CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS

AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"Biodisponibilidad del micofenolato de mofetilo en niños mexicanos con trasplante renal"

TESIS

Que presenta

QFBT. Alan Ricardo Quiroz Moguel

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 Mexico ***diciembre 2017***

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. Gilberto Castañeda Hernandez y la Dra. Mara Medeiros Domingo. Los experimentos se realizaron en el laboratorio 34 del departamento de farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco y en el Hospital Infantil De México Federico Gómez.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la maestría (No. De CVU 746575)

DEDICATORIA.....

La aventura de esta tesis es dedicada primeramente a YHWH ya que desde antes de imaginar que podía estar en este lugar, el fue preparando el camino que me trajo hasta aquí contra todos los pronósticos y gracias a que siempre sostuvo mi mano, alma y espíritu manteniéndome firme, pude alcanzar esta meta.

También quiero dedicarle este esfuerzo a toda mi familia: madre (Patricia), padre (Mario), hermanos (Aelin, Ivone, Fernando), cuñado (Jorge), sobrinas y sobrino (Amairani, Constanza, Aranza, Emiliano); ya que gracias a todo el apoyo y cariño que me han brindado he podido seguir adelante, son mi motivación.

"No temas, porque yo estoy contigo; no desmayes, porque yo soy tu Dios que te esfuerzo; siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la diestra de mi justicia."

(Isaías 41:10)

AGRADECIMIENTOS….

Al Dr. Gilberto Castañeda Hernandez por su gran aportación a mi desarrollo personal y sobre todo profesional, por sus consejos, tiempo, ejemplo, motivación y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Mara Medeiros Domingo por su apoyo y entera disposición en la realización de este proyecto.

A mi comité de sinodales el Dr. Carlos M. Cerda García Rojas y al Dr. Carlos Hoyo-Vadillo por su apoyo y valiosas aportaciones a este trabajo.

A Lourdes González Flores por su apoyo más allá de lo laboral, por compartir sus experiencias y su cariño en cada momento que lo necesité, además de una mentora una gran persona la cual es merecedora de mi car*iño, al igual que su esposo Emmanuel*. Dios los bendiga.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 34: Juan Jimenez, Fabiola Camacho, Arianna Roca, Suset Tolentino, Alan Martin, Lorena Medina y Paty.

Al personal de laboratorio de nefrología y metabolismo mineral oseo del Hospital Infantil de México Federico Gómez: Herlinda, Anita y Cristi por brindarme su apoyo y su amistad valiosa.

A mis compañeros de generación Juan, Fabiola, Iroel, Luis y Eridani por todas las experiencias que compartimos, fue una de las etapas mas bonitas de mi vida y formaron parte de ella, fue muy divertido y enriquecedor conocerlos.

A mis amigos, hermanos de toda la vida: Ricardo, Sergio, Martin, Natalia, Almita, Viky, Javis, Kike, por su apoyo incondicional, su motivación, sus palabras y su amor, me siento bendecido por que forman parte de todos mis logros actuales y los que faltan.

A Chio y Koko por ser parte fundamental para que pudiera llegar aquí, sin ustedes no lo hubiera logrado son las mejores (SCW).

A Silvia Carbajal por su apoyo incondicional en oración durante todo este proceso.

A toda mi familia por apoyarme y seguir paso a paso mi crecimiento profesional y personal. LOS AMO.

Índice

Índice de figuras I
Índice de tablas II
Resumen..... *III*
Abstract..... *IV*
1.- Introducción 1
1.1 Trasplante 1
1.2 Farmacoterapia 2
1.2.1 Micofenolato de mofetilo 4
1.2.1.1 Mecanismo de acción 5
1.2.1.2 Farmacocinética 6
1.2.1.3 Parámetros farmacocinéticos en paciente pediátrico 7
1.3 Formulación farmacéutica en trasplantes 10
1.4 Pruebas de intercambiabilidad 11
1.4.1 Bioequivalencia 11
1.4.2 Perfil de disolución 12
1.5 Empleo de genéricos 13
1.6 Monitoreo terapéutico 16
1.6.1 Monitoreo de ácido micofenólico 18
1.7 Técnicas de cuantificación 19
2. Justificación 23
3. Hipótesis 24
4.Objetivo 25
4.1 Objetivos particulares 25
5. Material y Métodos 26
5.1 Optimización y revalidación del método para cuantificación de AMF por HPLC 26
5.1.1 Selectividad 27
5.1.2 Linealidad 28

5.2 Calibración para determinación de ácido micofenólico en plasma por medio del método EMIT 29
5.3 Cuantificación de ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal. 30
5.4 Comparación de los métodos HPLC y EMIT 31
5.5 Análisis de pacientes dentro de la Ventana terapéutica 32
asociada con eficacia y seguridad 32
5.6 Análisis de biodisponibilidad 33
6.Resultados 34
6.1 Optimización y revalidación del método para cuantificación de AMF por HPLC 34
6.1.1 Selectividad 34
6.1.2 Linealidad 37
6.1.3 Precisión y exactitud 38
6.2 Calibración para determinación de ácido micofenólico en plasma por medio del método EMIT 39
6.3 Cuantificación de ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal. 40
6.4 Comparación de los métodos HPLC y EMIT 42
6.5 Análisis de pacientes dentro de la ventana terapéutica asociada con eficacia y seguridad 44
6.6 Análisis de biodisponibilidad 47
7. Discusión 53
8. Conclusiones 60
9. Bibliografía. 61

Índice de figuras

Figura 1.Metabolismo del MMF 7
Figura 2. Consecuencias de una sobre y subexposición al fármaco 8
Figura 3. Ejemplo de formulaciones de MMF 10
Figura 4 .- (A) Monitoreo un solo punto (B) monitoreo farmacocinético 17
Figura 5. Sistema cromatográfico 20
Figura 6. Fundamento EMIT 21
Figura 7. Comparación de métodos (Sheiner and Beal ,1981) 31
Figura 8. Ventana terapéutica (internet) 32
Figura 9. Biodisponibilidad (internet) 33
Figura 10. Cromatograma Captopril 34
Figura 11. Cromatograma paracetamol ,cromatograma Acido Ac salicílico. 35
Figura 12.Cromatograma tacrolimus, cromatograma ácido micofenólico, E.I. . 36
Figura 13. Curva promedio para la linealidad del método 38
Figura 14. Cromatogramas Acido micofenólico y E.I 40
Figura 15. Ácido micofenólico por HPLC mostrando el promedio. 40
Figura 16. Comparación ambos métodos analíticos, en el eje de X se encuentra el HPLC y en las Y el EMIT, línea de tendencia donde HPLC=EMIT (línea negra). 42
Figura 17.Curvas de concentración vs tiempo con los dos métodos 42
Figura 18. Sobreestimación del ABC de EMIT sobre HPLC 43
Figura 19. Pacientes dentro y fuera de la ventana terapéutica para ABC marcada con líneas rojas 44
Figura 20. Pacientes dentro y fuera del rango terapéutico para Cmax marcada con líneas rojas 45
Figura 21. Pacientes dentro y fuera de la ventana terapéutica para Co marcada con líneas rojas 45
Figura 22. Farmacocinéticas de las tres marcas más utilizadas 48
Figura 23. Dispersión del ABC por formulación respecto al valor de referencia 30-60 µg*h/mL marcado con líneas rojas 49
Figura 24. ABC (A) y ABC/dosis (B) individual de las tres formulaciones más usadas 49
Figura 25. Correlación del ABC/dosis con la edad 51
Figura 26. Correlación del ABC/dosis con la talla 51
Figura 27. Correlación del ABC/dosis con el peso 51
Figura 28. Correlación del ABC/dosis con la superficie corporal 52
Figura 29. Correlación del ABC/dosis con creatinina 52

Índice de tablas

Tabla 1. Receptores en lista de espera, 1er semestre 2017 (Centro Nacional de Trasplantes 2
Tabla 2. Inmunosupresores utilizados en trasplante renal 3
Tabla 3.Posología y reacciones adversas asociadas al ácido micofenólico (comisión de farmacia y terapéutica). 5
Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos en adultos 8
Tabla 5. Condiciones cromatográficas 27
Tabla 6. Construcción de curva de calibración y puntos controles 28
Tabla 7. Linealidad 37
Tabla 8.Precisión y exactitud. 39
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos HPLC (15 pacientes de 52) 41
Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos EMIT (15 pacientes de 25) 41
Tabla 11. Sesgo, precisión y sobreestimación de HPLC vs EMIT 44
Tabla 12. Porcentaje de pacientes dentro de la ventana terapéutica, sub y sobreexpuestos ABC_{0-12} , Cmax y C_{0h} 46
Tabla 13. Promedio parámetros farmacocinéticos por marca de Ácido micofenólico 47
Tabla 14. Porcentaje de pacientes dentro de la ventana terapéutica, sub y sobreexpuestos PISA 50

Resumen

En México el trasplante renal en pacientes pediátricos es de los más practicados. La principal causa de falla del injerto es el rechazo debido a eventos inmunológicos, para disminuirlo se utilizan tratamientos con fármacos inmunosupresores como el ácido micofenólico (AMF). El AMF se administra en dos formulaciones; como micofenolato de mofetilo (MMF) en tableta y como AMF con capa entérica. Tras su administración, presenta una gran variabilidad farmacocinética intra e interindividual, dando lugar a una sobreexposición y subexposición al fármaco. En dicha variabilidad, puede estar involucrada la manera en que se dosifica el medicamento y la formulación farmacéutica ya que al ser un medicamento que se administra de forma prolongada, las instituciones de salud buscan introducir medicamentos genéricos, de menor costo, pero presuntamente con la misma biodisponibilidad, la cual está relacionada con calidad, seguridad y eficacia. Para mejorar el tratamiento y asegurar que las diferentes formulaciones cumplan con ciertos parámetros establecidos como la biodisponibilidad, se realiza el monitoreo terapéutico por medio de métodos analíticos como HPLC y EMIT. Sin embargo, estudios recientes muestran que no existe una correlación adecuada entre métodos. Debido a todo lo mencionado anteriormente, se realizó un estudio evaluando la biodisponibilidad. En el estudio se observa una sobreestimación de EMIT sobre HPLC del 30% para el ABC y una precisión del 70%, en cuanto a la biodisponibilidad se observa que independientemente de la marca hay pacientes fuera de los límites de exposición referidos (30-60 µg*h/mL) por lo cual se afirma que el HPLC sigue siendo una mejor manera de cuantificar el AMF y que además de la formulación existen variables a tomar en consideración, principalmente los criterios de dosificación.

Abstract

*In Mexico kidney transplantation in pediatric patients is one of the most practiced. The main cause of graft failure is rejection due to immunological events, to reduce it, treatments are used with immunosuppressive drugs such as mycophenolic acid (MPA), which is one of the most used. The MPA is administered by two formulations; as mycophenolate mofetil (MMF) in tablet and as an enteric coat version. After its administration, it presents a great intra- and interindividual pharmacokinetic variability, giving rise to an overexposure and sub exposure to the drug. In this variability, may be been involved the way in which the medication and the pharmaceutical formulation is dosed because in Mexico there is no pediatric presentation; and, being a drug that is administered on a long-term basis, health institutions seek to introduce generic drugs, which are lower cost, but presumably with the same bioavailability, which is related to quality, safety and efficacy. In response to this, to improve the treatment and ensure that the different formulations meet certain established parameters such as bioavailability, therapeutic monitoring is carried out by means of analytical methods such as HPLC and EMIT. However, recent studies show that there is no adequate correlation between the methods, observing an overestimation of the EMIT on HPLC. Due to all the above mentioned, a study was carried out evaluating the bioavailability the study shows an overestimation of EMIT on HPLC of 30% for the AUC and an accuracy of 70%. Regarding bioavailability, it is observed that regardless of the brand, there are patients outside the stated exposure limits (30-60 µg * h / mL), ensuring that HPLC is still a better way to quantify MPA and that in addition to the formulation there are variables to take into consideration, mainly the dosage criteria.*

1.- Introducción

1.1 Trasplante

La Ley general de salud define al trasplante como “la transferencia de un órgano, tejido o células de una parte del cuerpo a otra, o de un individuo a otro y que se integren al organismo”. Esto se refiere a la intervención quirúrgica que permite sustituir un órgano enfermo por uno sano, estando involucrando pulmón, hígado, corazón, córnea y riñón con la finalidad de salvar la vida del paciente y/o devolver la calidad de la misma (1).

El trasplante renal es el más frecuente a nivel mundial y México no es la excepción. De un total de 21,313 pacientes que requieren trasplante de cualquier tipo registrados en el Centro Nacional de Trasplantes 2017 (CENATRA), existe un total de 880 trasplantes renales realizados y 13,254 están en lista de espera. El tiempo promedio para recibir un riñón es entre 24 y 30 meses tomando en consideración: gravedad del receptor, la oportunidad del trasplante, los beneficios esperados y la compatibilidad, los cuales son criterios que reflejan lo complicado que es ser seleccionado como receptor del órgano (2). Al ser un problema nacional en el sector salud, es imperativo conservar la vida del paciente y del injerto el mayor tiempo posible, esto por medio de una farmacoterapia adecuada.

Tabla 1. Receptores en lista de espera, 1er semestre 2017 (Centro Nacional de Trasplantes

Órgano	No. pacientes
Personas que requieren trasplante	21,313
Riñón	13,254
Córnea	7,743
Hígado	362
Corazón	49
Riñón-Páncreas	6

1.2 Farmacoterapia

El éxito alcanzado en el transcurso de las últimas dos décadas en la supervivencia de receptores e injertos ha dependido grandemente del desarrollo y uso clínico de fármacos inmunosupresores de eficacia comprobada como: corticosteroides, inhibidores de calcineurina, y agentes antiproliferativos (tabla 2). A pesar de los grandes avances en el tratamiento, el mantener un equilibrio entre las reacciones adversas (RAMS) y el efecto inmunosupresor, sigue representando un reto, sin embargo, se ha demostrado que es indispensable el empleo de estos fármacos ya que una de las principales causas de falla del injerto se debe a eventos inmunológicos. Aunque en la actualidad existen diferentes estrategias terapéuticas, este desarrollo se ha dado de manera paulatina, durante los años 60´s y 70´s; con la introducción de fármacos como la

azatioprina (agente antiproliferativo) y corticosteroides, se lograron grandes beneficios disminuyendo la tasa de rechazo del injerto en un 30%, sin embargo el uso prolongado de corticosteroides aumentó la mortalidad de los pacientes a causa de una excesiva inmunosupresión, por lo cual el tratamiento era suspendido compensándose con programas de diálisis. En los años 80´s se dio uno de los más grandes saltos con la introducción de la ciclosporina (inhibidor de la calcineurina), aumentando la sobrevivencia de un 70 a un 80%. Gracias a la efectividad demostrada se extendió su uso en trasplantes de hígado, corazón, pulmón y páncreas (3,4).

Tabla 2. Inmunosupresores utilizados en trasplante renal

Glucocorticoides
✓ **Prednisona, Metilprednisolona**
Inhibidores de calcineurina
✓ **Tacrolimus, Ciclosporina A**
Agentes antiproliferativos
✓ **Azatioprina, Micofenolato de mofetilo**

En el trasplante renal el éxito en la reducción de episodios de rechazo, no solo se debe al empleo individual de los medicamentos desarrollados, sino a una estrategia de combinación entre ellos, principalmente se emplea tacrolimus el inhibidor de calcineurina por elección y micofenolato de mofetilo como agente antiproliferativo. Esta combinación es empleada en el 51% de los tratamientos (5). Considerando que poseen diferentes blancos y mecanismos de acción la respuesta inmune y efectos adversos

se ven disminuidos a diferentes niveles, demostrando que hay una mejor respuesta que la monoterapia (5,6).

Hay que resaltar el micofenolato de mofetilo ya que ha sustituido casi totalmente la azatioprina al observarse una menor incidencia en rechazo agudo y disminución de reacciones adversas gastrointestinales (3).

1.2.1 Micofenolato de mofetilo

El micofenolato de mofetilo (MMF) ha ganado mucha aceptación como el inmunosupresor antiproliferativo de primera elección cuando hay trasplante de órganos, tanto en población adulta como infantil, y lo reciben aproximadamente 80% de los pacientes con trasplante renal.

Actualmente existen dos formulaciones innovadoras: Cellcept® de Roche como micofenolato de mofetilo un pro-fármaco y Myfortic® de Novartis, como micofenolato sódico con capa entérica (EC-AMF) para disminuir las reacciones adversas (tabla 3) al evitar el contacto con la mucosa gástrica liberando el fármaco a nivel intestinal; las formulaciones tienen diferentes indicaciones posológicas, pero tras su administración el primero se hidroliza por esterasas al metabolito activo ácido micofenólico (AMF) el cual tiene la actividad farmacológica y el segundo se transforma al acido libre dependientemente del pH ácido . Cabe destacarse que el AMF se ha utilizado de forma exitosa en diversos protocolos en pacientes que sufren de nefropatía crónica (3,7,8).

