within the reference range that is associated with safety and efficacy, however, it is important to analyze the pharmacokinetic parameters individually, since there are patients with values well below the therapeutic window and others very above. The average is lower in the group taking omeprazole, however, there is no statistically significant difference ($p = 0.7562$) that demonstrates that omeprazole modifies the AUC_{0-12h} of the MPA in pediatric patients with kidney transplantation.

INTRODUCCIÓN

Trasplante

Se define como un tratamiento médico complejo que consiste en sustituir un órgano, tejido o células en mal estado (no funcional), por otro en buen estado (funcional) de una parte del cuerpo a otra o de un individuo a otro (RAE, 2014). Se denomina receptor a la persona que recibe el beneficio del trasplante y donador a la persona que proporciona el órgano, tejido o células (CENATRA, 2018). Existen dos tipos de donadores, los vivos y los cadavéricos, la diferencia en cuanto a la supervivencia de un paciente que recibe un trasplante de un donador vivo es aproximadamente del 12% mayor en comparación con los que lo reciben de un donador cadavérico (Pascual et al., 2002; Medeiros et al., 2005).

Los trasplantes se clasifican según la relación que existe entre el receptor y el donador (CENETEC, 2009):

-Autólogo: El donador y el receptor son la misma persona, por lo tanto, el riesgo de rechazo por parte del sistema inmunológico es nula.

-Singénico: Es el que se lleva a cabo entre gemelos, al ser genéticamente idénticos, no existe riesgo de rechazo.

-Alogénico: Este es el más común, el donador y receptor son de la misma especie, pero presentan marcadas diferencias genéticas, lo que genera un potencial riesgo de rechazo.

Xenotrasplante: El receptor y el donador pertenecen a dos especies distintas, no es muy común, genera un inminente rechazo.

El trasplante es considerado cada vez más como tratamiento de elección a causa de insuficiencia terminal de algún órgano, entre ellos se encuentran el

pulmón, corazón, estómago, córneas, piel, riñones, entre otros. En el año 2007 se llevó a cabo la segunda Reunión Consultiva Mundial sobre Trasplante en donde se concluyó que el órgano con más alta demanda en el mundo es el riñón, en 2005 se trasplantaron 66,000, lo que representa sólo el 10% de la demanda estimada. Ese mismo año se trasplantaron 21,000 hígados y 6,000 corazones. Aunque aumenta el número de trasplantes de riñón y de hígado, también aumenta la demanda, dicha demanda no puede ser atendida (OMS, 2007). La situación en México no es diferente, para octubre del 2017 existían 13,633 pacientes en espera de un riñón, 7,318 en espera de una córnea y 345 de un hígado (CENATRA, 2018), si se considera además que existen aproximadamente 60,000 pacientes que se encuentran en diálisis, los cuales también pueden ser candidatos a un trasplante renal (Cueto et al., 2008), es fácil observar que no puede cubrirse tan alta demanda en nuestro país.

Trasplantes renales en el Hospital Infantil de México

En el año 1967 se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) el primer trasplante renal en niños en Latinoamérica, y desde entonces su programa atiende pacientes fundamentalmente de bajos recursos socioeconómicos (Bracho et al., 2011).

En adultos mexicanos, las principales causas de enfermedad renal terminal son la diabetes y la hipertensión arterial, en los niños, en la mayoría de los casos, no puede realizarse el diagnóstico preciso de la causa que ocasionó la uremia ya que acuden tarde en busca de atención médica. Las principales causas conocidas son las malformaciones congénitas del tracto urinario (displasia, hipoplasia, malformaciones urinarias) seguidas de las glomerulopatías y enfermedades poliquísticas (Medeiros et al., 2011; Orta et al., 2016).

Los principales tipos de rechazo que pueden presentarse en los pacientes pediátricos son (Hernández et al., 2005; Chan et al., 2009):

-Rechazo hiperagudo: Se origina al estar en contacto el órgano con la sangre del receptor. Tiene una evolución muy rápida, normalmente dentro de las primeras 48 horas. Es el ataque inmunológico más importante y destructivo contra el injerto. Es consecuencia de la activación de anticuerpos preformados y factores del complemento circulantes, con actividad específica contra un antígeno incompatible del donante, se acoplan y destruyen el endotelio vascular. Este tipo de rechazo tiene un índice bajo de incidencia.

-Rechazo agudo: Se origina desde los primeros días hasta varios meses después del trasplante. Se da por activación primaria de los linfocitos T del receptor. Este rechazo es un problema clínico importante principalmente en el trasplante renal y se produce hasta en el 60% de los receptores.

-Rechazo crónico: Describe las alteraciones encontradas en la insuficiencia funcional tardía de órganos, tales como el riñón, corazón o pulmón. Se refiere al rechazo por factores inmunológicos y no inmunológicos, la insuficiencia tardía de los injertos es un proceso complejo y multifactorial. Este tipo de rechazo es, en la actualidad, muy difícil de tratar y la causa del mayor número de pérdidas de trasplantes de larga evolución en todos los órganos.

Terapia Farmacológica

A lo largo de la historia se ha mejorado la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes con trasplante, uno de los principales factores es la introducción de fármacos capaces de inhibir la respuesta del sistema inmunológico (inmunosupresores) contra el órgano, al inicio surgieron muchas dudas acerca del uso de una politerapia, ya que se desencadenaba la inmunosupresión excesiva costando la vida de muchos pacientes (Sayegh., 2004), sin embargo, hoy en día debido a la gran posibilidad existente de rechazo, se modula el sistema inmunológico con esta politerapia desde etapas muy tempranas al procedimiento quirúrgico, mejorando el pronóstico de vida del órgano. Inmediatamente después del trasplante se emplean dosis iniciales muy elevadas de inmunosupresores (Halloran et al, 2004), una vez que el paciente

responde de manera satisfactoria y se encuentra estable, las dosis de los inmunosupresores son disminuidas paulatinamente.

Actualmente, la farmacoterapia de los pacientes trasplantados consiste en utilizar la combinación de dos o tres fármacos inmunosupresores: prednisona, tacrolimus y ácido micofenólico. La eficacia durante el primer año del tratamiento concomitante de los tres inmunosupresores es del 98-99% (Heeger., 2012), la ventaja al usar los tres inmunosupresores se debe a que cada fármaco tiene su blanco farmacológico y, por ende, su propio mecanismo de acción. Al inhibir la respuesta del sistema inmunológico desde diferentes niveles aumenta la eficacia y disminuye la probabilidad de toxicidad en comparación con el uso de una monoterapia (Orta et al., 2016; Halloran et al., 2004).

Prednisona

Su uso es limitado y la tendencia es eliminar o reducir al mínimo su aplicación debido a sus efectos adversos. Los corticosteroides atraviesan con gran facilidad la membrana celular debido a su alto grado de liposolubilidad y se unen con alta afinidad a los receptores citoplasmáticos. El complejo formado modula algunos procesos transcripcionales involucrados en la expresión de citocinas involucradas en el funcionamiento celular. Algunas de las acciones medidas por los glucocorticoides como la prednisona, son la inhibición de la infiltración de los leucocitos en los procesos inflamatorios, la interferencia con los mediadores de la inflamación como la IL-1 y por lo tanto, la supresión de la respuesta humoral (Curtis., 2006).

Tacrolimus

Es considerado el fármaco más importante en la inmunosupresión. Se une a la proteína fijadora FK12 (FKBP12), una inmunofilina intracelular, este complejo se

une a la calcineurina dando como resultado la inhibición de su actividad como fosfatasa. La desfosforilación del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) y su traslocación al núcleo del linfocito T no se lleva a cabo y con ello se inhibe la expresión de citocinas muy importantes en la proliferación y diferenciación de los linfocitos como la IL-4, IL-3, el factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma. La inhibición de dichas citocinas es fundamental para que se lleve a cabo la supresión de la activación de células T (Duncan et al., 2005).

Ácido micofenólico

El nombre IUPAC del ácido micofenólico es 4e)-6-(4-hydroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidro-2-benzofurano-5-il)-4-metil-exo-4-ácido-enoico. Su fórmula molecular es $C_{17}H_{20}O_6$, su peso molecular es de 320.4g/mol, es soluble en agua (1mg/mL a 20°C) y metanol (50mg/mL), su pKa es de 4.9 y su punto de fusión se alcanza a los 141°C (ChemSpider, 2015), en su estructura se puede observar grupos funcionales como ácidos carboxílicos, alcoholes y cetonas que le confieren polaridad (Figura 1).

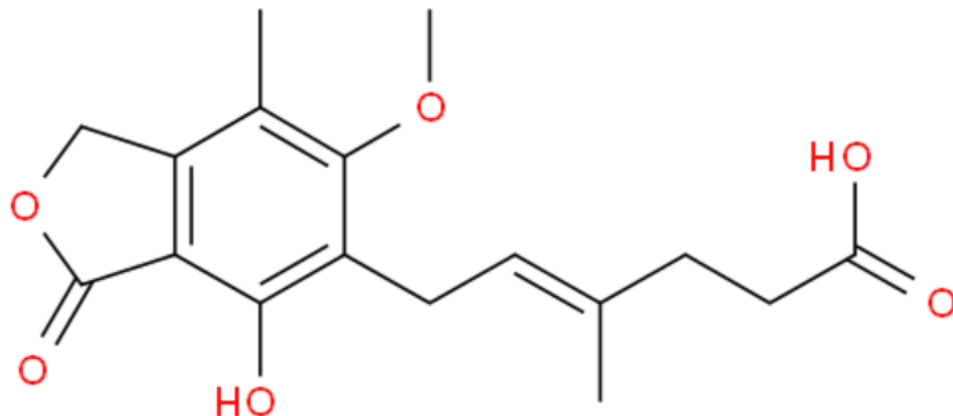


Figura 1. Estructura química del ácido micofenólico.

Es un fármaco que forma parte de la terapia inmunosupresora estándar para la prevención del rechazo de órganos en trasplantes, fue aislado por primera vez del hongo *Penicillin glaucum*, en el año 1896 por un médico italiano, Bartolomeo Gosio (Noto et al., 1969), aunque también se obtiene de otros como el

Penicillium stoloniferum (Allison et al., 2005). Se encontró que la molécula presentaba propiedades antifúngicas y antibacterianas, años después se descubrió que provocaba también un efecto inmunosupresor (Mitsui et al., 1969), generando que se prolongara la vida útil de un órgano trasplantado (Meier et al., 2003).

Mecanismo de acción

Es un inhibidor potente, reversible y selectivo de la inosin monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), una enzima limitante en la síntesis de *novo* de purinas (Adenina y Guanina) en los linfocitos T y B. Inhibiendo así la proliferación por parte de los linfocitos T y la formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B, este efecto inhibitorio se explica por la dependencia de los linfocitos de obtener guanina por la vía de *novo* (Figura 2) y no por la vía alternativa de biosíntesis del nucleótido, provocando no solo la inmunosupresión celular, sino también la humoral al inhibir la producción de algunas citocinas como la IL-2 y los anticuerpos (Díaz et al., 2008).

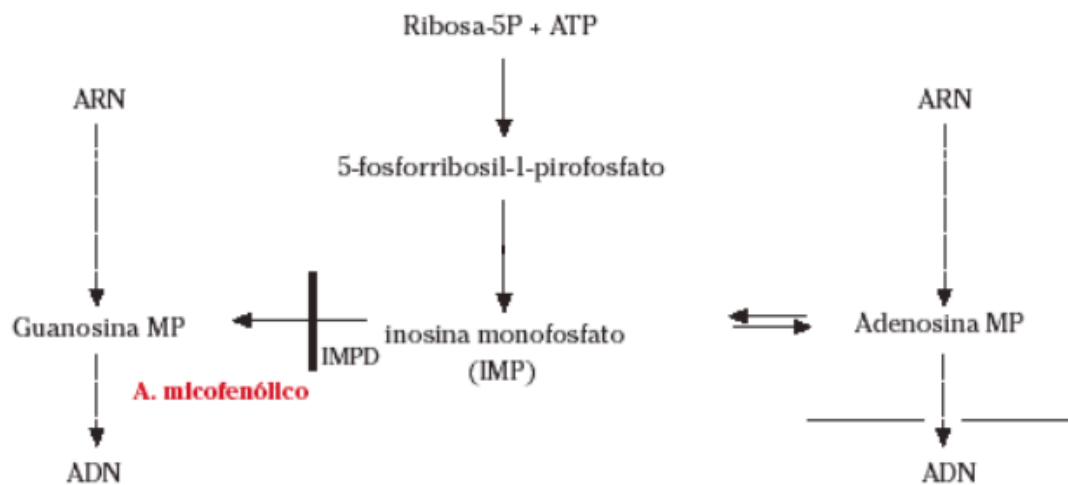


Figura 2. Inhibición de la síntesis de *novo* de purinas por acción del AMF.

Presentaciones y posología

En el mercado existen dos diferentes formas de comercializar al AMF, la primera es el micofenolato de mofetilo (MMF), un éster del AMF comercializado

por la farmacéutica Roche bajo la denominación distintiva CellCept®, presentadas en cápsulas de 250mg y tabletas de 500mg (Staatz et al., 2007), en México existe la comercialización de algunos genéricos (Tevacept®) cuya biodisponibilidad en pacientes pediátricos ha probado su adecuada intercambiabilidad ya que los parámetros farmacocinéticos (ABC_{0-12h} y C_{max}) obtenidos en un estudio, no demuestran diferencia estadísticamente significativa (González et al., 2014).

La otra presentación de AMF es su sal sódica, este fármaco se encuentra disponible en tabletas con capa entérica (CE-AMF) cuyo fin es proteger al fármaco del pH gástrico, la comercialización la realiza la farmacéutica Novartis bajo la denominación distintiva Myfortyc®, existen tabletas con capa entérica de 180mg y 360mg. Un estudio en niños mexicanos ha demostrado que la intercambiabilidad de una formulación (MMF) a otra (CE-AMF) es segura y eficaz, por lo que usar una u otra solo retrasa el pico de la concentración máxima y no afecta el ABC_{0-12h} ni la C_{max} , siempre y cuando se emplee una dosificación equimolar (Reyes et al., 2010). La dosis recomendada de MMF es de 1.5-3g al día, repartido en 2 o 3 tomas y se calcula en 1200mg por metro cuadrado de superficie corporal (CENETEC, 2009).

Farmacocinética

Después de la administración oral de CE-AMF, este se absorbe principalmente en el intestino delgado una vez que el pH neutro disuelve poco a poco la capa entérica de la formulación, por lo tanto, existe menos probabilidad de generar trastornos gastrointestinales en comparación con el profármaco MMF. La administración oral del MMF, por otro lado, requiere la acción de las carboxilesterasas (CES1 y CES2) para hidrolizar al éster y producir el AMF, el MMF que escapa a la acción de la CES2 en el intestino llega por la vía portal a los hepatocitos donde se expresan ambas carboxilesterasas, liberando el AMF a la circulación (Staatz et al., 2007; Reyes et al., 2010). La biodisponibilidad del

AMF es mayor al 90%, presentando una concentración máxima en sangre de 1 a 2 horas postadministración y un segundo máximo entre 6 y 12 horas generado por recirculación enterohepática.

El AMF se une en un 97% a la albúmina humana, es metabolizado por las diferentes isoformas de la uridinadifosfato glucuroniltransferasa (UGT), la principal isoforma involucrada en su metabolismo es la UGT1A9, la cual se expresa en hígado, intestino y riñón, dando como resultado al metabolito inactivo 7 hidroxiglucurónido del AMF (AMFG), este metabolito es excretado en un 93% por secreción tubular y filtración glomerular. También existe evidencia de que el AMFG se excreta por vía biliar en aproximadamente un 6%, por lo que, al llegar al intestino, las bacterias residentes lo transforman a AMF provocando toxicidad y posiblemente los efectos gastrointestinales observados, esta es también la razón por la cual se observa recirculación enterohepática (Staatz et al., 2007; Hyunyoung et al., 2007). Otro metabolito del AMF es el acilglucurónido del AMF (Ac-AMFG) generado por acción de la UGT2B7, este metabolito también se relaciona con los efectos adversos que produce el AMF ya que es un metabolito que induce liberación de citosinas en los leucocitos (Hyunyoung et al., 2007; Wieland et al., 2007).

El $t_{1/2}$ es de 17 horas, se ha observado que a dosis normalizadas de AMF, éste puede mostrar un ABC variable en hasta 10 veces. La concentración de AMF debe ser interpretada con el debido cuidado en pacientes con disfunción renal aguda o en aquellos en los que la unión a proteínas plasmáticas se encuentra comprometida (Staatz et al., 2007).

Monitoreo clínico de AMF

La variación de la relación dosis-respuesta hace complicada la dosificación de medicamentos, los que presentan ventana terapéutica estrecha son los más

complejos. La respuesta obtenida tras la administración de un medicamento a una dosis determinada puede variar de un individuo a otro, por lo tanto se pueden obtener efectos terapéuticos adecuados, toxicidad o ineficacia (Gross., 2001). Por ello es necesario el monitoreo terapéutico, es decir, la determinación de la cantidad de fármaco específico en sangre y relacionarlo a intervalos publicados para la optimización del régimen de dosificación y así obtener mejores resultados clínicos (Gross., 2001)

No es necesario monitorear todos los fármacos, la mayoría presenta un amplio margen de seguridad, pero existen grupos de fármacos en los que es necesario debido a su estrecho margen terapéutico y su amplia variabilidad farmacocinética. Algunos ejemplos de este tipo de fármacos son los agentes cardiovasculares, antibióticos, psicofármacos, antiepilépticos, antineoplásicos e inmunosupresores (USAL., 1999)

El paciente pediátrico trasplantado muestra un comportamiento similar al adulto, muestra gran variabilidad intra e interindividual en la farmacocinética del AMF, tanto en fases tempranas después del trasplante (Weber et al., 2002), como en las etapas de mantenimiento (Ghin et al., 2005).

El AMF es un inmunosupresor con ventana terapéutica estrecha, monitorear su concentración en sangre es muy importante, la mejor manera de llevar a cabo la vigilancia de los niveles en sangre es medir el ABC_{0-12h} . El nivel terapéutico deseado en niños se relaciona con un ABC de entre 30-60 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ y las concentraciones en valle deben estar entre 1 y 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Reyes et al., 2010; Weber et al., 2002).

Reacciones adversas

Durante el seguimiento de los pacientes mediante el monitoreo de las concentraciones plasmáticas de AMF se utilizan algunos descriptores de

exposición (C_{max}), en pacientes adultos, se considera que al presentar una C_{max} por arriba de $32.8\mu\text{g/mL}$, se incrementa la probabilidad de presentar problemas de toxicidad, esta asociación no ha podido realizarse en pacientes pediátricos, sin embargo, se sugiere que la C_{max} debería ser menor a $10\mu\text{g/mL}$ para evitar reacciones adversas (Mourad et al., 2001; David et al., 2003; Hale et al., 1998).

Entre las reacciones adversas que se presentan a causa de una sobreexposición del AMF en pacientes con trasplante renal, se encuentran las infecciones virales y bacterianas que ocasionan diarreas, gripes e infecciones diversas, esto debido a una exacerbada depresión del sistema inmunológico (Bunnapradist et al., 2008). Por otro lado, las reacciones adversas más comunes son el síndrome de constipación, gases, dolor de cabeza, vómitos y anorexia. Cabe mencionar que la reacción más común y representativa es la acidez estomacal seguida de reflujo (Burg et al., 2009; Filler et al., 2016). Se ha comprobado que la formulación con capa entérica (CE-AMF) disminuye algunas de estas reacciones adversas cuando se compara con la administración oral de la formulación sin capa entérica (MMF) y se administra de una manera adecuada (Reyes et al., 2010).

Debido a la presencia de las reacciones adversas mencionadas con anterioridad, los pacientes con trasplante renal, además de la politerapia inmunosupresora, son prescritos con diferentes fármacos cuya finalidad radica en revertir dichas reacciones.

Comedicación

La administración concomitante de algunos fármacos con AMF modifica su biodisponibilidad, es decir, la concentración de este en sangre. Se ha demostrado que la administración de antibióticos como ciclosporina, produce la inhibición de la secreción biliar del AMFG, además de disminuir la población de

la microbiota bacteriana en el paciente, reduciendo así la recirculación enterohepática del AMF. La exposición del AMF cuando es administrado en concomitancia con ciclosporina es de 30 a 40% menor, que cuando se administra solo, con tacrolimus o sirolimus (Staatz et al., 2007).

Los corticosteroides por su parte, al ser administrados a altas dosis junto con AMF, pueden inducir la expresión de la UGT y reducir la exposición al AMF debido al incremento de su metabolismo (Staatz et al., 2007).

Comedicaciones ajenas a la terapia inmunosupresora pueden también interferir con la recirculación enterohepática, el metabolismo o la absorción del AMF. Un ejemplo de ello es el uso concomitante de Aciclovir, el cual puede aumentar la concentración de AMF probablemente por competencia en la secreción tubular renal (Monostory et al., 2018), en contraparte, otros antivirales pueden disminuir la recirculación enterohepática al competir con el AMF por el mismo transportador a nivel biliar (Staatz et al., 2007).

Uso concomitante de antiácidos (Inhibidores de la bomba de protones)

Existe una gran población de pacientes trasplantados a los que además de la terapia inmunosupresora se les prescribe un medicamento para contrarrestar la acidez estomacal, ya que es la reacción adversa más importante y común.

Las sales de aluminio y magnesio (Simeticona), cuando se administran de manera concomitante con AMF, disminuyen su ABC y la Cmax en aproximadamente un 37% y 25%, respectivamente (Filler et al., 2016).

Los inhibidores de la bomba de protones son un grupo de fármacos antiácidos que en la actualidad se usan de manera cotidiana en los pacientes trasplantados, al igual que la simeticona, con el fin de contrarrestar la acidez estomacal. Se ha demostrado que su uso reduce la absorción de algunos

fármacos cuando se administran de manera concomitante, entre ellos se encuentran el ketoconazol, la ampicilina, el itraconazol y las sales de hierro (Andersson et al., 1996).

Un estudio realizado entre 2006 y 2008 en pacientes adultos con trasplante de corazón, demostró que la comedición de un inhibidor de la bomba de protones (pantoprazol) modifica la farmacocinética del AMF. En este estudio se realizó la comparación de dos grupos, uno que tomaba de manera concomitante pantoprazol con AMF y un grupo que no lo hacía, el resultado fue la disminución en los parámetros farmacocinéticos del AMF del grupo que tomó pantoprazol, entre ellos, el ABC (Figura 3), y la Cmax. Los autores atribuyen estos resultados al descenso de la acidez, lo cual probablemente provoca la inhibición de la absorción del AMF (Kofler et al., 2009).