Tabla 3.Posología y reacciones adversas asociadas al ácido micofenólico (comisión de farmacia y terapéutica).

	Micofenolato de mofetilo	**Ácido micofenólico con capa entérica**	**Reacciones adversas**
Adultos	1-1.5g -2xdía 2 - 3g máximo	720 mg-2x día 1,4 g máximo	Gastrointestinales (diarrea, gastritis, ulceraciones y hemorragias. leucopenia e infecciones, más comúnmente por *citomegalovirus*.
niños	600 mg/m^2 -2x día 2g máximo	450 mg/m^2 -2x día 2g máximo	

1.2.1.1 Mecanismo de acción

El ácido micofenólico (AMF) metabolito activo del MMF es un inhibidor reversible de la Inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima limitante en la síntesis de novo de nucleótidos de guanina principalmente en células linfocíticas B y T ya que son más dependientes de esta vía. Una peculiaridad que confiere mayor efecto citostático en las células linfocíticas, es que el AMF es cinco veces más potente para inhibir la isoforma IMPDH II (la cual se expresa en los linfocitos activados) que la IMPDH I (expresada en los demás tipos celulares) (9).

Hay otros mecanismos que se consideran secundarios como: apoptosis de linfocitos T activados, la cual puede eliminar clones de células que responden al estímulo antigénico y la disminución de moléculas de adhesión, ambos se ven involucrados en la eficacia del AMF (9–11).

1.2.1.2 Farmacocinética

Una vez administrado, el MMF tiene una biodisponibilidad de entre el 80-94% y alcanza su concentración máxima entre 1-2 horas, mientras que la formulación con capa entérica su biodisponibilidad es del 72% y posee un pequeño retraso en la absorción de 0.25 -1.25 horas. Frecuentemente aparece un segundo pico a las 6-12 horas, esto por la recirculación enterohepática que sufre el AMF la cual contribuye aproximadamente en un 40% del área bajo la curva (ABC) total (7).

Una vez en sangre es extensamente hidrolizado a AMF por carboxil esterasas tipo 1 y 2 localizadas en el sistema circulatorio, pared intestinal e hígado, se une a albumina sérica en un 97% y es eliminado a través de glucuronidación que ocurre en hígado, intestino y riñón por medio de la enzima Uridin difosfato glucuroniltransferasas (UGTs) y sus isoformas 1A7,1A8,1A10,1A9 y 2B7 siendo las dos últimas las principales responsables del metabolismo del AMF, aparentemente por su elevado nivel de expresión teniendo como resultado dos metabolitos principales: acil glucurónico (AcAMF) farmacológicamente activo y el inactivo 7-O-glucorónido del ácido micofenólico (GAMF) ambos metabolitos son excretados y eliminados en la bilis y en la orina por vía secreción tubular activa, gracias a la proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP-2). El GAMF en la recirculación enterohepática es desglucuronizado hacia AMF por bacterias del intestino y después es reabsorbido a la circulación sistémica. El tiempo de vida media de eliminación aproximadamente es de 17.9 horas (7,12,13)

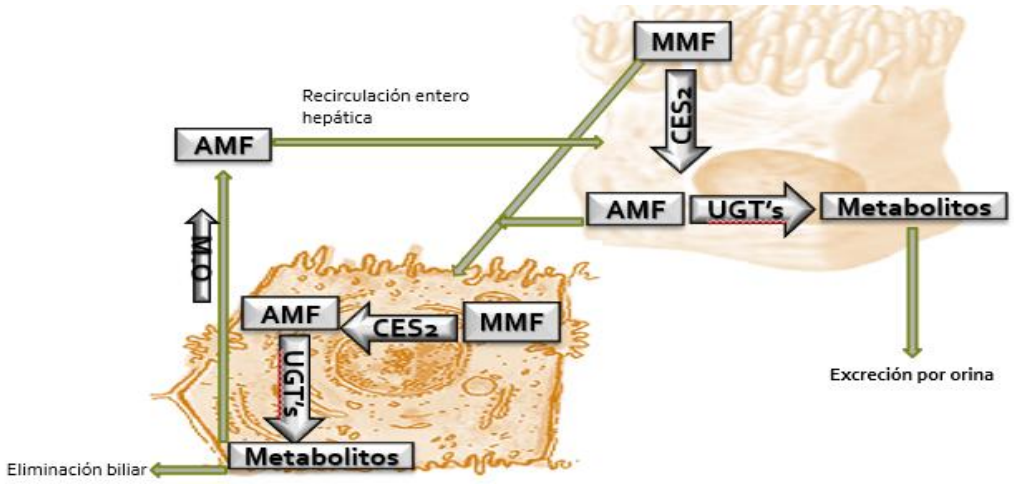


Figura 1. Metabolismo del MMF

1.2.1.3 Parámetros farmacocinéticos en paciente pediátrico

En la actualidad se han llevado a cabo numerosos estudios farmacocinéticos con el ácido micofenólico por ser de primera elección para evitar el rechazo del órgano, en dichos estudios se puede observar una gran variabilidad intra e interindividual con respecto a la exposición al fármaco, sin embargo la mayoría de éstos, se han realizado en la población adulta en los cuales existen ciertos parámetros asociados con la eficacia y seguridad que no necesariamente pueden ser extrapolados en la población pediátrica.

Los parámetros farmacocinéticos descriptivos de exposición al AMF en plasma, que están asociados con eficacia y seguridad en adultos como en niños son: concentración máxima (Cmax), concentración en valle (C_{0h}) y área bajo la curva (ABC) (tabla 4), donde si en el paciente se encuentran estos valores por encima de los referidos, se asocia regularmente a las reacciones adversas propias del AMF, pero si los valores se encuentran por debajo existe la posibilidad de presentar rechazo del órgano (14).

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos en adultos

ABC_{0-12}	30-60 mg h/L
C_{0h}	1-3.5 mg/L
Cmax	8mg /L

Figura 2. Consecuencias de una sobre y subexposición al fármaco

Las causas concretas de la variabilidad farmacocinética del AMF aún siguen en estudio, pero se ha llegado a obtener descubrimientos interesantes que pueden explicar o asumir fuertemente las causas de esta. Se ha reportado que en el paciente pediátrico no hay una relación entre la dosis administrada y la exposición al fármaco, eso se debe a que el paciente pediátrico puede estar sobreexpuesto o sub expuesto cuando se dan dosis basadas en peso o superficie de área corporal en lugar de basarse en niveles plasmáticos; aunado a la manera en la que se prescribe el MMF en México y el mundo, las diferencias biológicas de entre cada individuo y en sí mismo juegan un rol importante (15,16).

Un ejemplo son las diferencias en albúmina sérica; en pacientes pediátricos cuando hay bajos niveles de albumina se requiere administrar dosis más altas de MMF. El ácido micofenólico se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y como resultado de una disminución en la albumina sérica disminuye la unión al AMF, en consecuencia mayor AMF se encuentra libre el cual es rápidamente eliminado por el cuerpo requiriendo dosis más altas o más frecuentes (17). Por otro lado también se ha observado que en adultos el tener la creatinina elevada se ve relacionada con mayores concentraciones de AMF situación que no se observa en el paciente pediátrico (18).

Otra de las variables importantes que debe tomarse en cuenta a la hora de dosificar el MMF es la ontogenia (cambios debidos a la edad) ya que la expresión de las enzimas involucradas sufren variaciones que afectan el metabolismo del AMF. Se ha observado que en general la eficacia y la tolerancia al MMF en adultos es comparable con la población pediátrica, excepto por la alta prevalencia de reacciones adversas gastrointestinales en niños menores de 6 años. Esto puede deberse a la ontogenia de las

UGTs ya que las diferencias en su expresión pueden tener como consecuencia una disposición del AMF diferente repercutiendo en la farmacocinética (14,19).

1.3 Formulación farmacéutica en trasplantes

Un factor más que puede estar involucrado con la alta o baja exposición al fármaco, es la formulación farmacéutica, ya que en otros países y en México en estos tiempos de recesión económica las instituciones gubernamentales buscan presupuestalmente la mejor opción.

El ácido micofenólico, al ser un medicamento que se administra de forma prolongada antes y después del trasplante, representa un gasto considerable tanto al paciente como a las instituciones de salud pública, es por esto que los países en vías de desarrollo buscan comprar formulaciones genéricas que disminuyan considerablemente el impacto económico que el innovador representa, estos fármacos para ser introducidos en el mercado deben contar con estudios de intercambiabilidad, ya que al ser un medicamento de ventana terapéutica estrecha y alta variabilidad farmacocinética, cambios en la biodisponibilidad y disolución pueden tener repercusiones en el paciente.

Figura 3. Ejemplo de formulaciones de MMF

1.4 Pruebas de intercambiabilidad

Las pruebas de intercambiabilidad son la bioequivalencia y el perfil de disolución descritas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013) que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen pruebas de biocomparabilidad.

- **Bioequivalencia**: es la relación entre dos equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuando al ser administrados bajo condiciones similares producen biodisponibilidades semejantes**.**
- **Biodisponibilidad:** es la proporción de fármaco que se absorbe a la circulación general después de la administración de un medicamento y el tiempo que requiere para hacerlo (la biodisponibilidad evalúa el desempeño o rendimiento de la forma farmacéutica).
- **Perfil de disolución:** se refiere a la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de la forma farmacéutica

1.4.1 Bioequivalencia

En esta prueba se compara la biodisponibilidad de las formulaciones (innovador vs genérico) considerando el ABC y la Cmax y calculando el $IC_{90\%}$ para la diferencia de sus promedios. Para determinar la

bioequivalencia los datos deben calcularse en su expresión logarítmica con un criterio de aceptación en un intervalo de 0.8-1.25.

1.4.2 Perfil de disolución

Se basa en la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas a partir de la forma farmacéutica lo que se busca es emular las condiciones fisiológicas después de la administración a las cuales el fármaco es sometido en el tracto gastrointestinal. esta prueba no solo mide la magnitud de disolución si no también la velocidad en la cual lo hace.

Es importante conocer que los criterios para determinar el tipo de prueba de intercambiabilidad a utilizarse son descritos por la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y son los siguientes:

- **Farmacocinética:** medicamentos con farmacocinética no lineal, medicamentos con baja absorción, medicamentos que presenten un alto metabolismo de primer paso (mayor a 70%) medicamentos con vías metabólicas combinadas y medicamentos sin información sobre su farmacocinética

- **Forma farmacéutica:** todas las formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, todas las formas farmacéuticas de liberación modificada, todas las formas farmacéuticas no orales de acción sistémica.

- **Margen terapéutico estrecho:** deben ser considerados todos aquellos medicamentos en los que la relación entre su concentración terapéutica y su concentración tóxica es muy cercana, así como todos aquellos medicamentos que presenten efectos tóxicos a sus concentraciones terapéuticas.

- **Grupo terapéutico:** antibióticos, hormonales, antineoplásicos, cardiotónicos, antiepilépticos, inmunosupresores, virostáticos e hipoglucemiantes.

- **Fisicoquímica:** fármacos con baja solubilidad, polimórficos y con alta inestabilidad.

Tomando en cuenta estos criterios y después de realizarse las pruebas puede determinarse si el medicamento genérico es apto para su comercialización.

1.5 Empleo de genéricos

Un medicamento genérico intercambiable: Es aquel que ha demostrado, mediante pruebas específicas, que sustituye eficazmente al original o innovador, es decir, que tienen la garantía de que se van a comportar en el organismo de la misma manera en cuanto eficacia y seguridad. (NOM-EM-177-SSA1-1998).

En el campo del trasplante de órganos la patente de muchos medicamentos inmunosupresores que son considerados de ventana terapéutica estrecha ha vencido en los últimos años, como es el caso del micofenolato de mofetilo al igual que el tacrolimus y ciclosporina que ahora están disponibles en genéricos. En algunos países la introducción

de estas formulaciones ha alcanzado un 70% de popularidad, sin embargo, hay que considerar que los estudios realizados para poder implementar estos medicamentos tienen debilidades y México no es la excepción. En su momento se llevaron a cabo estudios por terceros autorizados para permitir la aprobación por parte de COFEPRIS de las distintas formulaciones de inmunosupresores de ventana terapéutica estrecha los cuales antes del 2013, permitían un intervalo de confianza entre formulaciones del 80-125%, intervalo que es obsoleto nacional e internacionalmente, en la actualidad COFEPRIS ha estrechado el intervalo de confianza a 90-111% por lo cual se sugiere re-evaluar las formulaciones comercializadas (20,21). Además, en un estudio clínico solamente se toma en cuenta una formulación genérica contra la innovadora, pero en la práctica el paciente sufre cambios de un genérico a otro sin considerar la marca ni las diferencias de manufactura, además estos cambios son arbitrarios por parte del farmacéutico o del seguro responsable, sin informar al médico haciendo más complicado el seguimiento del tratamiento. El cambio o empleo de genéricos debe realizarse de una manera consciente recurriendo al monitoreo terapéutico para maximizar los beneficios (22–25).

No puede recomendarse el intercambio entre inmunosupresores hasta que existan más estudios de bioequivalencia de las formulaciones en niños, ya que diferencias en la formulación o procesos de manufactura pueden originar problemas en la biodisponibilidad entre diferentes marcas del mismo fármaco, además a medida que los medicamentos son aprobados en base a la comparación solo con el medicamento innovador, es posible que el cambio entre medicamentos genéricos pueda producir potencialmente una mayor variabilidad que si se intercambia entre una sola marca de genérico y el innovador (26).

En México se han realizado con respecto a la calidad de los genéricos de MMF empleados actualmente en la clínica, estudios donde se pone a prueba la biodisponibilidad entre Cellcept® (innovador) y Tevacept (genérico) y se presenta evidencia que respalda el uso del genérico al no encontrar diferencias significativas entre ambos, esto concuerda con algunos estudios en otros países donde se ha mostrado el mismo resultado (27,28) .

Sin embargo antecedentes con el tacrolimus otro medicamento empleado en trasplante, reveló que el empleo del genérico comercializado en México no es adecuado para el tratamiento, mostrando bajas concentraciones las cuales se ven relacionadas con un pronóstico pobre para el paciente y su órgano (29), de la misma manera al evaluar las propiedades de disolución entre dos formulaciones con capa entérica (innovador vs genérico) mostraron diferencias significativas a diferente pH en la liberación del AMF de la tableta, mostrando que el genérico no debe ser empleado para el tratamiento de pacientes trasplantados ya que no cumple con los estándares de calidad (30).

Precisamente las diferencias en los perfiles de disolución han despertado una alerta en cuanto a la confiabilidad de los genéricos. Un estudio de disolución donde se compararon 14 marcas de diferentes genéricos mostraron variabilidad en un ambiente ácido, simulando el pH gástrico en un rango de 1-4.5 lo cual resulto en un importante decremento en la liberación de principio activo, lo que puede significar un retraso en el tiempo máximo (Tmax) y una Cmax reducida a causa de no estar completamente disuelta la tableta antes del vaciado gástrico, repercutiendo en el efecto farmacológico (31).

El MMF es un medicamento de especial cuidado ya que tiene ventana terapéutica estrecha, es prescrito para uso prolongado, administran dosis basadas en peso o superficie de área corporal en lugar de dosis basadas en niveles séricos y se emplean formulaciones que podrían tener cambios en su desempeño pudiendo tener consecuencias clínicas. Por estas razones para asegurar que la exposición al AMF se mantenga dentro de los niveles asociados con seguridad y eficacia se recomienda realizar el monitoreo terapéutico.

1.6 Monitoreo terapéutico

Según la Asociación Internacional de Monitoreo Terapéutico y Toxicología Clínica

El monitoreo terapéutico es una especialidad clínica multidisciplinaria destinada a mejorar la atención al paciente mediante el ajuste individual de la dosis de los medicamentos para los que han demostrado la experiencia clínica y ensayos clínicos un mejor resultado en las poblaciones generales o especiales. Siendo candidatos aquellos medicamentos con margen terapéutico estrecho, con una farmacocinética no lineal y que pertenezcan a grupos terapéuticos especiales.

El monitoreo puede realizarse de dos maneras:

- Monitoreo de un solo punto: consiste en tomar una sola muestra del paciente a un tiempo determinado post-administración para determinar la concentración del fármaco en el organismo y que se encuentre dentro de los parámetros asociados con una buena respuesta farmacológica. También se le denomina monitoreo en valle.

- Monitoreo farmacocinético: se realiza tomando varias muestras a diferentes tiempos las suficientes para poder caracterizar el perfil farmacocinético del paciente. Esto con la finalidad de obtener el ABC lo cual refleja la exposición total del paciente al fármaco. Dicha exposición se compara con valores previamente reportados relacionados con seguridad y eficacia.