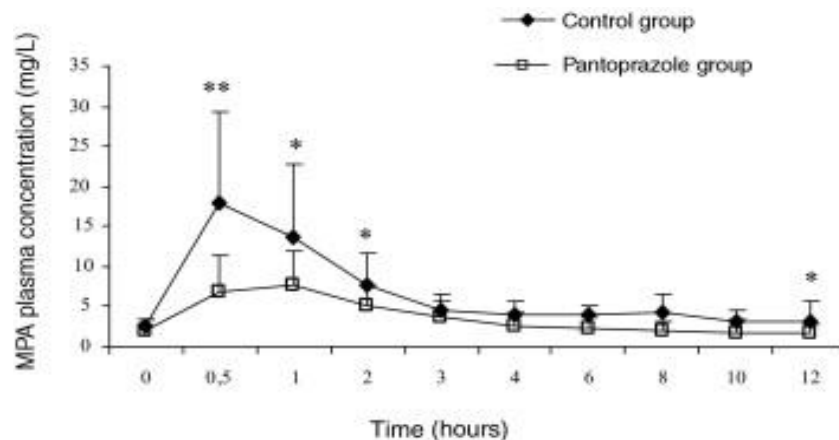


Figura 3. Disminución del ABC del AMF en un grupo de pacientes con trasplante de corazón que toman pantoprazol de manera concomitante con la terapia inmunosupresora en comparación con un grupo que no lo hace. Tomada de Kofler et al., 2009.

Otro estudio que involucró a pacientes pediátricos chinos con trasplante renal comparó los parámetros farmacocinéticos en dos grupos que tomaban omeprazol de manera concomitante con AMF, en este caso se compararon dos grupos, uno que tomaba la formulación MMF y otro que tomó la formulación CE-AMF. Se observó que los parámetros farmacocinéticos ABC (Figura 4), Cmax, Tmax y t_{1/2} fueron más altos en el grupo que tomaba la formulación con capa entérica.

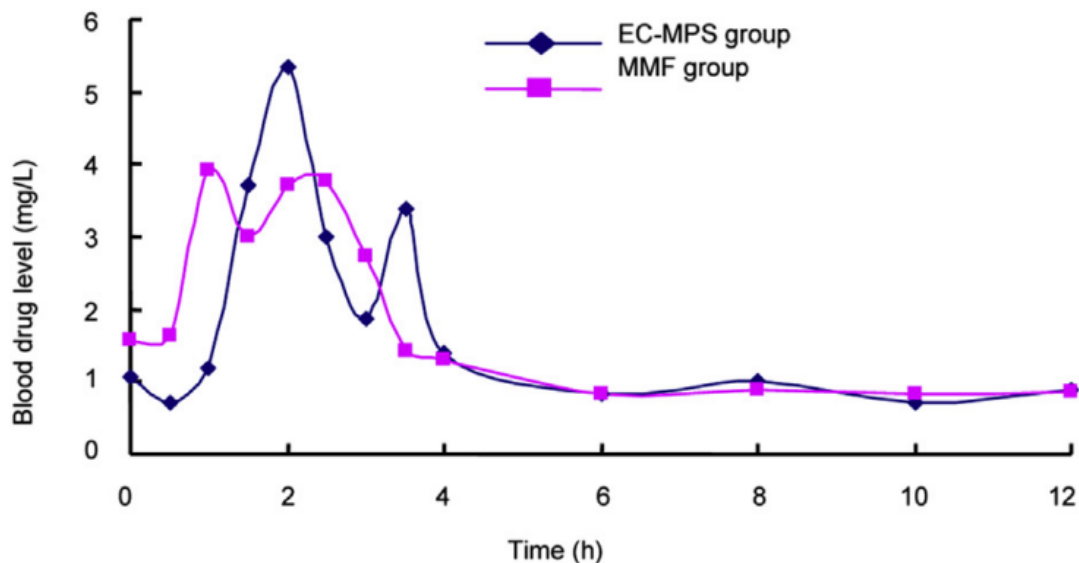


Figura 4. Perfil farmacocinético de AMF en un grupo de pacientes pediátricos chinos con trasplante renal que toman omeprazol y MMF ($ABC= 19.71\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$) y un grupo que toma CE-AMF ($ABC= 29.72\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$). Tomado de Xu et al., 2014.

La razón por la cual la biodisponibilidad es mayor en el grupo que tomó la formulación con recubrimiento puede asociarse a que el omeprazol tiene menor influencia en la inhibición de la absorción en comparación con el grupo que tomó MMF (Xu et al., 2014).

Métodos analíticos para la cuantificación de AMF

Es complicado medir la concentración de un fármaco en el sitio de acción. La biodisponibilidad es la cantidad de fármaco que tras su administración logra pasar de manera inalterada las barreras biológicas hasta llegar a la circulación (NOM-177-SSA1, 2013), y posteriormente a su sitio de acción (Malgor et al., 2009). Medir la concentración en este lugar resulta complejo, por ello, frecuentemente se utiliza la concentración plasmática, ya que ésta se relaciona con el nivel máximo que un fármaco alcanza en el organismo (Malgor et al., 2009). Considerando las características fisicoquímicas del fármaco, los métodos analíticos pueden también adecuarse, justificadamente, para utilizar cualquier

otra matriz biológica, por ejemplo, sangre total, orina, saliva o sudor (Escobar et al., 2016).

Para realizar la cuantificación de AMF en plasma humano existen diferentes técnicas, destacan el ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT por sus siglas en inglés) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (Patel et al., 2006). Al comparar ambas técnicas, puede observarse que por el ensayo inmunológico existe una sobreestimación en las determinaciones debido parcialmente a las reacciones cruzadas con los metabolitos del AMF; el glucurónido (AMFG) y el glucurónido acilado (Ac-AMFG), éste último el más reactivo (Elbarbry et al., 2007; Schütz et al., 2000). Es por ello que el uso de CLAR se prefiere para cuantificar AMF en el plasma humano, ya que es más selectivo y por ende, capaz de discernir al analito de interés de posibles sustancias endógenas (Flores et al., 2002).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La Cromatografía se definió en el año 1900 por el botánico ruso Mikhail S. Tswett. Sus estudios pioneros se centraron en la separación de compuestos coloridos extraídos de plantas mediante el uso de un disolvente en una columna rellena de partículas. Llenaba una columna de vidrio abierta con carbonato de calcio o alúmina. El extracto de las plantas lo colocaba por encima de la columna abierta, colocaba un disolvente y observaba como la gravedad separaba en diversos colores su muestra. Posteriormente, atribuyó esta separación a la atracción química que tienen los componentes de la muestra con el material de relleno de la columna. Sencillamente, los componentes más fuertemente atraídos por el material de relleno descendían más lentamente y los que eran atraídos químicamente por el disolvente, descendían a una mayor velocidad (Waters., 2009). Tswett tomó el nombre de cromatografía de la palabra griega *khromatos*=color y *graphia*=escritura, “escritura de color” ya que lo que observó fue una separación colorida.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución, es hoy en día, la herramienta básica más utilizada en el desarrollo de métodos analíticos para cuantificar fármacos. Esta técnica presenta gran capacidad para separar compuestos, así como una gran sensibilidad y especificidad, no requiere de grandes volúmenes de muestra y puede medirse más de un fármaco a la vez (Mayolo et al., 2012).

Es, esencialmente, un método físico en el cual los componentes de una mezcla compleja se separan y se distribuyen entre dos fases, una de ellas es un lecho estacionario, mientras que la otra se mueve por percolación a través de éste. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes (Yost et al., 1981).

Esta técnica se clasifica en cromatografía de: exclusión o filtración en gel (SEC por sus siglas en inglés), intercambio iónico (IEC por sus siglas en inglés), interacción hidrofóbica (HIC por sus siglas en inglés) y fase reversa (RPC por sus siglas en inglés). La utilización de una u otra dependerá de las características fisicoquímicas del analito de interés y de los objetivos de cada método analítico (Mayolo et al., 2012).

La cromatografía en fase reversa es lo contrario a la fase normal, en este caso, la fase estacionaria es de naturaleza no polar, generalmente se trata de un hidrocarburo, mientras que la fase móvil es un solvente polar, generalmente agua, metanol o acetonitrilo. Es considerada la más versátil, ya que los solventes utilizados son más seguros y menos costosos (Waters et al., 2009).

Desarrollo de métodos analíticos por CLAR

El desarrollo de un método que por medio de la cromatografía nos permita cuantificar o detectar fármacos se realiza cuando no existe ya un método oficial en la bibliografía, sin embargo, también puede llevarse a cabo como alternativa a métodos ya existentes con el fin de reducir costos y tiempo de análisis, esto, manteniendo o mejorando la robustez (Bhardwaj et al., 2015).

Lo primero que se debe contemplar son las características fisicoquímicas del analito de interés, se debe conocer su pH, pKa, solubilidad, punto de fusión, etc. Esto, con el fin de elegir los disolventes adecuados para construir la fase móvil y elegir la fase estacionaria adecuada (Bhardwaj et al., 2015).

Establecidas las condiciones cromatográficas, es decir, el tipo de columna, composición de la fase móvil y tipo de detector, se procede a establecer, acorde al enfoque del análisis, las condiciones en que se van a preparar las muestras problema (Bardwaj et al., 2015).

Por último, se debe llevar a cabo la optimización del método, es decir, mejorar las condiciones de la técnica. Se logra por medio de las pruebas de ensayo y error al modificar variables como: composición de la fase móvil, la fase estacionaria (columna), acidez de la fase móvil, temperatura, volumen de inyección, detector, y flujo. Con ello se obtiene un adecuado equilibrio entre resolución y tiempo de análisis (Bardwaj et al., 2015).

No es suficiente llevar a cabo el desarrollo de un método analítico que nos permita cuantificar un fármaco con la ayuda de las diferentes técnicas de CLAR en matriz biológica, si este no se encuentra debidamente validado, los resultados de la metodología simplemente no son confiables y, por lo tanto, carecen de utilidad.

Validación de métodos analíticos para cuantificar fármacos en matriz biológica con la técnica de CLAR

De acuerdo con la normatividad mexicana, la validación, se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado (NOM-177-SSA1, 2013). Antes de comenzar a enumerar los parámetros indicados en la norma y sus criterios de aceptación, es importante definir dos conceptos:

1.-Exactitud: Concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor nominal o de referencia (NOM-177-SSA1, 2013), es decir, qué tanto se parecen los resultados obtenidos a los reales. El porcentaje de desviación (%Desviación) se utiliza para medir la exactitud, este se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{Desviación} = (100) \times \left(\frac{((\text{Concentración adicionada}) - (\text{Concentración obtenida}))}{(\text{Concentración adicionada})} \right)$$

2.-Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente (NOM-177-SSA1, 2013), es decir, que tanto se parecen los resultados obtenidos entre sí. El coeficiente de variación (%C.V.) se utiliza para medir la precisión, este se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{C.V.} = \left(\frac{(\text{Desviación estándar})}{(\text{Promedio})} \right) \times (100)$$

La validación se basa en el cumplimiento de los criterios de aceptación de los siguientes parámetros, ya que, al hacerlo, el método se vuelve confiable.

Selectividad

Este parámetro tiene como objetivo demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de esta. En el caso donde la matriz biológica es plasma o sangre se analiza por separado la matriz biológica normal, lipémica y hemolizada. En los métodos donde el analito de interés es una entidad endógena, la evaluación de la selectividad, se centra en que el método sea capaz de diferenciar la cuantificación del analito de interés adicionado intencionalmente, del presente en la matriz biológica (NOM-177-SSA1, 2013).

La selectividad se evalúa llevando a cabo la corrida analítica de la muestra blanco (No contiene el analito de interés y en su caso, tampoco al estándar interno) y la muestra control cero (No contiene al analito de interés y en su caso, si al estándar interno). En el cromatograma de la muestra blanco solo debe observarse el pico característico del frente del solvente y en la muestra cero un pico característico del estándar interno. Adicionalmente, se realiza la corrida analítica de una muestra que contenga al estándar interno y al analito de interés, los picos obtenidos no deben solaparse y debe existir una buena resolución entre ellos ($R_s > 1.5$).

El cálculo de la resolución se efectúa con la siguiente ecuación:

$$R_s = (t_2 - t_1) / ((1/2)(w_1 + w_2))$$

Donde:

t= tiempo de retención y w=anchura del pico.

Además de demostrar la no interferencia de compuestos endógenos, se debe demostrar que no existe interferencia de compuestos exógenos, para ello se lleva a cabo la corrida analítica de muestras que contienen fármacos concomitantes o fármacos de uso común, de igual manera, en muestras donde

se aprecie la señal en el cromatograma, debe calcularse la resolución para cada una de ellas respecto al analito de interés y en su caso, respecto al estándar interno.

Curva de calibración:

Se prepara en la misma matriz biológica que las muestras a analizar. Para construirla, se establece por lo menos un rango de trabajo de 6 concentraciones diferentes en función de las esperadas durante el análisis de las muestras problema, estas concentraciones no deben incluir la muestra blanco. Se establecen también 3 puntos control (bajo, medio y alto) los cuales deben estar dentro del rango de trabajo (NOM-177-SSA1, 2013).

Se debe demostrar que existe correlación entre la concentración nominal del analito y la respuesta del método. Una vez establecido el rango, se debe analizar un mínimo de 3 curvas de calibración preparadas de forma individual, obteniendo un coeficiente de correlación (r^2) mayor a 0.99 en cada una, y un porcentaje de concentración recuperada sobre el del valor nominal menor al 15% en cada punto, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual puede ser menor o igual al 20% (NOM-177-SSA1, 2013). Las concentraciones recuperadas se obtienen a partir del modelo matemático " $y=mx+b$ " (ecuación de la recta), este modelo matemático describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta obtenida.

Límite inferior de cuantificación (LIC)

Se determina con base en el 5% de la $C_{m\acute{a}x}$ reportada para el analito de interés, a menos que los objetivos del estudio especifiquen algo diferente, por ejemplo, un muestreo truncado, una distribución rápida o alta variabilidad farmacocinética. Se define como la cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable

(NOM-177-SSA1, 2013). Para que el límite inferior de cuantificación sea validado se debe llevar a cabo la evaluación por quintuplicado de la concentración nominal más baja y al obtener las concentraciones recuperadas, estas deben estar dentro del $\pm 20\%$ de la desviación promedio para la exactitud y no exceder el 20% del coeficiente de variación para la precisión.

Repetibilidad

Validar este parámetro es una forma de calificar tanto al equipo cromatográfico como a todo el equipo instrumental utilizado en la metodología.

Para conferir repetibilidad, se debe analizar en un mismo día y al menos por quintuplicado la corrida analítica de los puntos control bajo, medio, alto y el LIC, puntos que se encuentran dentro del rango de trabajo establecido en la curva de calibración. Posteriormente, se debe calcular la concentración obtenida para cada nivel, interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. La norma establece como criterio de aceptación una desviación del $\pm 15\%$ para la exactitud y un $\%C.V. \leq 15\%$ para la precisión, excepto para el LIC el cual permite hasta un 20% en ambos casos (NOM-177-SSA1, 2013).

Reproducibilidad

Validar este parámetro es una forma de evaluar el error del analista, por lo que la adición de otro analista requiere una nueva evaluación.

Para que un método analítico pueda ser reproducible se debe analizar al menos por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, los puntos control bajo, medio, alto y el LIC. Se debe calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. La norma establece como criterio de aceptación una desviación del

$\pm 15\%$ para la exactitud y un $\%C.V. \leq 15\%$ para la precisión, excepto para el LIC, el cual permite hasta un 20% en ambos casos (NOM-177-SSA1, 2013).

Estabilidad

Se debe determinar las condiciones en que un fármaco permanece estable en la matriz biológica acorde al procesamiento, manejo y almacenamiento de las muestras problema en cada método analítico. Para ello, se lleva a cabo el análisis por triplicado de los puntos control bajo y alto, los cuales son analizados inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidos a las condiciones a evaluar. Las muestras control son interpoladas en una curva de calibración recién preparada y las concentraciones obtenidas son comparadas contra la concentración nominal. La concentración promedio en cada nivel no debe exceder el $\pm 15\%$ de la concentración (NOM-177-SSA1, 2013).

JUSTIFICACIÓN

El ácido micofenólico tras su administración oral presenta una farmacocinética muy variable debido a la gran diferencia intra e interindividual, al ser un fármaco de ventana terapéutica estrecha es muy común observar que los pacientes queden expuestos a reacciones adversas importantes (Gastrointestinales), los médicos, con la finalidad de revertir dichas reacciones prescriben medicamentos como Omeprazol, éste fármaco, al disminuir la acidez estomacal podría ejercer un efecto importante en la biodisponibilidad del AMF, incrementando con ello la probabilidad de rechazo debido a una posible ineficacia terapéutica.

HIPÓTESIS

La coadministración de un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol) en el tratamiento inmunosupresor de niños mexicanos con trasplante renal, reduce la absorción del ácido micofenólico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe modificación farmacocinética del ácido micofenólico en niños mexicanos con trasplante renal cuando se coadministra un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol) con la terapia inmunosupresora.

OBJETIVOS PARTICULARES

-Desarrollar y validar un método analítico de CLAR acoplado a UV para cuantificar AMF en plasma, acorde a la NOM-177-SSA1-2013.

-Cuantificar la concentración plasmática de AMF en pacientes pediátricos que hayan tenido un trasplante renal y que lleven o no, un tratamiento con omeprazol junto a la terapia inmunosupresora por medio de la técnica de CLAR.

-Obtener parámetros farmacocinéticos como ABC_{0-12h} y C_{max} para determinar si existen diferencias entre el grupo que toma omeprazol junto con la terapia inmunosupresora y el grupo que no lo hace.

-Determinar si los parámetros farmacocinéticos del AMF obtenidos están dentro del intervalo que se asocia a seguridad y eficacia.

MATERIALES

Material biológico

-Para la validación del método se utilizó plasma humano de fuentes independientes (6 voluntarios sanos) provenientes del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

-Para la construcción de los perfiles farmacocinéticos se utilizó plasma humano de pacientes pediátricos del Hospital Infantil Federico Gómez (HIMFG).

Equipo

Para el desarrollo y validación del método analítico se utilizaron las instalaciones y equipo del laboratorio 34 del departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) sede Zacatenco:

-Sistema cromatográfico HITACHI Primade®, el cual contiene un módulo de detección UV, un horno, automuestreador y una bomba. Además, se le adicionó una columna ZORBAX® Eclipse Plus C-18, 3.5um, 150mm.

- Agitador vórtex marca Scientific Industries, modelo Genie 2.

-Agitador vórtex marca IKA, modelo MS 3 Digital.

-Centrífuga marca Eppendorf, modelo MiniSpin.

-Balanza analítica marca Sartorius, modelo BL 210S.

-Baño de ultrasonido marca Cole-Parmer, modelo 8845-40.

-Baño de ultrasonido marca Branson, modelo 3510-R-MT.

-Potenciómetro marca Beckman, modelo pH 32.

-Parrilla de agitación marca Bearnstead/Thermolyne, modelo SP46925.

-Ultracongelador marca ScienTemp, modelo 80-9.4A.

-Pipeta de repetición electrónica marca Gilson, modelo Repetman.

-Pipeta de repetición marca Eppendorf, modelo 4780.

- Pipeta de volumen variable de 100-1000 μL , marca Dragon Lab.
- Pipeta de volumen variable de 10-100 μL , marca Dragon Lab.
- Refrigerador marca Metalfrio, modelo REB301.
- Ultrafiltrador de agua Sartorius, modelo arium®

Material instrumental

- Matraces volumétricos de 25, 20 y 1000mL.
- Probeta graduada de 500 y 1000mL.
- Puntas para pipeta de repetición.
- Viales para automuestreador de 2mL.
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitado de vidrio de 50, 100, 250 y 1000mL.
- Gradillas.
- Microtubos de 2mL.
- Puntas para pipeta de volumen ajustable de 100-1000 μL .
- Puntas para pipeta de volumen ajustable de 10-100 μL .
- Espátula.
- Guantes de nitrilo.
- Filtro tipo HVLP, 45 μm .

Sustancias de referencia, reactivos y solventes

- Ácido micofenólico, Sigma-Aldrich, hecho en Israel, pureza $\geq 98\%$, Lote: #124M4011V, CAS 2428-93-1.
- Diclofenaco sódico, Sigma-Aldrich, hecho en China, pureza $\geq 98.5\%$, Lote: #BCBN3367V, CAS 15307-79-6.
- Agua desionizada grado HPLC, proveniente del Ultrafiltrador.
- Metanol grado HPLC, CAS 67-56-1, J. T. Baker.
- Acetonitrilo grado HPLC, CAS 75-05-8, Honeywell.

-Fosfato de potasio monobásico cristal, CAS 7778-77-0, J.T. Baker.

-Hidróxido de sodio, CAS 1310-73-2, J.T. Baker.

MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo en pacientes con trasplante renal del Hospital Infantil de México que se encontraban bajo tratamiento inmunosupresor, el cual incluía al AMF, tomaran o no, de manera concomitante, omeprazol. El estudio tuvo como objetivo el determinar si existe diferencia significativa en los parámetros farmacocinéticos del AMF entre dos grupos de pacientes, uno que tomara omeprazol junto con la terapia inmunosupresora y un grupo que no lo hiciera. Para lograrlo, se llevó a cabo el desarrollo y validación de un método analítico de CLAR para cuantificar AMF en plasma humano. Posterior a la validación del método, se obtuvieron las concentraciones plasmáticas de los pacientes. Con el software WinNonlin® se obtuvo el perfil farmacocinético de cada paciente y los parámetros como ABC_{0-12h} , C_{max} , T_{max} , C_0 y C_{12} . Al final, por medio del software GraphPad Prism® se realizó el análisis estadístico para comparar ambos grupos (Figura 5).

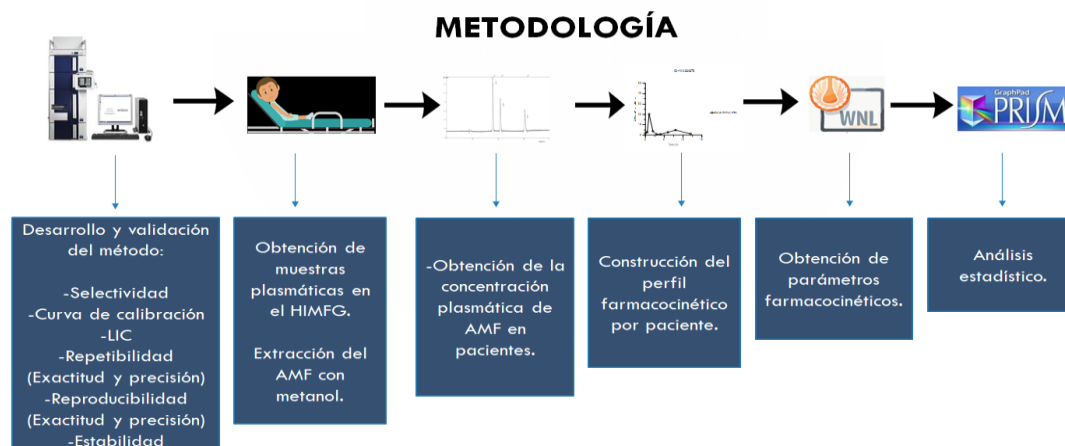


Figura 5. Esquema representativo de la metodología que se realizó en este proyecto de investigación.

Desarrollo y validación del método

Se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica de las características fisicoquímicas del AMF y de los métodos cromatográficos existentes. Posteriormente, para determinar las condiciones finales del método, se realizaron pruebas donde se modificó la composición y pH de la fase móvil, flujo, volumen de inyección y temperatura. Dichas pruebas se realizaron con soluciones acuosas para obtener señales cromatográficas tanto del AMF como de su estándar interno (EI), el Diclofenaco Sódico. Una vez que se obtuvo señal de las muestras acuosas, se realizó la búsqueda de un método de extracción en plasma.