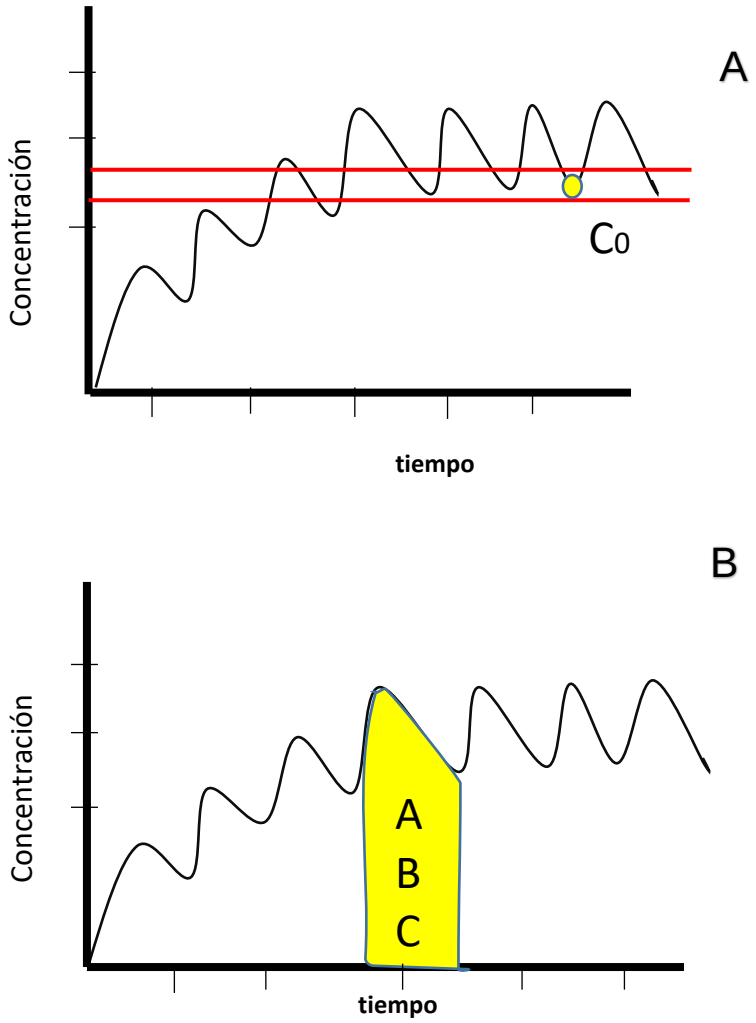


Figura 4 *.- (A) Monitoreo un solo punto (B) monitoreo farmacocinético*

1.6.1 Monitoreo de ácido micofenólico

La asociación de la toxicidad y la farmacocinética variable hace que el AMF sea considerado fármaco de ventana terapéutica estrecha y en los últimos años ha incrementado el interés en realizar el monitoreo terapéutico gracias a la relación que existe entre la exposición al fármaco y la eficacia (en términos de rechazo agudo).

En diversos estudios se ha reportado que el cuantificar el ABC es mejor predictor de efectos clínicos que la concentración en valle del AMF, el inconveniente de utilizar el monitoreo de un solo punto es que la información es limitada al ser solo la concentración de un tiempo en específico, dejando a un lado otros factores que pueden estar modificando la exposición total al AMF. En cambio, con el monitoreo farmacocinético se proporciona mayor información del paciente y del fármaco, dando una mejor descripción de los procesos que puede estar ocurriendo en el paciente. Además, se puede obtener información como la magnitud y velocidad de absorción (biodisponibilidad) indispensables para medir el rendimiento de la formulación. Toda esta información se puede reflejar en una mejora en el régimen de dosificación y así reducir riesgos (16,32).

Para considerar eficaz y seguro al ácido micofenólico, es importante mantener sus niveles de ABC entre 30-60 mg*h/L parámetro establecido relacionado con una respuesta farmacológica adecuada. Para el paciente pediátrico algunos estudios refieren estos parámetros entre 36-64 mg*h/L, esto debido a que ha mostrado una tolerancia mayor a las RAMS. Por otro lado, como un parámetro adicional en este tipo de

monitoreo la C_{0h} debe encontrarse entre 1-3.5 mg/L. Esta referencia es importante ya que se ha demostrado que para alcanzar los 30 mg*h/L de ABC, la C_{0h} debe estar al menos en 1.3 mg/L. A pesar de tener estos parámetros establecidos y hacer uso de una herramienta como es el monitoreo terapéutico, para el médico es un reto lograr alcanzar y mantener estas concentraciones gracias a la variabilidad que existe. Aunque el monitoreo terapéutico ha ganado popularidad, el realizarlo sigue siendo costoso y poco práctico tanto para el médico al tomar las muestras como para el paciente por permanecer tantas horas canulado (15,19,33,34).

1.7 Técnicas de cuantificación

Como ya se mencionó, la variabilidad intra e interindividual que existe entre los parámetros farmacocinéticos en los pacientes, hace que el monitoreo del AMF en estos días sea de gran importancia. Para ello se utilizan comúnmente dos técnicas: la cromatografía líquida de alta resolución fase reversa (HPLC siglas en inglés) como el estándar de oro y el inmunoensayo de multiplicación enzimática (EMIT siglas en inglés).

- HPLC: es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria ya sea polar (fase normal) o no polar (fase reversa) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílice o sílice recubierto de hidrocarburos c-8, c-18 etc. La fase móvil actúa como acarreador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil y los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones físicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra.

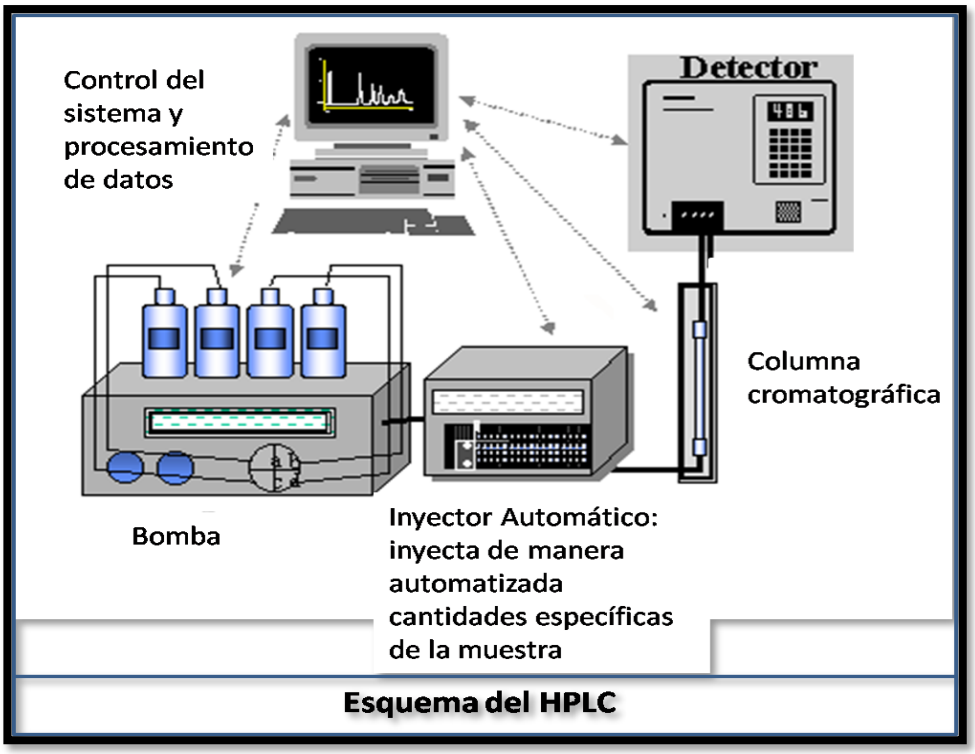


Figura 5. Sistema cromatográfico

- EMIT: consta de un anticuerpo, el fármaco libre, un complejo enzima-fármaco y el sustrato de la enzima El fármaco libre y el marcado compiten por unirse al anticuerpo, mientras más fármaco libre hay en la muestra es más probable que se una al anticuerpo dejando libre al complejo para interactuar con el sustrato y el producto de esto es directamente proporcional a la concentración del fármaco.

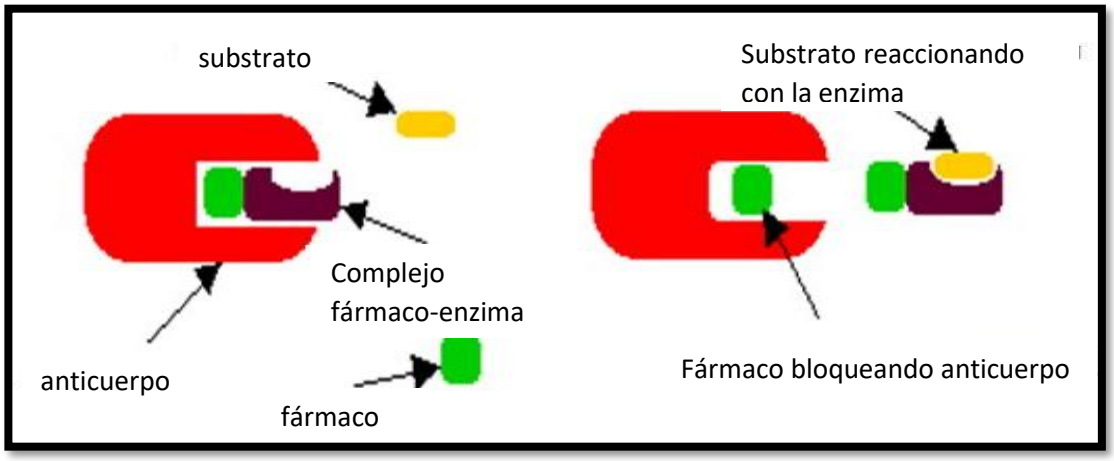


Figura 6. Fundamento del EMIT

El monitoreo terapéutico principalmente se realiza por medio del HPLC , pero en los últimos años el EMIT ha tomado fuerza entre los investigadores gracias a una reducción del tiempo invertido, ser menos laborioso y mostrar una eficacia comparable con el HPLC cuando se evalúa el riesgo de rechazo agudo en trasplante renal (35).

Desde que en diversos centros de investigación está aumentando el uso de EMIT, ha surgido la duda de que método es mejor. Diversas comparaciones realizadas respecto a los métodos han demostrado que hay una sobreestimación del EMIT con respecto al HPLC en un 24 a 35%, sobre el área bajo la curva. Muchos autores refieren que la sobreestimación observada no puede ser explicada por una falla de calibración propia de los métodos sino por la interferencia de un metabolito secundario del AMF el cual es el ácido acetilmicofenolico (Ac-AMF). Este metabolito secundario tiene una interacción cruzada con el anticuerpo que se utiliza en EMIT haciendo parecer que el paciente se

encuentra en niveles séricos normales cuando pueden ser inferiores, o mayores cuando pueden tener niveles normales (36–39).

Aunque el monitoreo con EMIT muestra resultados favorables, la sobreestimación relacionada con el método sigue siendo un factor de particular interés a considerar, ya que el ajuste de la dosis para el tratamiento depende de la exposición mostrada al cuantificar el AMF en plasma del paciente y es importante tener resultados confiables por el estrecho margen entre toxicidad y eficacia.

2. Justificación

En niños con trasplante renal se ha reportado que no hay una relación entre la dosis de MMF y su concentración en sangre, pudiendo existir una sub y sobreexposición al fármaco cuando se dan dosis basadas en peso o superficie corporal.

Otro factor que puede estar afectando la exposición, son las formulaciones genéricas empleadas y las diferencias en su biodisponibilidad.

Entre las técnicas utilizadas para cuantificar los niveles séricos de MMF ha surgido la pregunta, de cual es mejor, si HPLC o EMIT.

Por esto se propone realizar un estudio donde se evalúen las diferencias de biodisponibilidad que hay entre las formulaciones empleadas para así poder mejorar el régimen de dosificación en niños.

3. Hipótesis

La biodisponibilidad del ácido micofenólico depende de la formulación, así como del método utilizado para su cuantificación en niños con trasplante renal.

4.Objetivo

Evaluar en niños con trasplante renal si las formulaciones de MMF presentan cambios en su biodisponibilidad y el impacto que esto tiene en la práctica clínica.

4.1 Objetivos particulares

- Optimización y revalidación de un método de HPLC conforme a la NOM-177-SSA1-2013 para determinar concentraciones de ácido micofenólico en plasma.
- Calibración para la determinación por medio de EMIT de concentraciones de ácido micofenólico en plasma
- Cuantificación de ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal por medio de EMIT y HPLC.
- Realizar la comparación entre HPLC y EMIT calculando sesgo y precisión.
- Determinar si los parámetros farmacocinéticos, ABC, Cmax y C0 están dentro de los rangos asociados con eficacia y seguridad.
- Determinar si hay cambios en la biodisponibilidad debido a las formulaciones.

5. Material y Métodos

Se realizó un estudio en niños con trasplante renal del hospital infantil Federico Gómez en donde se incluyeron a quienes reciben como terapia inmunosupresora MMF, se encuentran en un rango de edad de 2-18 años, están dentro del programa de trasplante del hospital y que cuentan con el consentimiento informado firmado por el padre o tutor y asentimiento del paciente (en mayores de 6 años). Como criterios de exclusión están los pacientes a los que cuales no se puedo terminar de tomar las suficientes muestras durante el estudio y como criterio de eliminación es el deseo voluntario de abandonar el estudio y pacientes en quienes se documentó falta de adherencia.

5.1 Optimización y revalidación del método para cuantificación de AMF por HPLC

Material biológico

Plasma libre de fármaco proveniente de 6 voluntarios sanos.

Reactivos

AMF provisto por Sigma-Aldrich México

Metanol y fosfato monobásico de potasio provisto por J.T Baker.

Equipos

HPLC Hitachi EliteChrome, detector UV-L-2400, horno L-2300, bomba L-2130, Loop 20 μL.

Centrifuga refrigerada Ortoalresa biocen22 R.

Se realizó la optimización y revalidación de un método cromatográfico fase reversa para la cuantificación de AMF en plasma. El método consiste

en la utilización de un estándar interno el cual es un compuesto con propiedades fisicoquímicas muy similares al AMF.

Condiciones del método implementado en el laboratorio previamente (tabla5)

Tabla 5. Condiciones cromatográficas

Condiciones cromatográficas	
Columna	Agilent Technologies, ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm, 3.5 µm.
Fase móvil	Metanol: sol fosfatos 0.04M pH6 (54:46 v/v)
Flujo	1.6 ml/min
Detección	215 nm
Temperatura	40 ºC

La revalidación se llevó a cabo conforme a la norma NOM-177-SSA1-2013 considerando los siguientes aspectos: Exactitud - Límite de cuantificación Linealidad- Selectividad- Precisión- Repetibilidad- Reproducibilidad.

5.1.1 Selectividad

Con la finalidad de verificar que no existe interferencia en los tiempos de retención de los analitos de interés, se evaluaron por triplicado e individualmente la fase móvil, el extrayente (metanol), la matriz biológica como blanco, cuatro fármacos concomitantes y el AMF, matriz biológica de plasma con los cuatro fármacos, pool de plasma con AMF, pool de plasma con el estándar interno (E.I) y pool de plasma con AMF y E.I.

Se agitaron durante 200 segundos a 3000 r.p.m. y se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 10 minutos. Al final se transfirió el sobrenadante a viales con inserto y se inyectó al sistema cromatográfico.

5.1.2 Linealidad

Para la preparación de la curva de calibración y las muestras control, se utilizaron soluciones con una concentración de 10 y 250 µg/ml de AMF y como estándar interno diclofenaco a una concentración de 200 µg/ml, las cuales se adicionaron en un microtubo de 1 ml junto con metanol como extrayente y la matriz biológica en la cual se llevaría cabo la cuantificación del AMF. En la siguiente tabla se muestran las proporciones en las que se prepararon las muestras.

Tabla 6. Construcción de curva de calibración y puntos controles

	Solución ácido micofenólico 10µg/ml		**Solución ácido micofenólico 250µg/ml**			
	µg/ml					
	0.5	1	5	10	25	50
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Plasma µl	100	100	100	100	100	100
Estándar interno 200µg/ml	50	50	50	50	50	50
ácido micofenólico µl	50	100	20	40	100	200
Metanol µl	800	750	830	810	750	650
	Puntos control					
	0.8		7.5		35	
Plasma µl	100		100		100	
Estándar interno 200µg/ml	50		50		50	
ácido micofenólico µl	80		30		140	
Metanol µl	770		820		710	

Una vez que en el microtubo se colocaron los volúmenes correspondientes de cada solución según lo mostrado en las tablas, se agitaron durante 200 segundos a 3000 r.p.m. y se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 10 minutos. Al final se transfirió el sobrenadante a viales con inserto y se inyecto al sistema cromatográfico.

Se realizaron tres curvas con las concentraciones descritas en la tabla 6, con la adición de la muestra blanco (solo plasma) y una muestra libre de AMF, pero con E.I añadido, se obtuvo el promedio, se calculó la desviación estándar y el % de coeficiente de variación (CV%) comparándose con los descritos en la NOM-177-2013. C.V%≤ 15% para LIC ≤ 20%, r ≥0.99 y r^2 ≥0.98.