Preparación de soluciones:

-Solución estándar A (AMF [250 μ g/mL]):

Se pesó el equivalente a 5.0mg de sustancia de referencia de AMF y se transfiere a un matraz volumétrico de 20mL y se lleva al aforo con metanol.

-Solución estándar B (AMF [5 μ g/mL]):

Se transfiere de la solución A, un volumen de 0.5mL a un matraz volumétrico de 25mL y se lleva al aforo con metanol.

-Solución de estándar interno (Diclofenaco [200 μ g/mL]):

Se pesa el equivalente a 5.0mg de diclofenaco sódico y se transfiere a un matraz volumétrico de 25mL, e disuelve y se afora con metanol.

-Solución de lavado (ACN: AGUA 50:50v/v):

Se mide en una probeta graduada 500mL de agua y 500mL de ACN, se transfirió a un frasco con tapa y se filtró.

-Solución amortiguadora de fosfatos (KH₂PO₄ 0.04M, pH=4.0):

Se pesan 5.44g de fosfato monobásico de potasio, se diluye en un vaso de precipitado de 1000mL con agua grado cromatográfico hasta disolver

completamente, se ajusta pH con solución concentrada de HCl o NaOH, se transfiere a un matraz volumétrico de 1000mL y se lleva a aforo con agua.

-Fase móvil (ACN: KH₂PO₄ 0.04M, pH=4.0 60:40v/v):

Se agregan 600mL de ACN en una probeta graduada de 1000mL, posteriormente se agregan 400mL de la solución amortiguadora de fosfatos y se filtra. La solución filtrada se transfiere a un frasco y se sonico por 10 minutos.

Preparación de la curva estándar y los puntos control

La curva se construyó basándose en las concentraciones esperadas de las muestras problema y de las concentraciones máximas reportadas en la bibliografía, en la tabla 1 se puede observar la preparación de las muestras.

Tabla 1. Preparación de la curva estándar y de los puntos control bajo, medio y alto.

Curva de calibración						
Punto	Concentración (µg/mL)	AMF Solución A (µL)	AMF Solución B (µL)	Diclofenaco Sódico E.I (µL)	Volumen de plasma (µL)	Volumen de extractante MeOH (µL)
Blanco	-	-	-	-	100	900
0	0	-	-	50	100	850
1	0.5	-	100	50	100	750
2	1	-	200	50	100	650
3	5	20	-	50	100	830
4	10	40	-	50	100	810
5	20	80	-	50	100	770
6	40	160	-	50	100	690
Muestras Control						
Control	Concentración (µg/mL)	AMF Solución A (µL)	AMF Solución B (µL)	Diclofenaco Sódico E.I (µL)	Volumen de plasma (µL)	Volumen de extractante MeOH (µL)
Bajo	0.8	-	160	50	100	690
Medio	7.5	30	-	50	100	820
Alto	30.0	120	-	50	100	730

Extracción líquido-líquido

Para realizar la extracción se realizó el siguiente procedimiento para cada punto de la curva:

Se colocó en tubos eppendorf de 2mL los volúmenes correspondientes a cada punto de la curva según lo indicado en la tabla 1. Se agitó a 3000rpm durante 300segundos, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante de los tubos a viales y se inyectaron 20µL al sistema cromatográfico. Se observó el cromatograma y se obtuvieron las áreas de los picos.

Validación del método

Selectividad:

Para determinar la selectividad de manera endógena, se utilizó el plasma libre de fármaco proveniente de seis fuentes independientes, se llevó a cabo la corrida analítica de la muestra blanco (sin AMF ni EI), la muestra cero (EI) y el punto 3 de la curva (contiene AMF y EI). Para determinar la selectividad en cuanto a sustancias exógenas, se realizó la corrida analítica con la adición de otros fármacos de uso común; Ácido acetilsalicílico, Cafeína, Acetaminofén, Ciclosporina A, Ambroxol, Bromhexina y Captopril.

Curva de calibración:

Para construir la curva de calibración, se estableció un intervalo de 6 concentraciones (0.5µg/mL, 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL y 40µg/mL), en función a las esperadas del AMF durante el análisis de las muestras. Se analizaron 3 curvas de calibración obteniendo un coeficiente de correlación (r^2) promedio y el porcentaje de concentración recuperada sobre el del valor nominal en cada punto de la curva. Las concentraciones se obtuvieron con el modelo matemático " $y=mx+b$ ", el cual describe adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta obtenida.

Límite inferior de cuantificación:

Para determinar el límite inferior de cuantificación, se realizó la evaluación por quintuplicado de la concentración nominal más baja (0.5µg/mL).

Repetibilidad:

Para determinar la repetibilidad del método, se llevó a cabo el análisis por sextuplicado de los puntos control Bajo (0.8µg/mL), Medio (7.5µg/mL), Alto (30µg/mL) y LIC (0.5µg/mL), las cuales se encuentran dentro del rango de trabajo, esto, en un mismo día y en tres corridas analíticas diferentes (Intradía).

Reproducibilidad:

Para evaluar la reproducibilidad del método, se analizó por sextuplicado, en seis corridas analíticas y en dos días diferentes, los puntos control bajo (0.8µg/mL), Medio (7.5µg/mL), Alto (30µg/mL) y LIC (0.5µg/mL), que se encuentran dentro del rango de trabajo (Interdía).

Estabilidad:

Para evaluar la estabilidad a corto plazo del AMF en la matriz biológica (plasma), se prepararon por triplicado las muestras control Bajo y Alto que se encuentran dentro del rango de trabajo, se almacenaron en condiciones de refrigeración a -4°C hasta su posterior análisis a las 24h, 48h y 72h. Las muestras control se extrapolaron en curvas preparadas cada 24h.

Obtención de las muestras plasmáticas

Posterior al desarrollo y validación del método analítico, se comenzó a reclutar pacientes del HIMFG. Los pacientes fueron captados en la consulta externa, se les invitó a participar en el estudio explicándoles de manera detallada el procedimiento y resolviendo cualquier duda. Los pacientes que aceptaron se citaron de manera programada al sitio de toma de muestras. En este sitio se llevó a cabo la firma del consentimiento informado por parte del padre o tutor y la firma del asentimiento (cuándo fuera mayor a 8 años) por parte del niño.

En el sitio de toma de muestras se colocó un yelco en el brazo del paciente, se extrajeron 3.5 mL de sangre como primera muestra en un tubo microtainer con anticoagulante, posteriormente se registró la hora en que el paciente tomó sus medicamentos (AMF y en su caso omeprazol) y a partir de ese momento se realizó la toma de muestras de 1mL a los siguientes tiempos: 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12horas. Las muestras se centrifugaron para obtener el plasma y éste se congeló a -20°C hasta su análisis.

La concentración de cada muestra proveniente de los pacientes se obtuvo construyendo una curva de calibración con sus puntos control por duplicado y con la ecuación de la recta generada. Cada tiempo de muestreo se analizó por duplicado obteniéndose el promedio de sus áreas en cada cromatograma.

Con las concentraciones y el software WinNonlin® se construyó el perfil farmacocinético de cada paciente y se calcularon los parámetros farmacocinéticos. Los resultados fueron proporcionados al médico tratante.

Por último, se dividió a los pacientes en dos grupos, un grupo que tomó de manera concomitante omeprazol junto con la terapia inmunosupresora que incluía al AMF y un grupo que no lo hizo. Por medio del software GraphPad Prism® se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk y se realizó la prueba t de student para los datos paramétricos, así como la prueba U de Mann Whitney para los datos no paramétricos.

Crterios

Como criterios de inclusión se tomó en cuenta que los niños tuvieran una edad de entre 2 y 19 años, uso concomitante o no de omeprazol, firma del consentimiento informado por parte del padre o tutor y firma del asentimiento por parte del niño cuando tuviera más de 8 años.

Como criterios de exclusión se tomó en cuenta la inadecuada toma de muestras, el no cumplir con la recolección de las muestras durante cada tiempo en la cinética y el que tomen de manera concomitante Acetaminofén.

Como criterios de eliminación se tomó en cuenta el deseo voluntario de abandono, a quién se le documente falta de adherencia al tratamiento y a quién se le administre de manera inadecuada el omeprazol.

Cabe mencionar que el proyecto se apega a las recomendaciones internacionales para investigación en seres humanos, y al reglamento de investigación en seres humanos de la ley general de salud.

RESULTADOS

Las condiciones cromatográficas finales del método analítico para llevar a cabo la separación del AMF y su E.I. (Diclofenaco) en muestras plasmáticas fueron las siguientes; Columna C18 (ZORBAX® Eclipse Plus, 3.5µm, 150mm), fase móvil de ACN:KH₂PO₄ (pH=4.0); proporción 60:40 v/v, velocidad de flujo de 1.0mL/min, temperatura del horno 40°C y un detector U.V. a la longitud de onda de 215nm. Con estas condiciones cromatográficas se obtuvieron los picos bien definidos del AMF y su E.I a los 2.6min y 4.1min, respectivamente (figura 6).

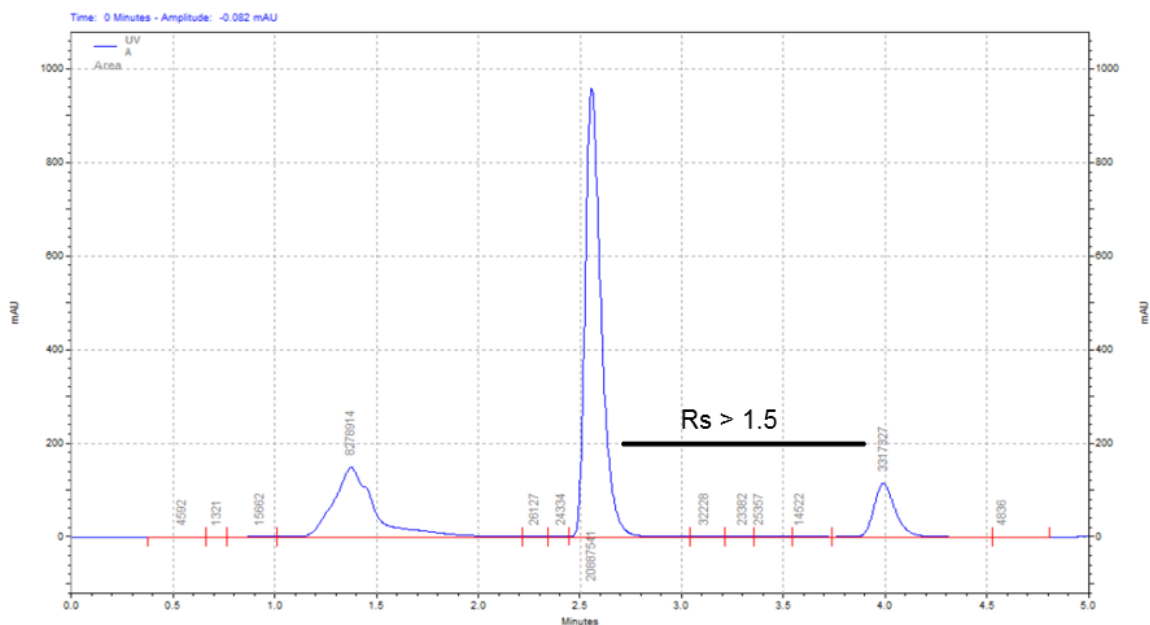


Figura 6. Cromatograma del AMF y su E.I. (Diclofenaco), con un tiempo de retención (TR) igual a 2.6min y 4.1min, respectivamente. La resolución entre los picos es mayor a 1.5.