5.1.3 Precisión y exactitud

Se calculó en términos de repetibilidad y reproducibilidad de las muestras control baja, media y alta que aparecen en la tabla 6. Se cuantificaron por quintuplicado las muestras control y el límite de cuantificación calculando CV% y porcentaje de desviación %D a partir de la concentración recuperada comparándolos con los parámetros descritos en la NOM.177-2013.precisión C.V%≤ 15% para LIC ≤ 20%, exactitud %D ≤ 15% para LIC ≤ 20%.

5.2 Calibración para determinación de ácido micofenólico en plasma por medio del método EMIT

Reactivos

Kit para cuantificación de ácido micofenólico por medio de inmunoensayo

Equipo

Siemens EMIT

Metodología

Se llevó a cabo por medio del personal del hospital infantil Federico Gómez.

Solo se realizó en 25 pacientes ya que el costo del kit de cuantificación es muy elevado y solo se contaba para ese número de pacientes.

5.3 Cuantificación de ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal.

Se realizó la captación de pacientes con trasplante renal que se encontraban tomando MMF, del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se les invitó a participar en el estudio citándolos de manera programada al sitio de toma de muestras, por la mañana con anticipación a la hora en que tienen la primera toma en ayunas y habiendo tomado la dosis en la noche anterior de manera exacta. Se le solicitó proporcionen datos sobre la formulación que están tomando (dosis, hora de administración y fecha de inicio) y contesten un formulario para evaluación de los posibles RAMS relacionados con el medicamento.

Para la toma de muestras se coloca un yelco en una vena del brazo o mano, se toma una muestra para el tiempo 0 de 3.5ml en microtainer con anticoagulante, después debe tomar el medicamento y las siguientes muestras se toman a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 horas, las muestras se almacenan hasta su análisis a -20°C, y se lleva a cabo la determinación de AMF por HPLC y EMIT (por EMIT solo se cuantificaron en 25 pacientes). El análisis de los parámetros farmacocinéticos ABC, Cmax, Tmax y Co, se llevaron a cabo en el programa WinNonlin versión 6.0.

Cuantificación de AMF en HPLC

Para la cuantificación en HPLC se colocaron en el microtubo 100 μL de la muestra, 50 μL del E.I y 800 μL de metanol. Se agitaron durante 200 segundos a 3000 r.p.m. y se centrifugaron a 12000 r.p.m durante 10 minutos. La respuesta obtenida por medio del HPLC se divide entre el estándar interno y se interpola en la curva de calibración para determinar la concentración.

5.4 Comparación de los métodos HPLC y EMIT

Una vez obtenidos los parámetros farmacocinéticos por ambas técnicas de cuantificación analítica, se hizo la comparación con el modelo sugerido por Sheiner y Beal (40) calculando el sesgo y la precisión con las ecuaciones siguientes:

Sesgo: MPE= (1/n)∑(PRED-OBS)

Precisión: MSPE=(1/n)∑[(PRED-OBS)^2]

Donde: PRED (Predicho) = concentración obtenida por EMIT

OBS (Observado)=concentración obtenida por HPLC

Para este análisis la N es de 25 pacientes con los cuales se hicieron los cálculos de sesgo y precisión. para poder visualizar lo obtenido se construyó una gráfica donde en el eje de la x se graficaron las concentraciones determinadas por HPLC y en el eje de las Y las concentraciones obtenidas por EMIT construyendo una línea de tendencia con el presunto de X=Y. Como se muestra en la siguiente imagen:

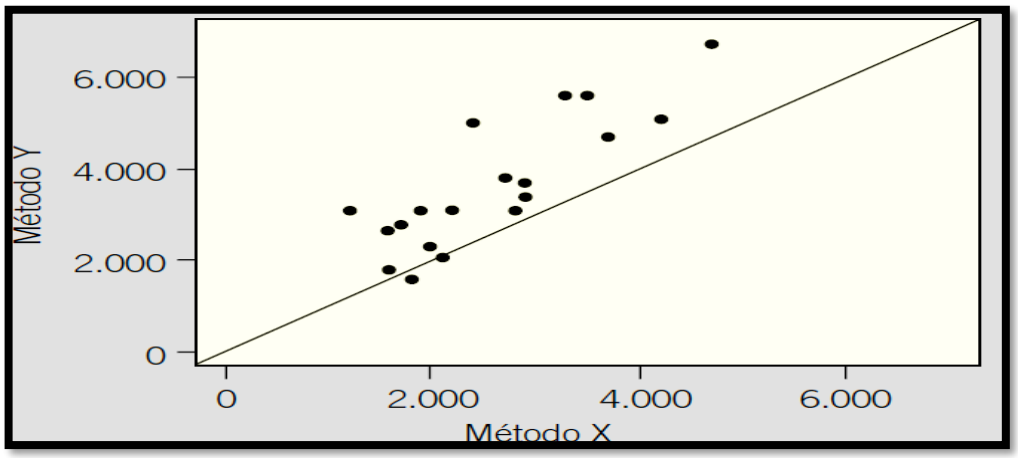


Figura 7. Comparación de métodos (Sheiner and Beal ,1981)

5.5 Análisis de pacientes dentro de la Ventana terapéutica asociada con eficacia y seguridad

A partir de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por HPLC:

- Área bajo la curva
- Concentración máxima
- Concentración en valle

Se determinó en 52 pacientes de manera gráfica por cada uno y cada parámetro, si los valores determinados por medio del HPLC se encontraban dentro de la ventana terapéutica referida en la literatura, se calculó el porcentaje de pacientes sobreexpuestos, subexpuestos y de los que están dentro de la ventana.

ventana terapéutica:

- $ABC_{0\text{-}12}$: 30-60 µg*h/mL
- Cmax: 8 µg/mL
- C_{0h}: 1-3.5 µg/mL

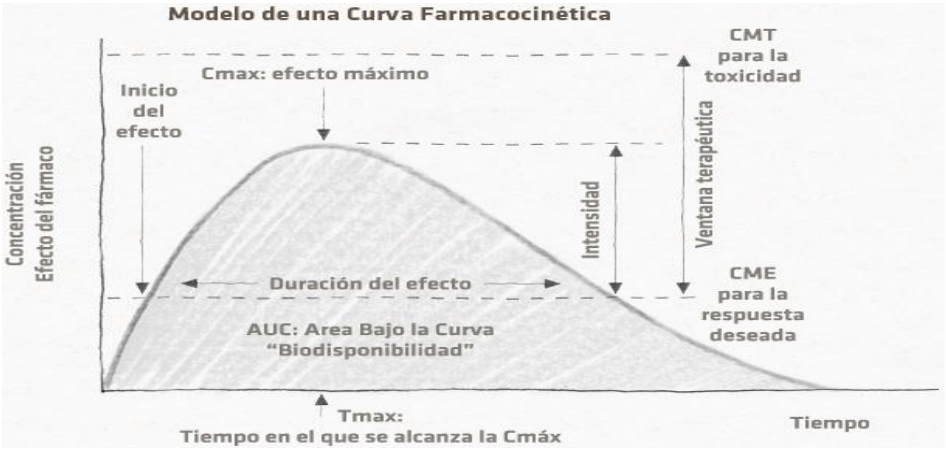


Figura 8. Ventana terapéutica (internet)

5.6 Análisis de biodisponibilidad

La biodisponibilidad se midió por medio del ABC cuantificada por HPLC, en 9 formulaciones diferentes: Pisa, Myfortic, Cellcept, Lanfetil, Teva, Vitae, Buffinton, GMF, Tackcell de las cuales se obtuvo el promedio de ABC, Cmax y Tmax.

Se realizó una gráfica para observar la dispersión de cada formulación en la biodisponibilidad alcanzada por cada uno de los 52 pacientes, con respecto a los valores de referencia (ABC_{0-12}: 30-60 µg*h/mL) calculando la proporción de pacientes sobreexpuestos, subexpuestos y dentro de la ventana.

Se consideraron los factores de variabilidad como edad, peso, talla, Sc, Cr y dosis, para determinar si los cambios en los parámetros farmacocinéticos pueden atribuirse directamente a la formulación o al conjunto de variables fisiológicas y la manera en que se está dosificando. Se realizó la correlación que tiene el Área bajo la curva normalizada con la dosis y los parámetros descriptores que utilizan para dosificar al micofenolato de mofetilo calculando el coeficiente de correlación y el coeficiente de determinación.

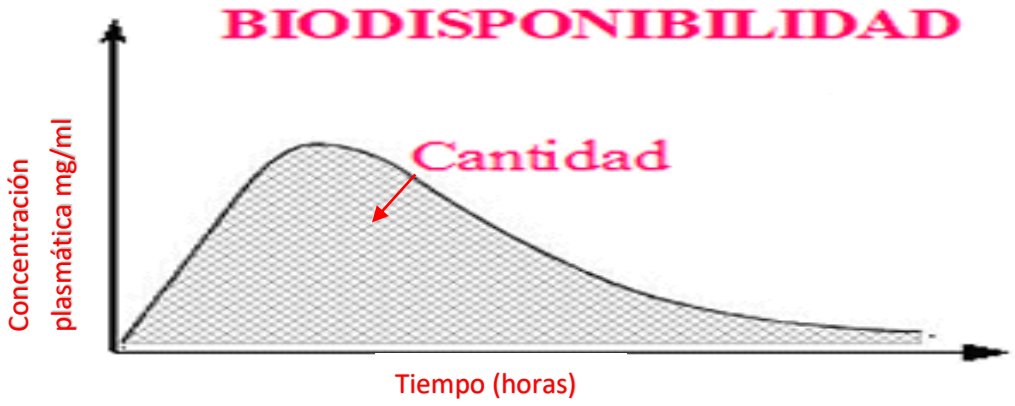


Figura 9. Biodisponibilidad (internet)

6.Resultados

6.1 Optimización y revalidación del método para cuantificación de AMF por HPLC

6.1.1 Selectividad

Para la selectividad se evaluaron por triplicado e individualmente la fase móvil, el extrayente (metanol), un pool de los 6 plasmas como blanco y fármacos que pueden ser administrados concomitantemente en la terapia inmunosupresora, la finalidad de ello es observar que no causen alguna interferencia al momento de cuantificar el ácido micofenólico en las muestras de los pacientes.

Los fármacos empleados y su tiempo de retención fueron los siguientes: captopril (tr 1.17 min), paracetamol (no tiene lectura), ácido acetil salicílico (tr 0.2min), tacrolimus (1 min), AMF (tr 2.3), diclofenaco E.I (tr 5.6 min). El extrayente, la F.M y el blanco no presentaron señal.

A continuación, se muestran los cromatogramas de los fármacos:

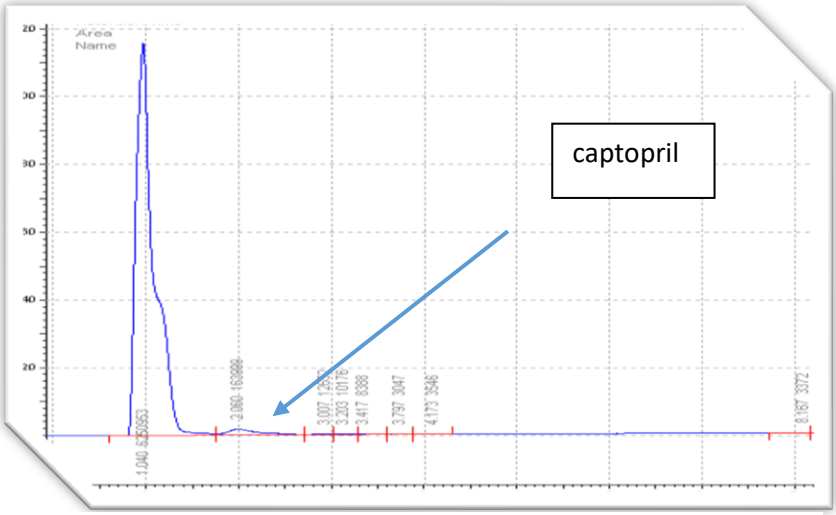
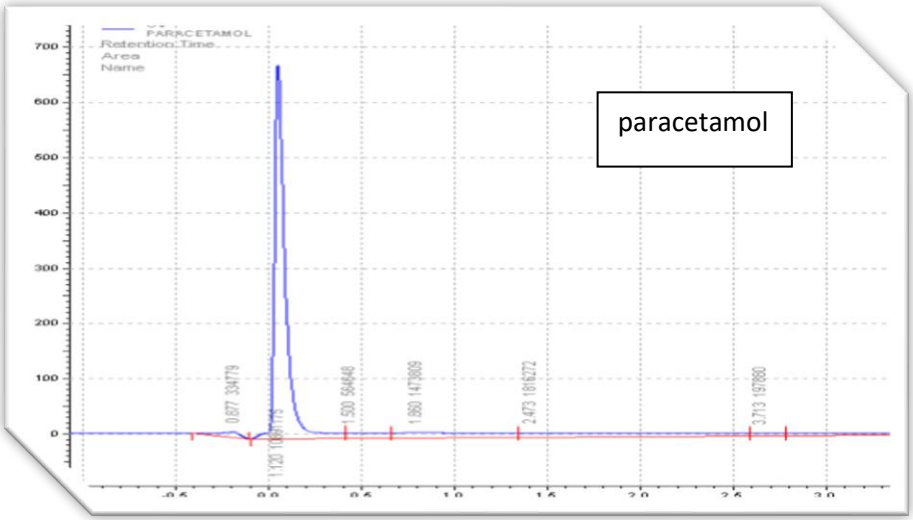


Figura 10. Cromatograma de captopril



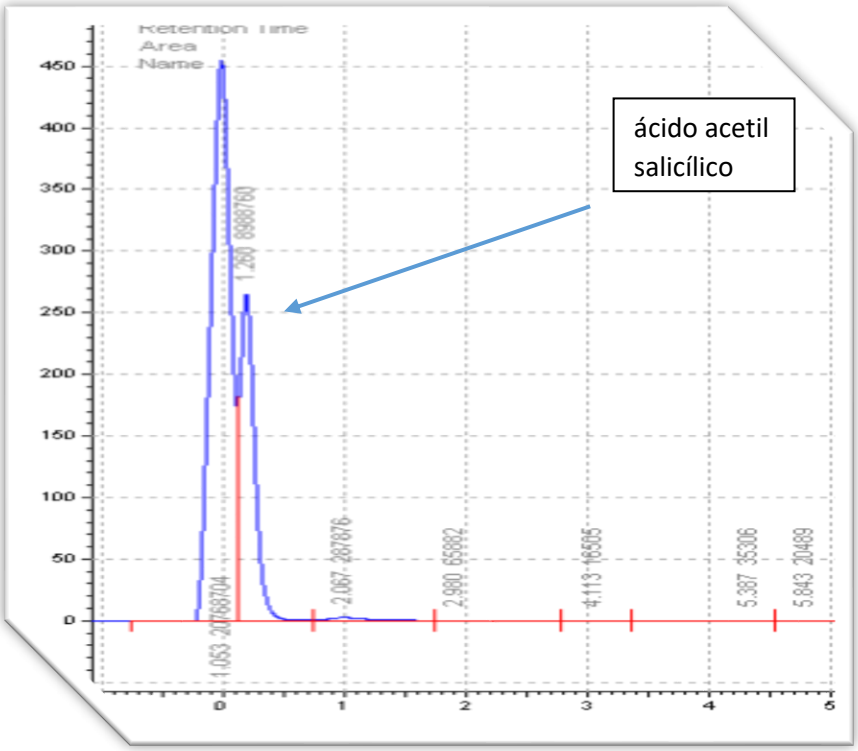


Figura 11. Cromatograma paracetamol, cromatograma ácido acetil salicílico.