El método analítico es selectivo de manera endógena, en la muestra blanco solo se observa el frente de solvente (metanol) y en la muestra cero un pico característico del E.I. Con los resultados obtenidos se comprueba la no interferencia de compuestos endógenos (Figura 7).

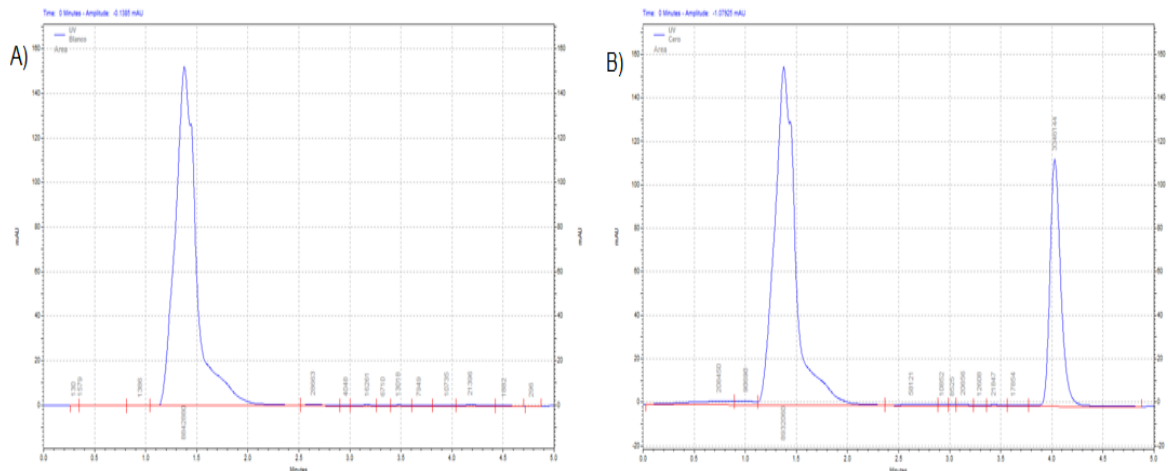


Figura 7. Selectividad endógena. A) Cromatograma representativo de la muestra blanco (Sin AMF y sin E.I.) en seis plasmas. B) Cromatograma representativo de la muestra cero (Sin AMF y con E.I.) en seis plasmas con la adición del E.I.

De los fármacos que se probaron para determinar la selectividad exógena (Ácido acetilsalicílico, Cafeína, Ciclosporina A, Ambroxol, Acetaminofén Bromhexina y Captopril), solo el acetaminofén presenta señal a los 2.6min pudiendo interferir con los resultados, ya que el AMF presenta también un tiempo de retención igual a 2.6min (Tabla 2). Por lo tanto, se establece como criterio de exclusión el hecho de que los pacientes ingieran de manera concomitante este fármaco durante la toma de muestras.

Tabla 2. Selectividad endógena. Tiempos de retención (TR) representativos de fármacos de uso común con AMF. N/A=no aparece señal en el cromatograma obtenido.

Fármaco	TR (min)
Ácido acetilsalicílico	1.7
Cafeína	1.6
Acetaminofén	2.6
Ciclosporina A	N/A
Ambroxol	2.3
Bromhexina	N/A
Captopril	1.4

La curva de calibración demuestra una adecuada correlación entre la respuesta obtenida (ABC AMF/ABC E.I.) y las concentraciones nominales (Figura 8). Al

analizar 3 curvas de calibración se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) mayor a 0.99 en cada curva y la ecuación de la recta “ $y = 0.1228x + 0.0275$ ”. Esta ecuación se utilizó para obtener las concentraciones de cada muestra problema.

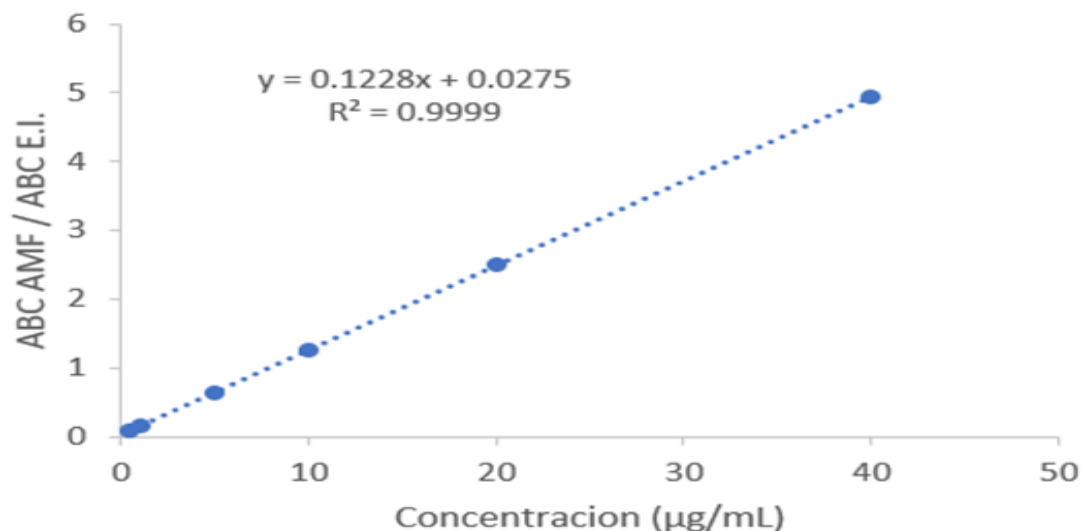


Figura 8. Curva de calibración (Promedio \pm D.E., $n=3$), evaluada para la cuantificación de AMF en plasma, se observa un coeficiente de correlación igual a 0.9999 y el modelo matemático $y = 0.1228x + 0.0275$.

La relación de áreas promedio (ABC AMF/ABC E.I.) para cada punto de concentración no excede el 15% de %C.V., demostrando que no existe variabilidad en la obtención de las áreas en los cromatogramas (Tabla 3), por lo tanto, tampoco existe variabilidad en las concentraciones experimentales obtenidas con la ecuación de la recta en cada punto de la curva.

Tabla 3. Variabilidad. Resultados de la relación promedio del ABC del AMF y el E.I. para cada concentración nominal de la curva de calibración.

Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Relación de áreas (ABC AMF / ABC E.I.)			Promedio \pm D.E.	%C.V.
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0.5	0.0831	0.0848	0.0854	0.0844 \pm 0.0012	1.4451
1	0.1577	0.1530	0.1556	0.1554 \pm 0.0024	1.5291
5	0.6220	0.6302	0.6346	0.6289 \pm 0.0064	1.0169
10	1.2724	1.2547	1.2628	1.2633 \pm 0.0089	0.7027
20	2.5106	2.4836	2.4856	2.4932 \pm 0.0151	0.6040
40	4.9638	4.9130	4.9274	4.9347 \pm 0.0262	0.5307

El límite inferior de cuantificación se obtuvo evaluando por quintuplicado la concentración nominal más baja (0.5µg/mL), al obtener las concentraciones recuperadas, éstas caen dentro del +/-20% para el %Desviación, y se encuentra muy por debajo del 20% para el %C.V (Tabla 4). Estos valores indican que existe una precisión y exactitud aceptables.

Tabla 4. Límite inferior de cuantificación. Análisis por quintuplicado de la concentración más baja del rango de trabajo.

Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)
0.5	0.4556
0.5	0.4605
0.5	0.4532
0.5	0.4671
0.5	0.4666
Promedio	0.4606
D.E.	0.0063
% C.V.	1.3652
% Recobro	92.1216
% Desviación	-7.8784

El método demostró ser repetible al cumplir con precisión y exactitud adecuadas, se obtuvo un %C.V. menor al 15% para cada concentración recuperada de los puntos control (menor al 20% para el LIC) y un %Desviación menor al 15% (menor al 20% para el LIC) (Tabla 5). Esto indica que el error del equipo y todo el instrumental es el mismo todo el tiempo y los resultados no van a variar.

Del mismo modo, se demuestra la reproducibilidad del método al cumplir con la precisión y exactitud adecuada. No se excedió el 15% de %C.V. para cada concentración recuperada de los puntos control (ni el 20% para el LIC) y se obtuvo un %Desviación menor al 15% en cada punto de concentración (menor al 20% para el LIC) (Tabla 6). El cumplimiento de los criterios indica que siempre que el analista sea el mismo, los resultados son confiables.

Tabla 5. Repetibilidad del método. Análisis por sextuplicado de la concentración Baja, Media, Alta y del LIC que se encuentran dentro del intervalo de trabajo en un mismo día y en tres corridas analíticas diferentes.

Intradía				
	Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (Promedio±D.E.) (µg/mL)	%C.V.	% Desviación
Bajo	0.8	0.79 ± 0.02	3.0042	-0.0969
Medio	7.5	7.46 ± 0.14	1.8813	-0.4828
Alto	30	30.03 ± 0.15	0.5143	-0.1314
LIC	0.5	0.46 ± 0.00	1.4178	-7.3521

Tabla 6. Reproducibilidad del método. Análisis por sextuplicado de la concentración Baja, Media, Alta y del LIC que se encuentran dentro del intervalo de trabajo. En la tabla se encuentra el promedio de seis corridas analíticas en dos días diferentes.

Interdía				
	Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (Promedio±D.E.) (µg/mL)	%C.V.	% Desviación
Bajo	0.8	0.76 ± 0.06	8.2829	-3.8659
Medio	7.5	7.43 ± 0.13	1.8550	-0.8295
Alto	30	30.08 ± 0.12	0.4244	-0.2803
LIC	0.5	0.51 ± 0.07	14.2131	2.9995

Las muestras plasmáticas obtenidas de cada paciente permanecen estables a -4°C hasta 72h posteriores a su recolección, todas las muestras se analizaron dentro de este intervalo de tiempo. El %Desviación del análisis por triplicado de los puntos control bajo y alto no excede el 15% a las 24, 48 ni 72h (Tabla 7).

Con los resultados anteriores se asegura que el método analítico de CLAR desarrollado y validado en nuestro laboratorio, es capaz de cuantificar AMF con precisión y exactitud en muestras plasmáticas de niños mexicanos.

Tabla 7. Estabilidad a corto plazo. Análisis por triplicado de los puntos control bajo y alto a las 24, 48 y 72h.

24 HORAS				
	Nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (Promedio±D.E.) (µg/mL)	%C.V.	% Desviación
Bajo	0.8	0.76±0.01	2.1480	-4.8035
Alto	30	29.99±0.15	0.5187	-0.0283
48 HORAS				
Bajo	0.8	0.72±0.05	7.3548	-9.0001
Alto	30	29.55±0.81	2.7686	-1.4872
72 HORAS				
Bajo	0.8	0.70±0.06	8.9815	-11.9826
Alto	30	29.26±0.87	2.9866	-2.4471

Posterior a la validación del método analítico, se logró reclutar un total de 49 pacientes en la consulta externa del Hospital Infantil de México, 29 niños (59.18%) y 20 niñas (40.82). Del total, 26 (53.06%) recibieron un trasplante renal de donador vivo y 23 (46.93%) de donador cadavérico. Los pacientes que tomaban omeprazol tomaron 20mg junto con la formulación de MMF. Algunos datos demográficos se resumen en la siguiente tabla (Tabla 8).

Tabla 8. Datos demográficos de los pacientes.