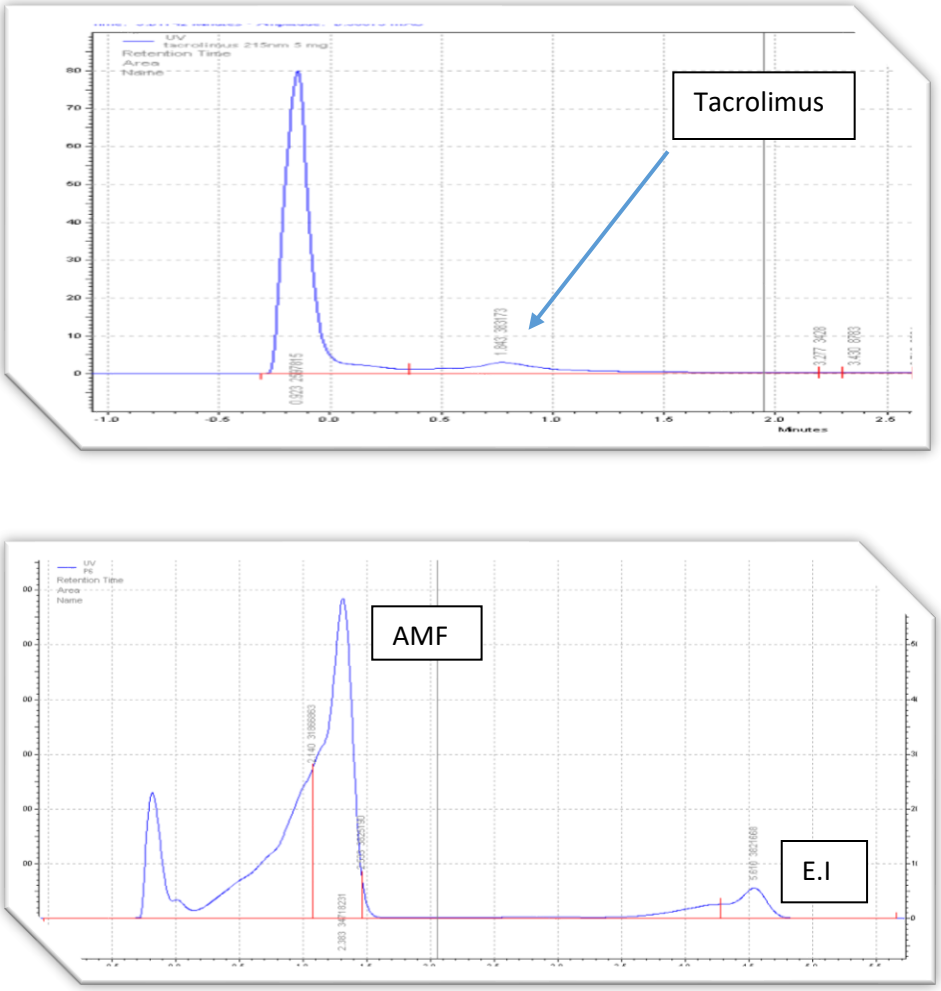


Figura 12. Cromatograma tacrolimus, cromatograma ácido micofenólico, E.I.

Ninguno de los fármacos analizados tiene interferencia en los tiempos de retención del AMF ni del estándar interno, demostrando que el método es selectivo para cuantificar AMF.

6.1.2 Linealidad

Para la linealidad se evaluó la respuesta producida en el cromatógrafo del ABC del AMF en el intervalo de concentraciones mostradas en la tabla 6, dividiéndose entre el ABC del E.I a una concentración constante. Se realizaron tres curvas las cuales, incluían la muestra blanco que consiste en solo plasma y la muestra cero la cual solo contiene el E.I.

A partir de las tres curvas se obtuvo el promedio, se calculó la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación (C. V%) de la concentración recuperada, como parámetro de aprobación descrito en la NOM-177-2013 el cual demostró estar dentro del rango normativo como se muestra en la tabla siguiente:

Tabla 7. Linealidad

	concentración nominal (µg/ml)	concentración recuperada (µg/ml)			promedio	Desviación estándar	Coef. De variación%
		curva A	**curva B**	**curva C**			
blanco	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0.5	0.45	0.49	0.49	0.48	0.02	4.27
2	1	0.87	0.89	0.86	0.87	0.01	1.61
3	5	4.94	4.98	4.89	4.94	0.04	0.85
4	10	10.08	10.11	10.09	10.09	0.01	0.13
5	25	25.27	25.07	25.30	25.21	0.12	0.49
6	50	49.85	49.94	49.84	49.87	0.05	0.11
	r	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999		
	b	0.0392	0.0260	0.0308	0.0320		
	m	0.1724	0.1765	0.1761	0.1750		

NOM-177-2013 C.V%≤ 15% para LIC≤20%

Para poder considerar el metodo como lienal, debe tener un coeficiente de correlacion r =≥ 0.99 y un coeficiente de determinación r^2 ≥0.98. Como se muestra en la siguiente gráfica ambos parametros cumplen con lo estipulado por la norma r=0.999 y r^2=0.999.

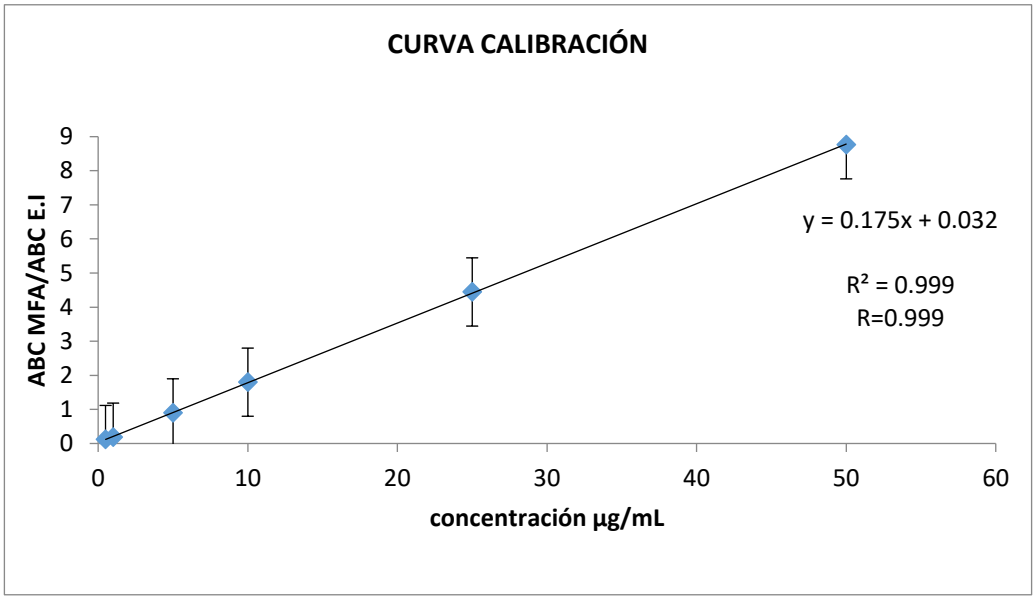


Figura 13. Curva promedio para la linealidad del método

6.1.3 Precisión y exactitud

La precisión se calculó en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Para la repetibilidad se analizaron en un mismo día por quintuplicado las muestras control baja, media, alta y el límite de cuantificación (MCB, MCM, MCA, LIC) y se calculó por medio de la ecuación de la recta su concentración, interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración y con la concentración obtenida se calculó el %CV el cual está dentro de los rangos que establece la norma como se muestra en la tabla 8. C.V%≤ 15% para LIC ≤ 20% NOM-177-2013.

En la reproducibilidad se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes a lo largo de tres días las muestras control (MCB, MCM, MCA, LIC). Se calculó por medio de la ecuación de la recta su concentración interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración y con la concentración obtenida se calculó el %CV el cual está dentro de los rangos que establece la norma como se muestra en la tabla 8. C.V%≤ 15% para LIC ≤ 20% NOM-177-2013.

La exactitud se midió a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad calculando el %D de la concentración obtenida respecto al valor nominal. El %D está dentro de los rangos establecidos por la norma como se muestra en la tabla 8. %D ≤ 15% para LIC ≤ 20% NOM-177-2013.

Tabla 8*.Precisión y exactitud.*

Concentración nominal±(µg/ml)	Intradía			interdia		
	Concentración recuperada ± D.E (µg/ml)	**CV (%)**	**%D**	**Concentración recuperada ± D.E (µg/ml)**	**CV (%)**	**%D**
Límite de cuantificación 0.5	0.57 ±0.02	5.0	14.02	0.49 ±0.08	17.2	0.28
MCB 0.8	0.81 ±0.04	5.0	1.94	0.77±0.06	7.8	3.17
MCM 7.5	7.52 ± 0.07	0.9	0.36	7.51±0.03	0.4	0.19
MCA 35	34.89 ±0.53	1.5	0.29	34.73 ±0.36	1.0	0.77

6.2 Calibración para determinación de ácido micofenólico en plasma por medio del método EMIT

Se llevó a cabo por medio del personal del Hospital Infantil, cumpliendo con las especificaciones de Linealidad, Selectividad, Precisión, Repetibilidad, Reproducibilidad y Estabilidad para métodos inmunológicos según la NOM-177-2013.

6.3 Cuantificación de ácido micofenólico en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal.

Una vez que se contó con los métodos analíticos validados para la cuantificación de ácido micofenólico, las 9 muestras de plasma que fueron tomadas por paciente fueron analizadas por ambas técnicas determinando la concentración de cada una para poder construir el perfil farmacocinético por paciente y por técnica de cuantificación. A partir de los perfiles obtenidos se calcularon los parámetros farmacocinéticos ABC, Cmax y Co. Esto se llevó a cabo en el programa WinNonlin versión 6.0. 52 pacientes HPLC, 25 pacientes EMIT.

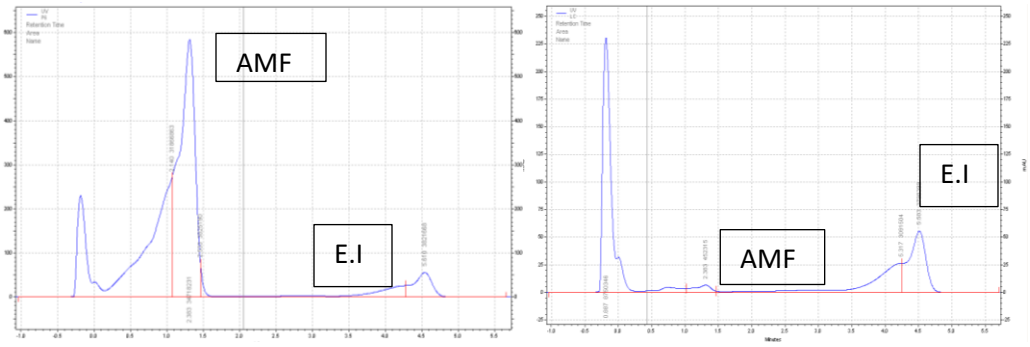


Figura 14. Cromatogramas de ácido micofenólico y E.I

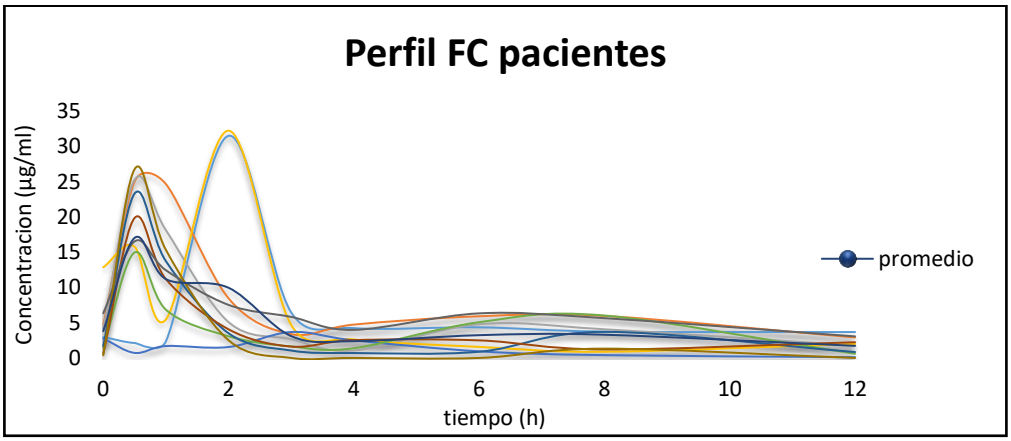


Figura 15. Ácido micofenólico por HPLC mostrando el promedio.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos HPLC (15 pacientes de 52)

ABC_{0-12} (mg*h/mL)	Cmax (mg)	Tmax (h)	C_{0h} (mg/mL)
75.23	31.4	2	0
87.59	25	0.5	4.6
61.84	25.2	0.5	4.19
66.28	32.22	2	12.86
15.28	3.68	3	2.76
48.96	14.95	0.5	1.48
42.56	23.3	0.5	1.7
42.71	19.84	0.5	0.63
74.99	16.52	0.5	6.33
31.52	26.76	0.5	0.38
49.15	23.8	1	2.19
30.72	28.34	0.5	0
46.41	5.78	1	3.11

Tabla 10. Parámetros farmacocinéticos EMIT (15 pacientes de 25)

ABC_{0-12} (mg*h/mL)	Cmax (mg)	Tmax (h)	C_{0h} (mg/mL)
16.506	3.88	1	0.62
109.25	36.87	0.5	6.85
122.42	34.5	2	3.22
40.422	10.96	1	1.99
99.301	20.48	0.5	38.4
67.696	27.72	8	3.02
54.313	27.72	0	2.06
86.67	22.35	0.5	5.8
62.83	14.87	0	14.87
101.90	22.23	0.5	4.78
86.06	22.23	2	4.78
85.371	36.04	0.5	2.77
62.42	18.3	3	2.9
86.75	13.22	8	3.39
89.32	27.36	0.53	3.58

6.4 Comparación de los métodos HPLC y EMIT

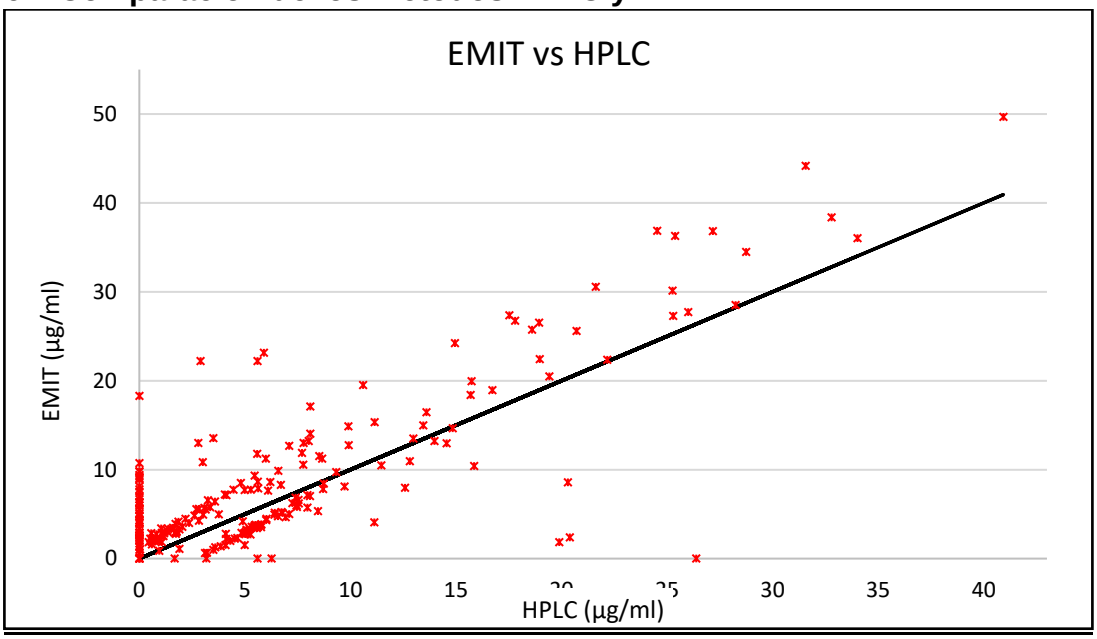


Figura 16. Comparación ambos métodos analíticos, en el eje de X se encuentra el HPLC y en las Y el EMIT, línea de tendencia donde HPLC=EMIT (línea negra).

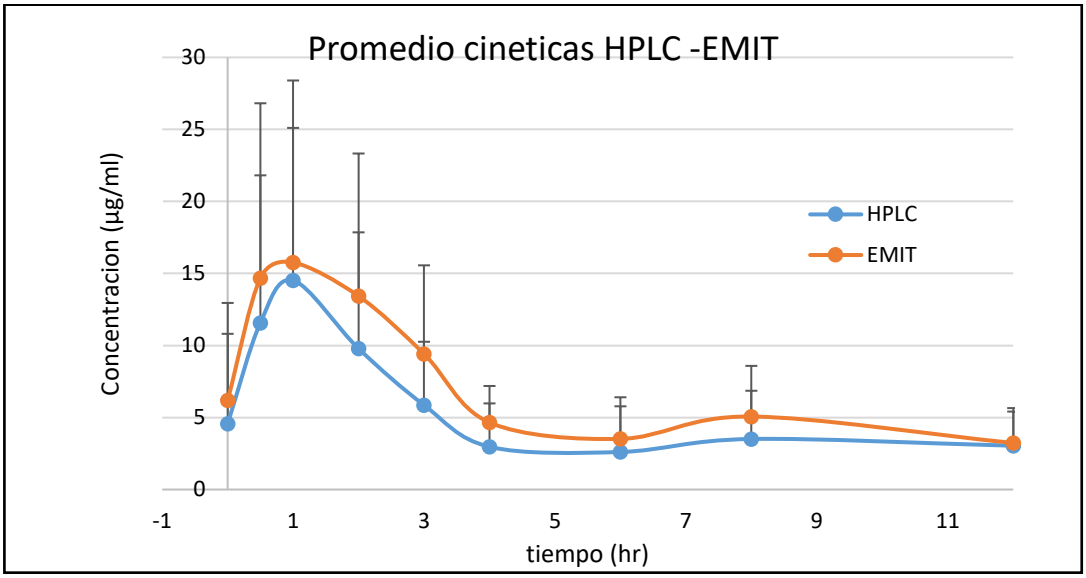


Figura 17.Curvas de concentración vs tiempo con los dos métodos

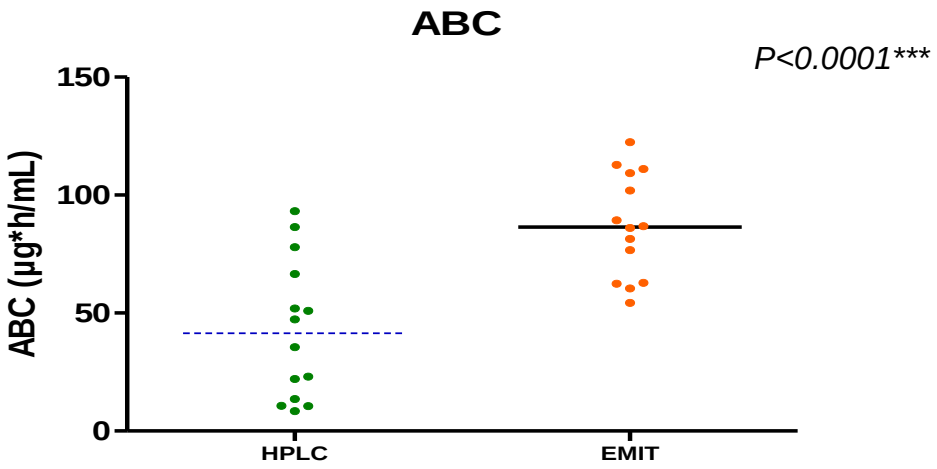


Figura 18. Sobreestimación del ABC de EMIT sobre HPLC. T student (P<0.0001***)

La comparación se llevó a cabo en 25 pacientes con trasplante renal del Hospital Infantil de México Federico Gómez a los cuales se les determinaron las concentraciones de AMF en plasma, con un total de 225 puntos de concentración por cada método.

Se puede observar un sesgo positivo y una correlación relativamente baja del EMIT con respecto al HPLC (tabla 11 figura 16). El cálculo del sesgo y la precisión se llevó cabo con las ecuaciones descritas en la metodología.

Por otro lado, en las figuras 17 y 18 se puede observar en los 25 pacientes una sobreestimación en el promedio y en el ABC de EMIT con respecto al HPLC.

Tabla 11. Sesgo, precisión y sobreestimación de HPLC vs EMIT

• Precisión	• 70%
• Sesgo	• 1.94
• Sobreestimación	• 30%

Sesgo: MPE=(1/n)∑(PRED-OBS).

Precisión: MSPE=(1/n)∑[(PRED-OBS)^2]

6.5 Análisis de pacientes dentro de la ventana terapéutica asociada con eficacia y seguridad

Se analizaron los parámetros de ABC, Cmax y Co en 52 pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez y si son comparables con los referidos en la literatura.

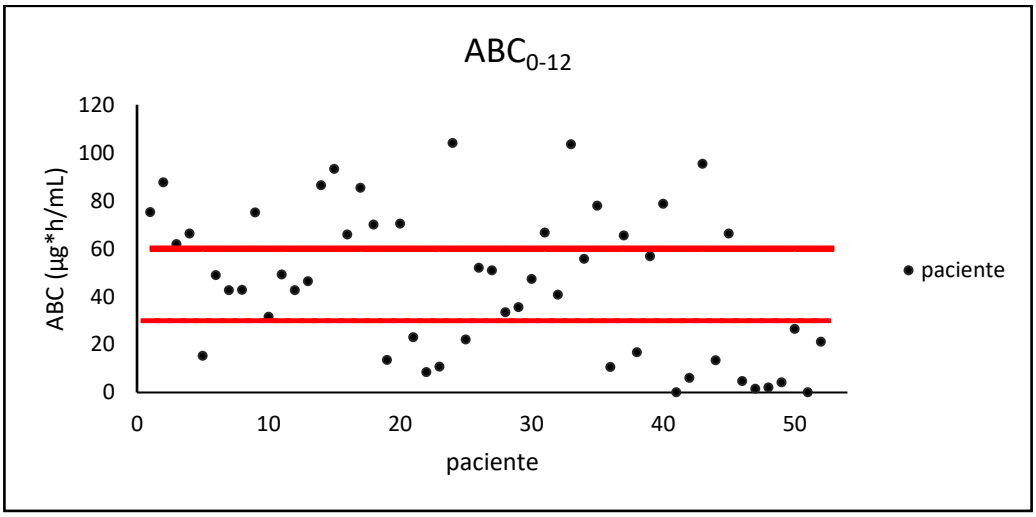


Figura 19. Pacientes dentro y fuera de la ventana terapéutica para ABC marcada con líneas rojas

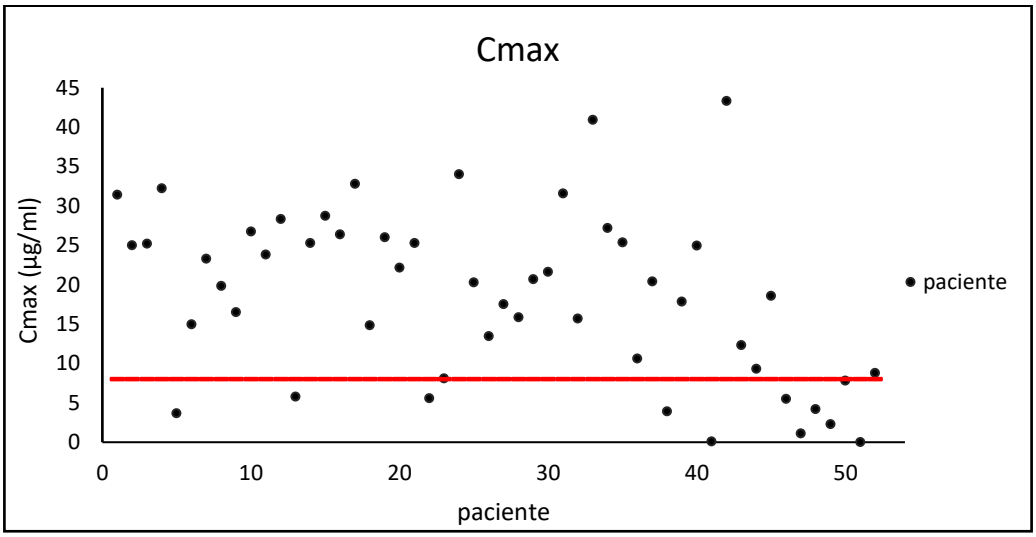


Figura 20. Pacientes dentro y fuera del rango terapéutico para Cmax marcada con líneas rojas

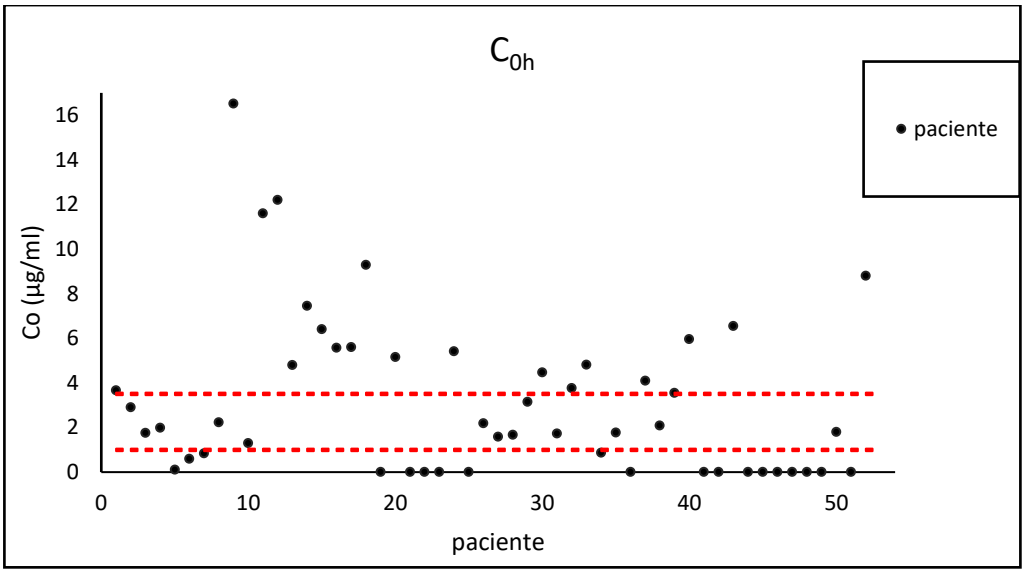


Figura 21. Pacientes dentro y fuera de la ventana terapéutica para Co marcada con líneas rojas

En las figuras 19, 20 y 21 en el eje de las X se muestran los 52 pacientes y en el eje Y los parámetros ABC_{0-12}, Cmax, C_{0h}. Las líneas rojas marcan los intervalos de concentración determinados para cada parámetro

farmacocinético, en los cuales idealmente el AMF debería encontrarse en plasma para un tratamiento seguro y eficaz.

Para cada parámetro farmacocinético se calculó el porcentaje de pacientes que se encontraban sobreexpuestos, subexpuestos y dentro del intervalo de exposición relacionado con seguridad y eficacia, lo cual se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 12. Porcentaje de pacientes dentro de la ventana terapéutica, sub y sobreexpuestos ABC_{0-12}, Cmax y C_{0h}

	N=52	**ABC_{0-12}**	*N=52*	**Cmax**	*N=52*	**C_{0h}**
pacientes sobreexpuestos	19	36.5 %	40	76.9 %	19	36.5 %
pacientes subexpuestos	18	34.6 %	10	19.2 %	17	32.7 %
pacientes dentro de la ventana terapéutica	15	28.8 %	2	3.8 %	16	30.8 %

6.6 Análisis de biodisponibilidad

Tabla 13. Promedio parámetros farmacocinéticos por marca de ácido micofenólico

MARCA	**No# pacientes**	**Promedio ABC_{0-12} (µg*h/mL) ± D. E**	**Promedio Cmax(µg/mL) ± D. E**	**Promedio Tmax (hr) ± D. E**
Celprot /PISA	24	45.99 ± 29.55	18.70 ± 9.5	1.54±0.86
Myfortic/Novartis	9	63.92 ± 23.35	25.08± 9.07	1.8 ± 0.83
Cellcept/ Roche	7	30.64 ± 32.24	16.35±13.81	0.91±0.85
Lanfetil/Landsteiner	4	37.92 ± 17.82	16.14 ± 6.95	1 ± 0
Tevacept/ Teva	3	42.44 ± 37.41	14.60±10.97	1.33±0.86
Kofetil/Vitae	2	53.66	26.54	0.75
Buffingtons	1	50.92	17.53	0.53
GMF	1	35.52	20.71	1
Takcell	1	4.23	2.27	1.03

En la tabla se muestran las marcas de ácido micofenólico empleadas para el tratamiento inmunosupresor en el Hospital Infantil de México Federico Gómez y el promedio de los parámetros farmacocinéticos ABC, Cmax y Tmax los cuales son descriptivos de la biodisponibilidad.

En promedio, el ABC_{0-12} y Tmax se encuentran dentro de los rangos referidos en la literatura con seguridad y eficacia (ABC 30-60 µg*h/mL y Tmax 1-2 h) sugiriendo que la eficiencia de las formulaciones empleadas es la adecuada, sin embargo, la desviación estándar es muy grande para el ABC, significando que hay una alta variabilidad en la biodisponibilidad.

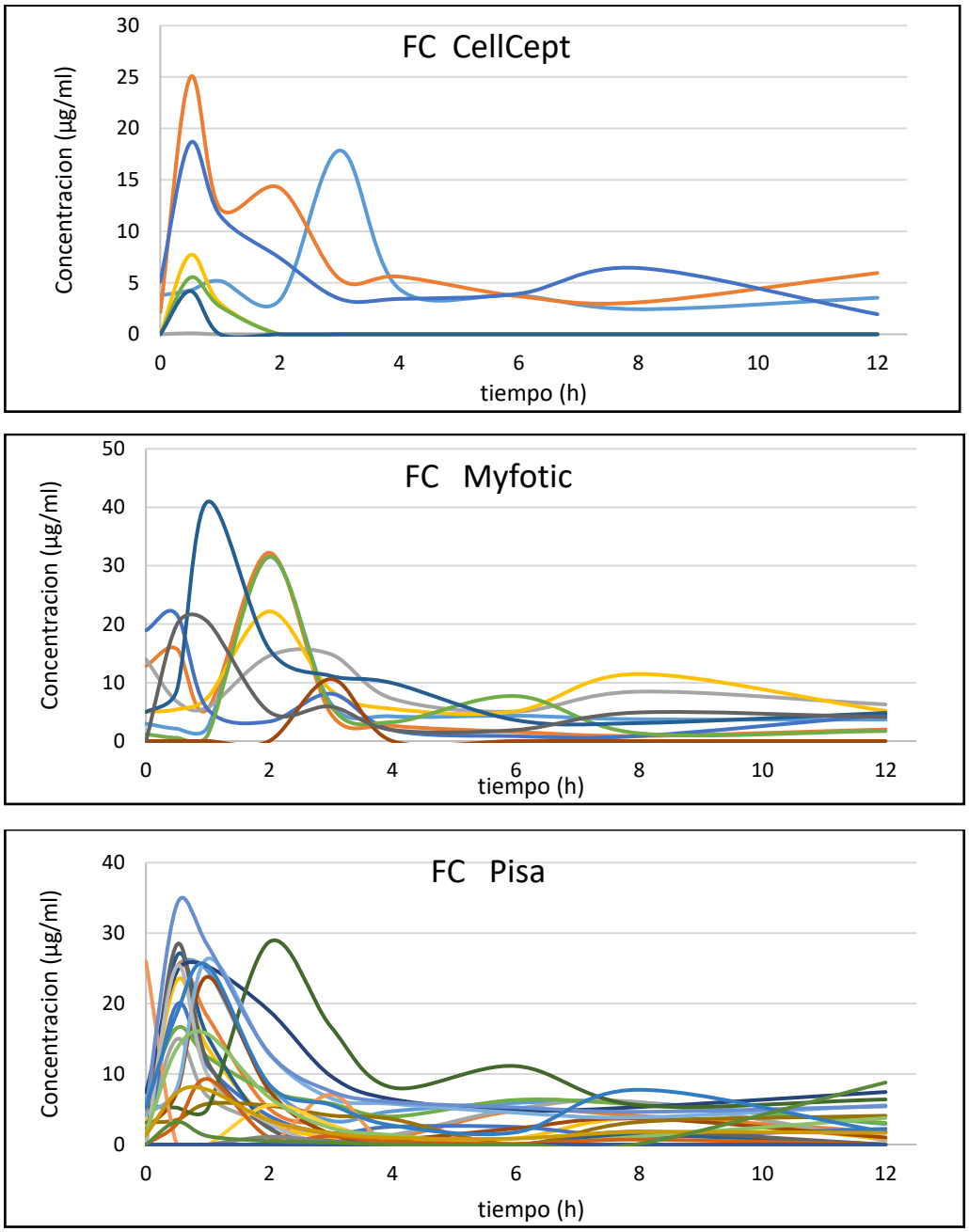


Figura 22. Farmacocinéticas de las tres marcas más utilizadas

Por ello se analizó la dispersión existente de las nueve marcas respecto a los valores de referencia que se muestra en la siguiente gráfica:

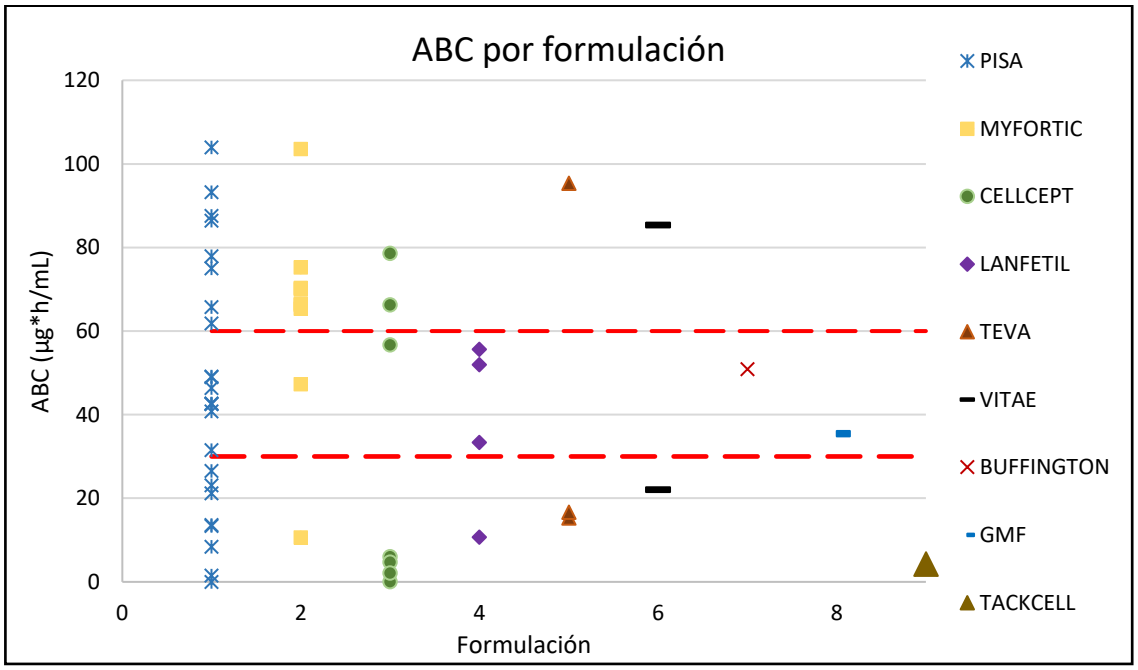


Figura 23. Dispersión del ABC por formulación respecto al valor de referencia 30-60 µg*h/mL marcado con líneas rojas