	Con omeprazol	Sin Omeprazol
Número de pacientes	n=26	n=23
Mujeres	n=12 (24.48%)	n=8 (16.32%)
Hombres	n=14 (28.57%)	n=15 (30.61%)
Edad (Promedio±D.E.)	14.76±3.41	15.13±3.16
Peso (kg, Promedio±D.E.)	46.18±12.58	43.45±11.45
Talla (cm, Promedio±D.E.)	149.87±14.74	149.30±17.08
Superficie corporal (m², Promedio±D.E.)	1.38±0.25	1.34±0.25
Dosis (mg, Promedio±D.E.)	475.38±98.80	490±137.14

Se determinó la concentración de AMF en cada punto de muestreo (0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12h) para los 49 pacientes. Por medio del software WinNonlin® se realizó el análisis no compartamental generando con ello los diferentes parámetros farmacocinéticos; ABC, Cmax, Tmax, C0 y C12. Los parámetros se reportaron al médico tratante (Figura 9).

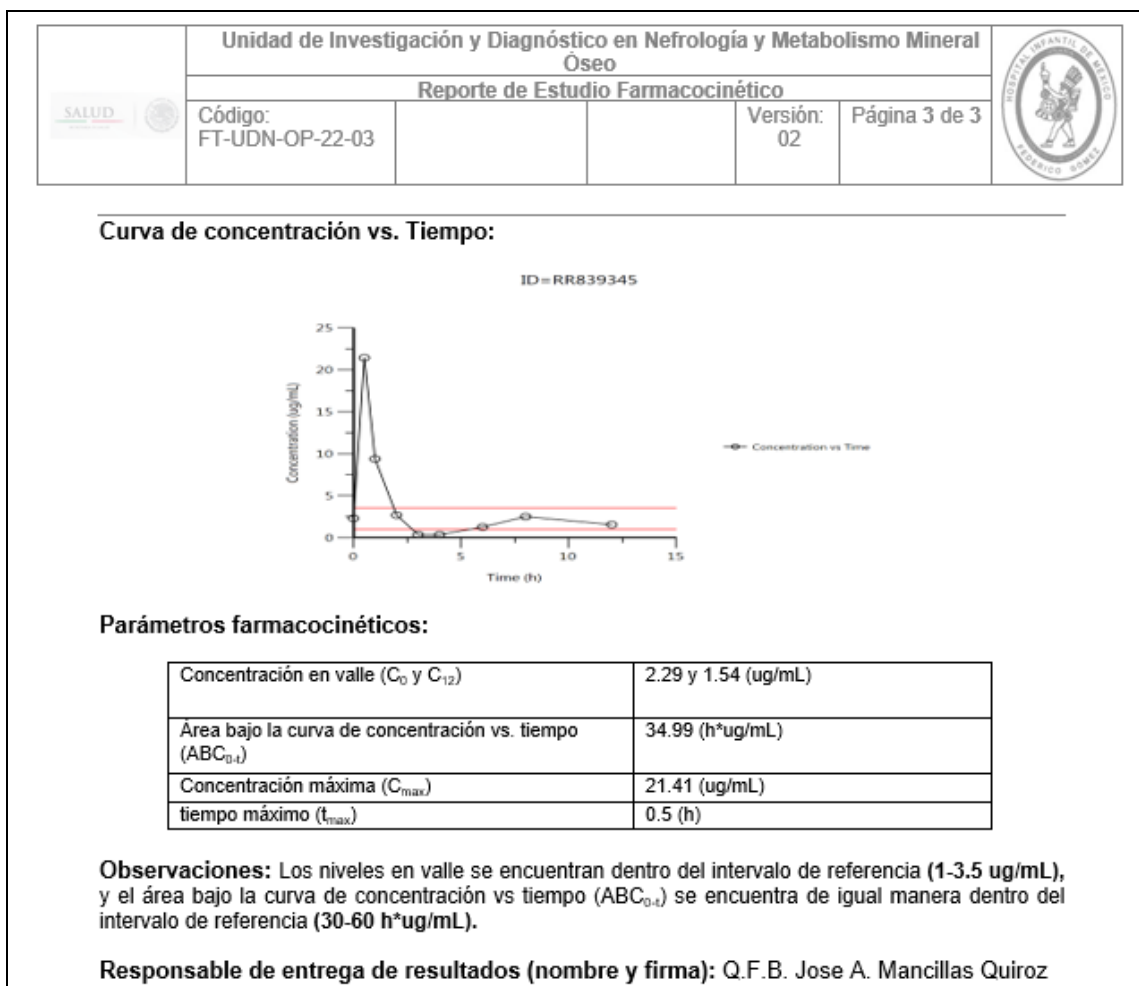


Figura 9. Reporte del estudio farmacocinético de AMF. El reporte incluye el ABC_{0-12h}, Cmax, Tmax, C0 y C12.

De los 49 pacientes, 26 (53.06%) tomaron omeprazol de manera concomitante con AMF y 23 (46.93%) no lo hicieron. Se realizaron pruebas de normalidad a los parámetros farmacocinéticos con el software GraphPad Prism® (Tabla 9). El ABC y Cmax demostraron una distribución normal (paramétricos) y el Tmax, C0 y C12 demostraron una distribución no paramétrica.

Tabla 9. El ABC y Cmax son datos normales (paramétricos ($P>0.05$)), en contraparte, Tmax, C0 y C12 son datos con una distribución no normal (No paramétricos ($P<0.05$)).

Pruebas de normalidad										
PRUEBA	ABC	Cmax	Tmax	C0	C12	ABC OM	Cmax OM	Tmax OM	C0 OM	C12 OM
Kolmogorov-Smirnov	> 0.10	> 0.10	< 0.0001	0.0009	0.0016	> 0.10	> 0.10	< 0.0001	0.0001	0.0258
D'Agostino and Pearson	0.1763	0.9654	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.1755	0.2876	< 0.0001	< 0.0001	0.1957
Shapiro-Wilk	0.2733	0.3506	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0917	0.1936	< 0.0001	< 0.0001	0.0021

Una vez definida la normalidad de los datos se llevó a cabo la prueba t de student para comparar las medias del ABC y Cmax de los dos grupos, de igual manera, se realizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las medianas de Tmax, C0 y C12 en ambos grupos. No existe diferencia significativa en ninguno de los parámetros farmacocinéticos, además el promedio de ABC, C0 y C12 se encuentran dentro de los valores que se asocian a seguridad y eficacia (Tabla 10).

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos. No existe diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) que determinen una diferencia en los parámetros farmacocinéticos entre el grupo de niños que toma omeprazol y el grupo que no lo hace.

Parámetro farmacocinético	Grupo sin omeprazol (Promedio± DE, n=23)	Grupos con omeprazol (Promedio± DE, n=26)	Valor de $p<0.05$	Prueba
ABC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	42.48±29.32	41.10±31.17	0.7562	T student
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	19.67±11.43	15.32±10.30	0.2557	T student
T _{max} (h)	1.819±2.542	1.340±2.224	0.2042	U de Mann-Whitney.
C0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.469±5.658	2.104±2.075	0.7831	U de Mann-Whitney.
C12 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.158±2.703	2.349±2.581	0.8310	U de Mann-Whitney.

En el perfil farmacocinético promedio (Figura 10) se observa que el ABC del grupo que toma AMF en concomitancia con omeprazol, es menor ($ABC_{0-12h} = 41.10 \pm 31.17 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$) al grupo que no lo hace ($ABC_{0-12h} = 42.48 \pm 29.32 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$), sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa que demuestre que el omeprazol modifica el ABC_{0-12h} del AMF en pacientes pediátricos con trasplante renal.

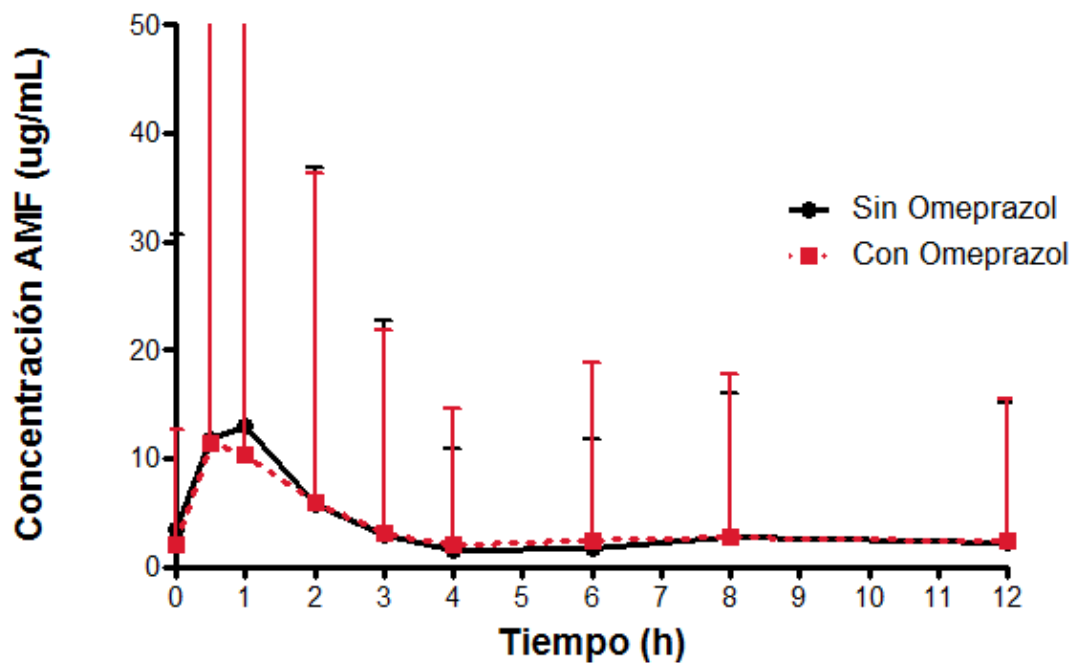


Figura 10. Perfil farmacocinético (Promedio \pm D.E.) de pacientes que toman MMF sin omeprazol (n=23) y con omeprazol (n=26), no existe diferencia estadística entre ambos grupos ($p= 0.7562$).

DISCUSIÓN

Las condiciones cromatográficas finales para llevar a cabo la separación del AMF y su E.I. (Diclofenaco) a partir de muestras plasmáticas se adecuaron a los objetivos del proyecto, cuantificar de manera precisa al AMF. En la literatura existen métodos analíticos que, si bien tienen la capacidad de cuantificar AMF en muestras plasmáticas, presentan tiempos de retención muy prolongados y picos no muy bien caracterizados ni definidos. Para lograr obtener una adecuada señal cromatográfica y un pico bien definido del AMF y su E.I. como los que se muestran en la figura 6, se modificó por medio del ensayo y error y basándose en la literatura, así como en las bases teóricas de la cromatografía; la proporción y composición de la fase móvil, el pH, el volumen y flujo de inyección. Al mover estas variables se modifica la afinidad del AMF tanto de la fase estacionaria como de la fase móvil, cambiando así el tiempo que tarda en ser separado de la muestra problema debido a cambios en la adsorción que se genera tras modificar cada condición.

Es importante generar opciones para monitorear al AMF en niños mexicanos con trasplante renal, en nuestros resultados obtuvimos un promedio en ambos grupos de ABC_{0-12h} , que se encuentran dentro del rango que se asocia a seguridad y eficacia (Reyes et al., 2010; Weber et al., 2002), sin embargo, se observaron casos individuales donde el ABC_{0-12h} obtenido fue muy bajo, el caso por ejemplo de un niño que obtuvo $4.23\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ en la cuantificación, nos habla de una inadecuada dosificación la cual pone en riesgo al injerto, ya que no se puede asegurar que existe una adecuada acción farmacológica por parte del inmunosupresor. En contraparte, el caso de un niño que obtuvo un ABC_{0-12h} igual a $108\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$, indica que seguramente el niño presenta reacciones adversas debido a una sobre exposición del inmunosupresor, lo cual significa que tampoco existe una adecuada dosificación. El método desarrollado en este proyecto para cuantificar al AMF en muestras plasmáticas demostró ser más sencillo y económico que otros reportados en la literatura (Ahadi M., 2005), así,

con el desarrollo de nuevos y mejores métodos se puede contribuir a mejorar la calidad de vida y el cuidado del paciente.