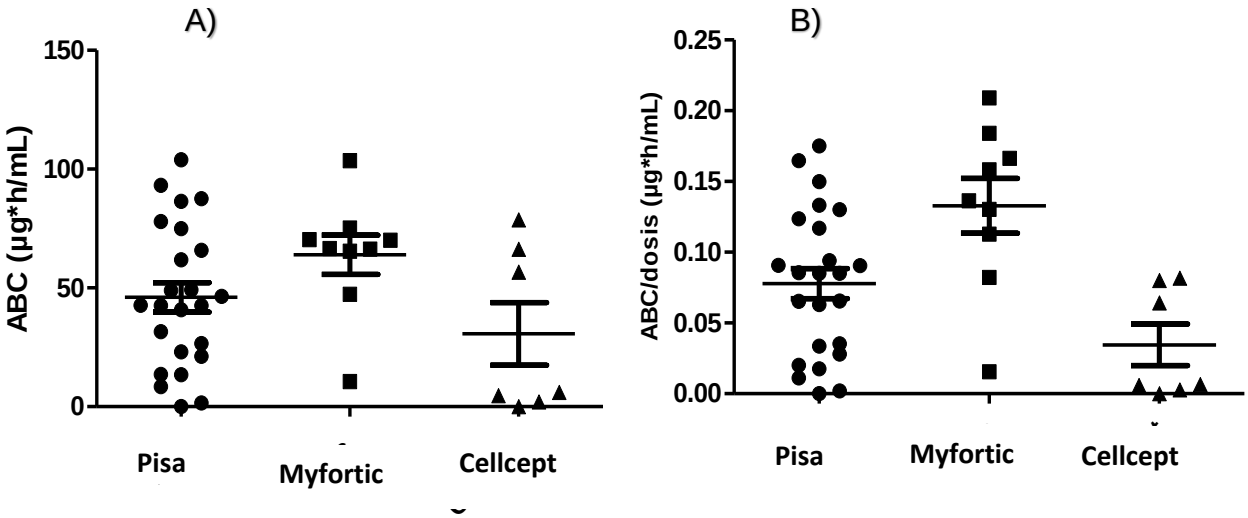


Figura 24. ABC (A) y ABC/dosis (B) individual de las tres formulaciones más usadas.

Como se puede observar, la magnitud de la variabilidad en la biodisponibilidad es comparable entre las tres formulaciones más empleadas e indistintamente de la marca hay pacientes sobreexpuestos y subexpuestos al AMF, pero también quienes se encuentran dentro de la ventana terapéutica como se observa en las siguientes tablas.

Tabla 14. Porcentaje de pacientes dentro de la ventana terapéutica, sub y sobreexpuestos PISA

	N=24	**Pisa**	*N=9*	**Myfortic**	*N=7*	**Cellcept**
pacientes sobreexpuestos	8	33.3 %	6	66.7 %	2	28.6 %
pacientes subexpuestos	8	33.3 %	2	22.2 %	4	57.1 %
pacientes dentro de la ventana terapéutica	8	33.3 %	1	11.1 %	1	14.3 %

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre el ABC y ciertos parámetros descriptivos que se utilizan para dosificar al AMF.

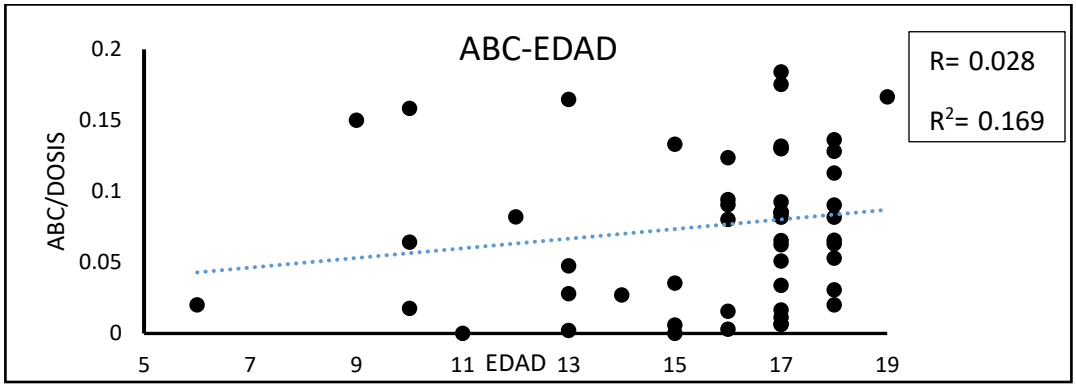


Figura 25. Correlación del ABC/dosis con la edad

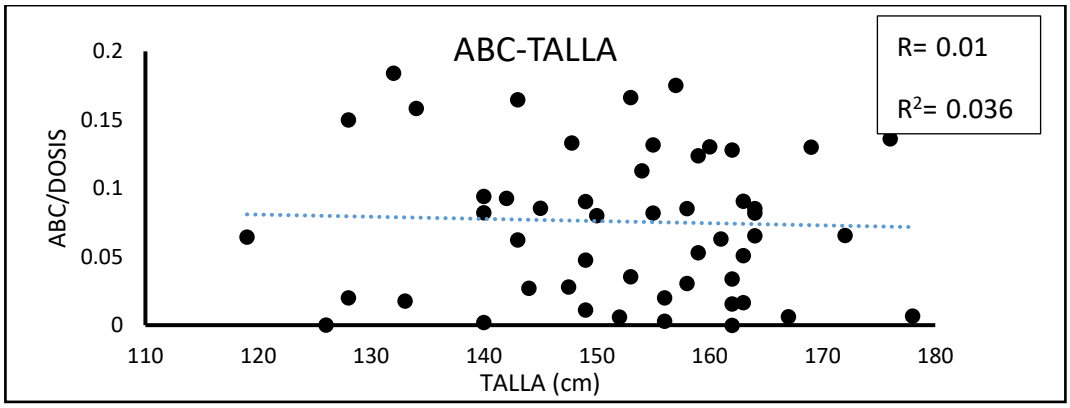


Figura 26. Correlación del ABC/dosis con la talla

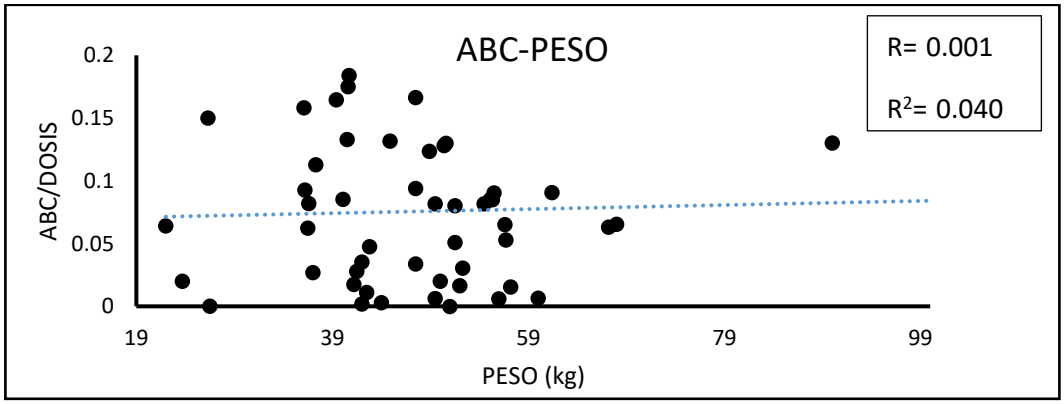


Figura 27. Correlación del ABC/dosis con el peso

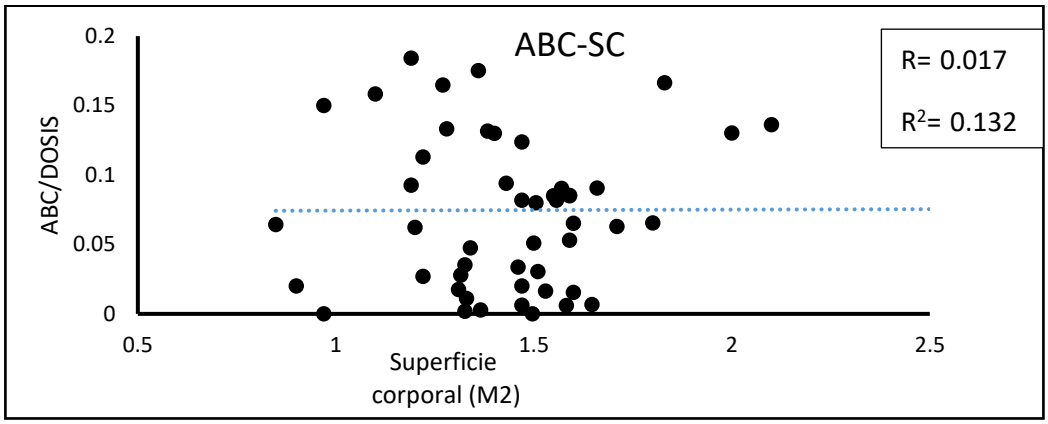


Figura 28. Correlación del ABC/dosis con la superficie corporal

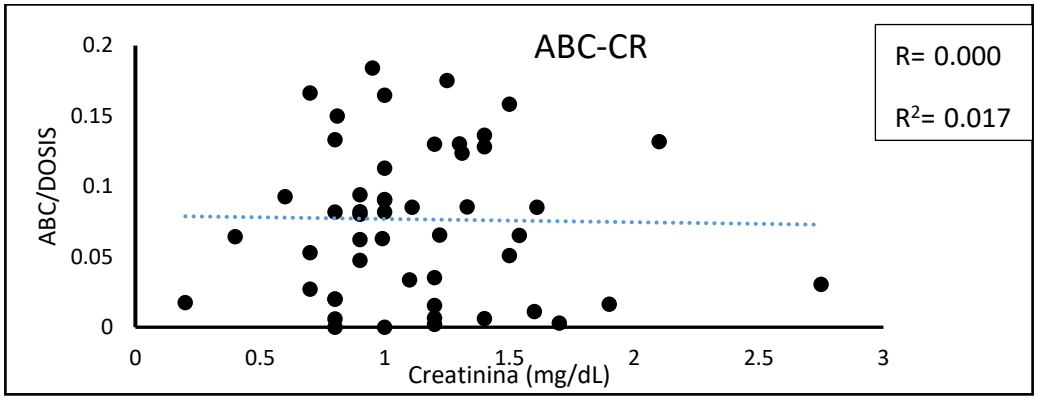


Figura 29. Correlación del ABC/dosis con creatinina

Como se puede observar no hay una correlación ni predicción adecuada entre las variables fisiológicas como el peso, edad, talla, superficie corporal y creatinina con respecto al área bajo la curva.

7. Discusión

Para poder medir la biodisponibilidad, se validó un método por HPLC que ha demostrado ser un método más selectivo para cuantificar el AMF en plasma, ya que como se sabe la biodisponibilidad es el parámetro determinante en la eficiencia en las formulaciones empleadas, la cual es medida por la exposición total del paciente al fármaco (ABC_{0-12}) y el empleo de otro método podría reflejar que la formulación está liberando a circulación sistémica la cantidad de AMF necesaria para alcanzar los niveles terapéuticos cuando en realidad pude estar por debajo de ellos o viceversa.

Una vez que se estableció la técnica analítica adecuada para cuantificar el AMF y medir la eficiencia de las formulaciones, se hizo un análisis para determinar el porcentaje de pacientes dentro de los parámetros asociados con eficacia y seguridad para ABC_{0-12}, Cmax y C_{0h}. Como se muestra en las tablas 12 y figuras 19, 20, 21 existe una amplia variabilidad entre pacientes en cuanto a la exposición al AMF.

Dentro de los parámetros farmacocinéticos el que mayor correlación tiene con un buen pronóstico para el paciente disminuyendo el rechazo agudo del riñón es el ABC_{0-12}, ya que refleja cual es la exposición total al fármaco; lamentablemente como se puede observar en los 52 pacientes pediátricos involucrados en este estudio, el poder mantener a cada uno dentro del parámetro establecido de 30-60µg*h/mL para el ABC_{0-12}, es muy complicado debido a diversos factores que se ven involucrados como: la función renal la cual si se ve disminuida refleja una mayor acumulación de AMF incrementando la exposición, pH gástrico, la velocidad del vaciamiento gástrico, el porcentaje de grasa y agua corporal afectando el volumen de distribución, polimorfismos de las

UGT´S que afectan la velocidad con la que se metaboliza el AMF, la ontogenia interviniendo en la expresión de enzimas clave en el metabolismo, la unión a proteínas plasmáticas y probablemente la formulación (19,32,41,42).

Algunas de las variables mencionadas son dependientes del tiempo y la condición del paciente, por lo tanto, son sujetas a cambios paulatinos que reflejan una subexposición o sobreexposición al AMF aun después de haber asignado la dosis. Es importante resaltar que está bien documentado que no existe una correlación entre la dosis y al exposición al fármaco, por ello la necesidad de realizar el monitoreo terapéutico para poder ajustarla de acuerdo a los niveles plasmáticos del AMF(32,42–45).

La pregunta principal en este estudio es: cómo está afectando la formulación a la biodisponibilidad del AMF en el paciente pediátrico con trasplante renal, ya que la sobreexposición o subexposición puede estar dada también por la eficiencia de la formulación.

Durante el estudio se preguntó que marca de MMF estaba usando cada paciente. Como se muestra en la tabla 13 se encontraron nueve formulaciones diferentes, de las cuales se obtuvo el promedio de los parámetros farmacocinéticos descriptivos de la biodisponibilidad por cada una (ABC_{0-12}, Cmax, Tmax). Los valores se encuentran dentro de los rangos asociados con una buena eficiencia de la formulación, sin embargo la desviación estándar nos permite ver que hay mucha variabilidad en ellos, lo cual nos llevó a analizar la dispersión por paciente y por marca con respecto al ABC_{0-12} de referencia para poder observar la biodisponibilidad del AMF.

Al momento de revisar las formulaciones empleadas encontramos que hay una dispersión consistente (figura 23) aun normalizando por la dosis como se muestra en las tres principales formulaciones empleadas (figura 24), habiendo pacientes dentro y fuera de la biodisponibilidad deseada la cual es determinante en la aparición de reacciones adversas cuando está por encima de la ventana terapéutica y la falla terapéutica cuando está por debajo (tablas 14).

Con los resultados obtenidos no podemos atribuir directamente la variabilidad de la exposición a la formulación empleada ya que de las mismas existen pacientes dentro, sobreexpuestos y subexpuestos al AMF aun normalizando por la dosis, lo cual es un mejor parámetro descriptivo de la absorción (27), sin embargo, el hecho de que cierto número de pacientes estén dentro de la ventana terapéutica eliminando la variable de la dosis, nos sugiere que la formulación no es el problema. lamentablemente no se pudo realizar un estadístico para comparar la biodisponibilidad por la diferencia en el número de pacientes que utilizaban cada formulación y el resultado de ello se vería sesgado, pero la tendencia observada nos permite asociar que la formulaciones de AMF sí son comparables en cuanto a la eficiencia y un buen pronóstico contra el rechazo agudo como se ha observado en otros experimentos (25–27,46).

Esto nos hizo pensar que la dispersión en el ABC_{0-12} era causada por la manera en que se dosifica el AMF y no específicamente por la formulación. A pesar de que en los últimos años la manera de ajustar la dosis es gracias al monitoreo terapéutico (15,45) no siempre es posible realizarlo en la práctica clínica. Por esta razón en primera instancia y durante el tratamiento generalmente se utilizan otros criterios para

asignar la dosis como la talla, peso, edad, superficie corporal o creatinina sérica (33,47).

En las guías de prescripción para el AMF, se establece que debe utilizarse la superficie corporal para determinar la dosis y posteriormente realizarse un ajuste según los efectos adversos, por esta razón se determinó la correlación del ABC_{0-12} normalizada con la dosis y superficie corporal en conjunto de otros parámetros que pudieran utilizarse de manera indirecta como la talla, peso, edad, y creatinina en orina. Como era de esperarse no existe una correlación con el ABC_{0-12} independientemente de la dosis, sugiriéndonos que los cambios de biodisponibilidad están sujetos a las variables fisiológicas además de la formulación empleada (figuras 25-29).

Con lo obtenido en este trabajo, se pone al descubierto la importancia que tiene la manera en que el MMF debe prescribirse y a pesar de que la formulación puede estar involucrada hacen falta más estudios de bioequivalencia para poder determinar si realmente es equiparable con las de patente (Cellcept y Myfortic), ya que en este estudio no se obtiene un resultado contundente para recomendar el uso de genéricos (25,27).

En el Hospital Infantil de Mexico Federico Gómez el MMF es administrado conforme a las guías de prescripción, tomando en cuenta la superficie corporal como ya se mencionó, sin embargo este criterio no muestra una correlación con la exposición total al AMF pudiendo ocasionar reacciones adversas relacionadas con una sobreexposición o una falla terapéutica atribuida a una subexposición. Para disminuir esta problemática hay algunos pacientes a los cuales se les realiza el monitoreo terapéutico para ajustar la dosis, pero no es algo que se realice de manera habitual, solo se lleva a cabo en aquellos que logran entrar al protocolo; aunado a

ello los médicos para poder dosificar, parten las tabletas de 250 mg y 500 mg en cuartos o mitades dificultando poder dar las dosis de manera exacta probablemente interfiriendo en la variabilidad de la biodisponibilidad y por lo tanto de la exposición del paciente al fármaco(48).

Una alternativa para poder mejorar la manera en que se administra el MMF es una formulación líquida la cual existe, pero solo se comercializa en algunos países a un alto precio.

En respuesta a que no hay formulación líquida, algunos grupos de investigación en han desarrollado una suspensión de MMF a partir de las tabletas o cápsulas que se comercializan mostrando ser una probable opción para el paciente pediátrico hasta el momento solo han realizado pruebas de estabilidad la cual ha mostrado desventajas en cuanto al periodo de almacenamiento y consumo ya que se encontró que la concentración óptima solo se mantiene durante 7 días después de la preparación y al ser un medicamento de uso crónico, esto podría no ser práctico ni sustentable para el hospital en México (49–51).

Mientras en México no se cuente con acceso a la presentación liquida de MMF comercializada por Roche, a pesar de ejercer el monitoreo terapéutico, seguirán existiendo pacientes que muestren exposiciones por encima y por debajo de los niveles asociados con eficacia y seguridad, teniendo repercusiones clínicas en cuanto de reacciones adversas y falla terapéutica.

El objetivo de tener un método de cromatografía liquida de alta resolución (HPLC) validado para este estudio, es obtener resultados que sean confiables en la cuantificación del ácido micofenólico en plasma de paciente pediátrico con trasplante renal. El método empleado previamente había sido montado en el laboratorio para el mismo propósito, por lo tanto, se recurrió a una revalidación para demostrar que realmente tiene la capacidad de cuantificar el AMF y de ser un método confiable, el cual es selectivo, lineal, exacto y preciso (ver tablas 7 y 8).

Por otro lado, además de tener un método de cuantificación de AMF por HPLC, el contar por parte del Hospital Infantil de México Federico Gómez con un método inmunológico validado como es el inmunoensayo de multiplicación enzimática (EMIT), que reduce el tiempo de análisis, nos permite mayor libertad a la hora de escoger la manera en la cual se va a realizar la determinación del AMF en plasma, pero la pregunta a responder en cuanto al uso de ambos, es ¿cuál método ofrece un mejor resultado?

Contar con el alcance de ambos métodos para la determinación de los niveles de AMF en plasma de paciente renal nos permitió realizar la comparación de ellos, la cual es de suma importancia ya que la manera en que se dosifica el MMF depende del monitoreo terapéutico, y la medición de la eficiencia de la formulación depende de la cuantificación del fármaco en plasma.

En este estudio, se realizó la comparación entre ambos métodos por el modelo sugerido por Sheiner y Beal.

Idealmente las concentraciones deberían estar sobre la línea de tendencia donde EMIT=HPLC, esto significaría que hay una igualdad entre los métodos, matemáticamente esto se reflejaría con un valor de

cero al realizar los cálculos, sin embargo obtenemos un valor de 1.94, lo que significa que hay un sesgo positivo del EMIT con respecto al HPLC (figura 16) y que nos permite asumir lo ya reportado, la existencia de metabolitos del AMF presentes en la muestra plasmática que están ejerciendo una reacción cruzada con el anticuerpo del inmunoensayo, lo cual se refleja en una sobreestimación del 30% en el área bajo la curva al momento de cuantificar (figura 17 y 18). En cuanto a la precisión por medio de la ecuación, se refleja cuánto se aleja el valor de EMIT con respecto al HPLC el cual es nuestro método de referencia, mientras más grande sea el valor obtenido menor es la precisión, el 30% de desviación al valor de referencia que mostró tener, directamente refleja que el método es un 70% preciso con respecto al HPLC.

Nuestros resultados concuerdan con lo que se ha reportado por diferentes grupos de investigación, los cuales han descrito la interacción cruzada de un metabolito con el anticuerpo lo cual causa la sobreestimación. El causante de ello es el ácido acetilmicofenolico el cual también posee actividad terapéutica, de hecho, algunos mencionan que los resultados que puede dar el EMIT reflejan mejor la inmunosupresión por el MMF, sin embargo, la interpretación de ello es muy difícil ya que la concentración depende de la reacción cruzada con el anticuerpo y esto no puede medirse y por otro lado, el impacto de este metabolito en la concentración del AMF determinada por EMIT, es dependiente del tiempo transcurrido desde la administración y por la poca estabilidad de la molécula a la temperatura, ya que sufre de una rápida hidrólisis interfiriendo en los resultados al generar falsos positivos e incrementos en la concentración en las muestras de plasma (35,36,38,39,52) .

8. Conclusiones

De 52 pacientes, 19 se encuentran sobreexpuestos, 18 subexpuestos y 15 dentro de la ventana terapéutica.

El MMF presenta cambios en su biodisponibilidad que no pueden atribuirse directamente a la formulación, sino también a las diferencias fisiológicas de cada paciente y la forma en que se dosifica, siendo esto último un factor de relevancia clínica ya que dificulta el poder mantener el MMF en los niveles adecuados relacionados con eficacia y seguridad.

Se logró contar con un método cromatográfico lineal, preciso y exacto según la nom-177 el cual nos permite cuantificar AMF en plasma de pacientes pediátricos con trasplante renal.

Se observó que EMIT tiene una sobreestimación en la cuantificación del AMF, una desviación del 30% con respecto al valor real y además demostró ser menos accesible económicamente, confirmando que la mejor manera de realizar el monitoreo terapéutico sigue siendo el HPLC.

.

Al no contar con un parámetro adecuado para dosificar, es necesario realizar el monitoreo terapéutico, al igual que tener una formulación liquida que permita ajustar la dosis de una manera más precisa, para asegurar que la exposición al MMF sea la necesaria.

9. Bibliografía.

1. Ley general de Salud [Internet]. ley general de salud. Available from: www.salud.gob.mx/unidades/cdi/legis/lgs/index-t14.htm
2. Centro Nacional de Trasplantes [Internet]. 2017. Available from: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/245082/1erseme stre2017.pdf
3. Alberú-Gómez J, Urrea EM. Inmunosupresión para receptores de trasplante renal: Estrategias actuales. Rev Investig Clin. 2005;57:213–24.
4. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. N Engl J Med. 2004;351:2761–6.
5. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RWG, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, et al. Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1994-2004. Vol. 6, American Journal of Transplantation. 2006. p. 1111–31.
6. Heeger PS, Dinavahi R. Transplant immunology for non-immunologist. Vol. 79, Mount Sinai Journal of Medicine. 2012. p. 376–87.
7. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate in solid organ transplant recipients. Vol. 46, Clinical Pharmacokinetics. 2007. p. 13–58.
8. Comisión De Farmacia Y Terapéutica informe de inlcusión de medicamentos en la guía farmacoterapéutica. 2014.
9. Allison, A. C. Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. Immunopharmacology. 2000;47:85–118.
10. Laurent AF, Dumont S, Poindron P, Muller CD. Mycophenolic acid suppresses protein N-linked glycosylation in human monocytes and their adhesion to endothelial cells and to some substrates. Exp Hematol . 1996;24:59–67.

11. Awrylowicz CAMH, Iu YINGQ, Airbanks LYDF, Atarzyna KRU. Mycophenolic Acid-Induced Gtp Depletion Also Affects Atp and Pyrimidine Synthesis in Mitogen- Stimulated Primary Human T-Lymphocytes 1. Transplantation. 2000;69:890–7.

12. Fujiyama N, Miura M, Kato S, Sone T, Isobe M, Satoh S. Involvement of carboxylesterase 1 and 2 in the hydrolysis of mycophenolate mofetil. Drug Metab Dispos. 2010;38:2210–7.

13. Alousi A, Grimley M, Bolaños-meade J. Mycophenolate Pharmacokinetics and Association with Response to Acute Graft vs Host Disease (GVHD) Treatment From the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Blood. 2011;16:421–9.

14. Filler G, Bendrick-Peart J, Christians U. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil and sirolimus in children. Ther Drug Monit [Internet]. 2008;30(2):138–42.

15. Jeong H, Kaplan B. Therapeutic Monitoring of Mycophenolate Mofetil. Clin J Am Soc Nephrol . 2006;2(1):184–91.

16. David-Neto E, Pereira Araujo LM, Sumita NM, Mendes ME, Ribeiro Castro MC, Alves CF, et al. Mycophenolic acid pharmacokinetics in stable pediatric renal transplantation. Pediatr Nephrol. 2003;18:266–72.

17. Tredger JM, Brown NW, Adams J, Gonde CE, Dhawan A, Rela M, et al. Monitoring mycophenolate in liver transplant recipients: Toward a therapeutic range. Liver Transplant. 2004;10(4):492–502.

18. Aigrain EJ, Shaghaghi EK, Baudouin V, Popon M, Loirat C. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil in eight pediatric renal transplant patients. Transplant Proc. 2000;32:388–90.

19. Tönshoff B, David-Neto E, Ettenger R, Filler G, van Gelder T, Goebel J, et al. Pediatric aspects of therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in renal transplantation. Transplant Rev [Internet]. 2011;25:78–89.

20. Sociedad Mexicana de Trasplantes.

21. Redes EM. Guía para la evaluación de la intercambiabilidad de medicamentos que contienen fármacos de estrecho margen terapéutico y dósis crítica.

22. Pollard S, Nashan B, Johnston A, Hoyer P, Belitsky P, Keown P, et al. A pharmacokinetic and clinical review of the potential clinical impact of using different formulations of cyclosporin A. Berlin, Germany, November 19, 2001. Clin Ther. 2003;25:1654–69.

23. Remport Á, Dankó D, Gerlei Z, Czebe K, Kiss I. Special considerations in generic substitution of immunosuppressive drugs in transplantation. Orv Hetil [Internet]. 2012;153:1341–9.

24. Van Gelder T. European Society for Organ Transplantation Advisory Committee Recommendations on Generic Substitution of Immunosuppressive Drugs. Transplant International.

25. Van Gelder T, Gabardi S. Methods, strengths, weaknesses, and limitations of bioequivalence tests with special regard to immunosuppressive drugs. Transpl Int. 2013;26:771–7.

26. Medeiros M, Lumini J, Stern N, Castañeda-Hernández G, Filler G. Generic immunosuppressants. Pediatr Nephrol. 2017;1–9.

27. González-Ramírez R, González-Bañuelos J, Villa MDLS, Jiménez B, García-Roca P, Cruz-Antonio L, et al. Bioavailability of a generic of the immunosuppressive agent mycophenolate mofetil in pediatric patients. Pediatr Transplant. 2014;18:568–74.

28. Rutkowski B, Bzoma B, Dębska-Ślizień A, Chamienia A. Generic formulation of mycophenolate mofetil (Myfenax) in de Novo renal transplant recipients: Results of 12-month observation. In: Transplantation Proceedings. 2014. p. 2683–8.

29. Jacobo-Cabral CO, García-Roca P, Reyes H, Lozada-Rojas L, Cruz-Antonio L, Medeiros M, et al. Limustin®, a non-innovator tacrolimus formulation, yields reduced drug exposure in pediatric renal transplant recipients. Pediatr Transplant. 2014;18:706–13.

30. Esquivel A, González-Ramírez R, Alberú J, Gracida C, Medeiros M, Castañeda-Hernández G. Comparison of Dissolution Properties of 2 Enteric-Coated Formulations Containing Mycophenolate Sodium: Myfortic vs Femulan. Transplant Proc [Internet]. 2010;42:353–6.

31. Scheubel E, Adamy L, Cardot JM. Mycophenolate mofetil: Use of a simple dissolution technique to assess generic formulation differences. Dissolution Technol. 2012;19:52–8.

32. Filler G, Alvarez-Elías AC, McIntyre C, Medeiros M. The compelling case for therapeutic drug monitoring of mycophenolate

mofetil therapy. Pediatr Nephrol. 2017;32:21–9.

33. Downing HJ, Pirmohamed M, Beresford MW, Smyth RL. Paediatric use of mycophenolate mofetil. Br J Clin Pharmacol. 2013;75:45–59.

34. Shaw LM, Korecka M, Aradhye S, Grossman R, Bayer L, Innes C, et al. Mycophenolic acid area under the curve values in African American and Caucasian renal transplant patients are comparable. J Clin Pharmacol. 2000;40:624–33.

35. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, Wagner N, Schütz E, Mehls O, et al. Comparison of the Emit immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal-transplant recipients on mycophenolate mofetil therapy. Clin Chem. 2002;48:517–25.

36. Shipkova M, Schütz E, Armstrong VW, Niedmann PD, Wieland E, Oellerich M. Overestimation of mycophenolic acid by EMIT correlates with MPA metabolite. Transplant Proc. 1999;31(1–2):1135–7.

37. Yeung JS, Wang W, Chan L. Determination of Mycophenolic Acid Level : Comparison of. Ther Drug Monit. 1999;1345:1214–5.

38. Shipkova M, Schütz E, Besenthal I, Fraunberger P, Wieland E. Investigation of the crossreactivity of mycophenolic acid glucuronide metabolites and of mycophenolate mofetil in the Cedia MPA assay. Ther Drug Monit. 2010;32:79–85.

39. Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, Niedmann PD, Weber L, Tönshoff B, et al. Therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid: Comparison of HPLC and immunoassay reveals new MPA metabolites. Transplant Proc. 1998;30:1185–7.

40. Beal LBS and SL. Some suggestions for measuring preictive performance. J Pharmacokinet Biopharm. 1981;9.

41. Masri MA, Andrysek T, Rizk S, Matha V. The role of generics in transplantation: TM-MMF versus cellcept in healthy volunteers. In: Transplantation Proceedings. 2004. p. 84–5.

42. Pawinski T, Durlik M, Szlaska I, Urbanowicz A, Majchrnak J, Gralak B. Comparison of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters in kidney transplant patients within the first 3 months post-transplant. J Clin Pharm Ther. 2006;31:27–34.

43. Filler G. Value of therapeutic drug monitoring of MMF therapy in pediatric transplantation. Pediatr Transplant. 2006;10:707–11.

44. Martial LC, Jacobs BAW, Cornelissen EAM, De Haan AFJ, Koch BCP, Burger DM, et al. Pharmacokinetics and target attainment of mycophenolate in pediatric renal transplant patients. Pediatr Transplant. 2016;20:492–9.

45. Le Meur Y, B??chler M, Thierry A, Caillard S, Villemain F, Lavaud S, et al. Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. Am J Transplant. 2007;7:2496–503.

46. Danguilan RA, Lamban AB, Luna CAC, Bacinillo M, Momongan MIC. Pilot study on the efficacy and safety of generic mycophenolate mofetil (mycept) compared with cellcept among incident low-risk primary kidney transplant recipients. Transplant Proc [Internet]. 2014;46:415–7.

47. Yoo EC, Alvarez-Elías AC, Todorova EK, Filler G. Developmental changes of MPA exposure in children. Pediatr Nephrol. 2016;31:975–82.

48. Handbook of Extemporaneous Preparation: A Guide to Pharmaceutical Compounding. Editors: Jackson M, Lowey A. Pharmaceutical Press, London. In 2010.

49. Fahimi F, Baniasadi S, Mortazavi SA, Dehghan H, Zarghi A. Physical and chemical stability of mycophenolate mofetil (MMF) suspension prepared at the hospital. Iran J Pharm Res. 2012;11:171–5.

50. Anaizi NH, Swenson CF, Dentinger PJ. Stability of mycophenolate mofetil in an extemporaneously compounded oral liquid. Am J Heal Pharm. 1998;55:926–9.

51. Venkataramanan R, McCombs JR, Zuckerman S, McGhee B, Pisupati J, Dice JE. Stability of mycophenolate mofetil as an extemporaneous suspension. Ann Pharmacother. 1998;32:755–7.

52. Irtan S, Azougagh S, Monchaud C, Popon M, Baudouin V, Jacqz-Aigrain É. Comparison of high-performance liquid chromatography and enzyme-multiplied immunoassay technique to monitor mycophenolic acid in paediatric renal recipients. Pediatr Nephrol. 2008;23:1859–65.