El AMF es un fármaco muy complejo, existen diversos factores que pueden modificar su comportamiento en el cuerpo humano, las variaciones van desde la expresión diferenciada de enzimas metabolizadoras, enfermedades renales o hepáticas, la dieta, o simplemente la comedificación que forman parte del coctel farmacológico que ingieren los niños mexicanos para conservar el riñón trasplantado. Aunado a ello, existe una gran cantidad de reacciones adversas generadas tras su administración oral y como se ha visto anteriormente, el uso de los antiácidos orales va en aumento ya que la principal reacción adversa es la acidez y el reflujo (Burg M., 2009). Con este estudio se demostró que la coadministración de un inhibidor de la bomba de protones (en este caso omeprazol) no modifica de manera significativa la biodisponibilidad del AMF en pacientes pediátricos mexicanos con trasplante renal, es importante entender que si bien, recientes publicaciones han reportado bajos niveles de AMF durante la coadministración de distintos inhibidores de la bomba de protones (Xu L., 2014; Kofler S., 2009), la población en la que nos enfocamos es muy peculiar, por ello, es importante entender las diferencias que existen entre una persona adulta y un infante así como de una población a otra.

El omeprazol actúa uniéndose de manera irreversible a la bomba de protones en las células parietales del estómago, por lo tanto, la secreción ácida se ve disminuida inhibiendo la absorción de algunos fármacos ácidos. En la literatura está reportado que existe una disminución del ABC de algunos fármacos cuando se ingieren de manera concomitante con el omeprazol (Andersson T., 1996). Una de las razones por la cual probablemente no existe una disminución en el ABC del AMF cuando se administra de manera concomitante con omeprazol en niños mexicanos con trasplante renal, es la forma en que se dosifica y administra. Todos los pacientes que tomaron omeprazol lo hicieron justo antes de tomar el AMF, en el HIMFG la forma de prescribirlo a los niños

con trasplante renal es 20mg cada 24h. El omeprazol es un fármaco lábil a pH ácido, se administra en forma de pellet el cual lo protege de la acidez estomacal, presenta una biodisponibilidad del 40% y se une a proteínas plasmáticas hasta en un 95%, este fármaco tiene que absorberse para poder llegar a las células parietales y formar enlaces covalentes con la bomba de protones, su efecto dura 24 horas, pero tarda de 3 a 6 horas en absorberse (Andersson T., 1996). El AMF tiene su primer y más representativo pico de absorción en las primeras dos horas tras su administración oral (Hyunyoung J., 2007), si se tomara en cuenta esto, seguramente para cuando el omeprazol comience a disminuir la secreción de protones y basificar el medio, el AMF ya estará en la circulación del organismo.

Otra ventaja es que el omeprazol es metabolizado principalmente por la CYP2C19 produciendo su metabolito hidroxilado, lo cual lo lleva a que se elimine por vía renal en un 80% y el AMF es metabolizado principalmente por la UGT1A9 produciendo su metabolito glucoronado, por ende, el omeprazol no interviene en la eliminación del AMF ni en su metabolismo y así no altera su biodisponibilidad.

CONCLUSIONES

El método para cuantificar AMF en plasma demostró ser preciso y exacto, además de ser sencillo, económico y tener un tiempo de análisis corto en comparación con los reportados en la literatura.

Este método es confiable y permite obtener concentraciones plasmáticas de AMF para calcular los parámetros farmacocinéticos de pacientes trasplantados.

El ABC_{0-12h} y las concentraciones en valle promedio de ambos grupos se encuentran dentro del intervalo de referencia que se asocia a seguridad y eficacia.

El uso de Omeprazol en niños mexicanos con trasplante renal no modifica de manera significativa la farmacocinética del AMF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahadi M, et al. Determination of mycophenolic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. (13):120-126. 2005
2. Allison AC, et al. Mechanisms of action of myco-phenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. *Transplantation*. (80):S181–S190. 2005
3. Andersson T, et al. Pharmacokinetics, metabolism and interactions of acid pump inhibitors. *Clinical Pharmacokinetics*. (1): 9-28. 1996
4. Bhardwaj S, et al. A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. (4):76-81. 2015
5. Bracho E, et al. Trasplante renal en pediatría. *Revista Mexicana de Anestesiología*. (34):S158-S161. 2011
6. Bracho E, et al. Trasplante renal en pediatría. *Revista Mexicana de Anestesiología*. (34):S158-S161. 2011
7. Bunnapradist S, et al. Incidence and Risk Factors for Diarrhea Following Kidney Transplantation and Association with Graft Loss and Mortality. *American Journal of Kidney Diseases*. (51):478-486. 2008
8. Burg M, et al. Enteric-Coated Mycophenolate Sodium Reduces Gastrointestinal Symptoms in Renal Transplant Patients. *Transplantation Proceeding*. (41):4159-4164. 2009
9. CENATRA. Trasplante. (Consultado el 07/05/2018). Disponible en: http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html. 2018
10. CENETEC. Terapia Inmunosupresora en el Trasplante renal. (Consultado el 07/05/2018). Disponible en: <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>. 2009

11. Chan L, et al. Trasplant rejection and its treatment. Atlas of diseases of the kidney. Chap 9. (Consultado 04/06/2018). Disponible en: <http://www.kidneyatlas.org/toc.htm>. 2009
12. ChemicSpider Search and share chemistry. Mycophenolic acid. (Consultado 08/06/2018). Disponible en: http://www.chemspider.com/ChemicalStructure.393865.html?rid=fe41c139-c971-4d12-b063-20d5f9ae88af&page_num=0 2015.
13. Cueto A, et al. The role of primary physicians in the early detection and treatment of chronic renal disease: challenges and opportunities. Revista de Investigación Clínica. (60):517-526. 2008
14. Curtis J, et al. Corticosteroids and kidney transplantation. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. (1):907-908. 2006
15. David E, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics in stable pediatric renal transplantation. Pediatric Nephrology. (3):266-272. 2003
16. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. (Consultado el 07/05/2018). Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013. 2013
17. Diaz G, et al. Mecanismo de acción de los fármacos inmunosupresores. Reviste Chilena de Reumatología. (24):73-88. 2008
18. Duncan M, et al. Transplant-related Immunosuppression. Proceedings of the American Thoracic Society. (63):276-285. 2005
19. Elbarbry F, et al. Liquid chromatographic determination of mycophenolic acid and its metabolites in human kidney transplant plasma: Pharmacokinetic application. Journal of Chromatography B. (2):276-281. 2007
20. Filler G, et al. The compelling case for therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil therapy. Pediatric Nephrology. (48):1497-1504. 2000
21. Ghio L, et al. Mycophenolate Mofetil Pharmacokinetic Monitoring in pediatric kidney transplant recipients. Transplant. (3):266-272. 2005

22. Gonzales R, et al. Bioavailability of a generic of the immunosuppressive agent mycophenolate mofetil in pediatric patients. *Pediatric transplantation*. (6):568-74. 2014
23. Gross A, et al. Best practice in therapeutic drug monitoring. *The Journal of Clinical Pharmacology*. (52):5-10. 2001
24. Hale M, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. *The Journal of Clinical Pharmacology*. (6):672-683. 1998
25. Halloran P, et al. Immunosuppressive Drug for Kidney Transplantation. *The New England Journal of Medicine*. (26):2715-2729. 2004
26. Heeger P, et al. Transplant Immunology for Non-Immunologist. *The New England Journal of Medicine*. (3):376-378. 2012
27. Hernández M, et al. Sistema inmune y trasplante de órganos, mecanismos de rechazo, implicaciones clínicas. *Medicine Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. (34):2249-2259. 2005
28. Hyunyoung J, et al. Therapeutic Monitoring of Mycophenolate Mofetil. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. (2):184–191. 2007
29. Kofler S, et al. Proton pump inhibitor co-medication reduces mycophenolate acid drug exposure in heart trans-plant recipients. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. (28):605–611. 2009
30. Malgor V, et al. *Farmacología General: Farmacocinética*. Wayback machine. 2009 Cap. 2.
31. Mayolo K, et al. Chromatographic techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins. *Revista mexicana de ingeniería química*. (11). 2012
32. Medeiros M, et al. Enfermedad renal en niños. Un problema de salud pública. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. (68):4. 2011
33. Medeiros M, et al. Renal transplantation in children. Artículo especial. *Revista de Investigación Clínica*. (57):2. 2005

34. Meier K, et al. Long term use of Mycophenolate mofetil is associated with a reduction in the incidence and risk of late rejection. *American Journal of Transplantation*. (3):68-73. 2003
35. Mitsui A, et al. Immunosuppressive effect of mycophenolic acid. *Journal of Antibiotics*, (23):358-363. 1969
36. Monostory et al. *Metabolic Drug Interactions with immunosuppressants*. Intech Open. 2018 Cap 20.
37. Mourad M, et al. Correlation of Mycophenolic Acid Pharmacokinetic Parameters with Side Effects in Kidney Transplant Patients treated with Mycophenolate Mofetil. *Clinical Chemistry*. (1):88-94. 2001
38. Noto T, et al. Some biological properties of mycophenolic acid. *Journal of Antibiotics*. (22):165-169. 1969
39. Organización Mundial de la Salud. La OMS propone una nueva agenda mundial. (Consultado el 07/05/2018). Disponible en: www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr12/es/. 2007
40. Orta N, et al. Registro latinoamericano de trasplante renal pediátrico. *Archivo Latinoamericano de nefrología pediátrica*. (16):22-34. 2016
41. Pascual M, et al. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England Journal of Medicine*. (346):580-590. 2002
42. Patel C, et al. High-performance liquid chromatography method for the determination of mycophenolic acid and its acyl and phenol glucuronide metabolites in human plasma. *Therapeutic Drug Monitoring*. (1):116-22. 2006
43. Real Academia Española y Asociación de Academias de la Lengua Española (2014). «trasplante». *Diccionario de la lengua española* (23ª edición). Madrid: España. ISBN 978-84-670-4189-7.
44. Reyes H, et al. Efficacy and safety of conversion of mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in Mexican renal transplant children. *Pediatric Transplantation*. (14):746-752. 2010

45. Sayegh M, et al. Transplantation 50 Years Later, progress, Challenges, and Promises. The New England Journal of Medicine. (26):2761-2766. 2004
46. Schütz E, et al. Evaluation of an immunoassay for mycophenolic acid. Therapeutic Drug Monitoring. (22):141-142. 2000
47. Staatz C, et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. Clinical Pharmacokinetics. (46):13-58. 2007
48. USAL. XVI Curso de monitorización de fármacos en la práctica clínica. Universidad de Salamanca. P:6-13. 1999
49. Waters et al. Eventos y formación HPLC-High Performance liquid Chromatography. What is HPLC? Brief History and definition. (Consultado 10/10/2018) Disponible en: http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10048919&locale=es_MX 2018.
50. Weber L, et al. The Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship for Total and Free Mycophenolic Acid in Pediatric Renal Transplant Recipients: A Report of the German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy. Journal of the American Society of Nephrology. (13):759-768. 2002
51. Wieland E, et al. Induction of cytokine release by the acyl glucuronide of mycophenolic acid: a link to side effects? Clinical biochemistry. (33):107-113. 2000
52. Xu L, et al. A Prospective Analysis of the Effects of Enteric-Coated Mycophenolate Sodium and Mycophenolate Mofetil Co-medicated With a Proton Pump Inhibitor in Kidney Transplant Recipients at a Single Institute in China. Transplantation Proceedings. (46):1362-1365. 2014
53. Yost RW, et al. Introducción a la cromatografía líquida práctica. Primera Edición. Editorial Perkin-Elmer. Barcelona, España. Abril 1981.