



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Análisis Farmacocinético Poblacional de
Tacrolimus en Pacientes Pediátricos con
Trasplante Renal**

TESIS

Que presenta

M. en C. CARLOS ORLANDO JACOBO CABRAL

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Dra. Mara Medeiros Domingo

México, D.F.

Septiembre, 201

El presente trabajo de investigación fue llevado a cabo bajo dirección y asesoría del Dr. Gilberto Castañeda Hernández, Dra. Mara Medeiros Domingo, y del Dr. Iñaki F. de Trocóniz.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco, en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, D.F. México, y en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra (UNAV), Pamplona, España.

Esta tesis se realizó gracias a una beca otorgada a Carlos Orlando Jacobo Cabral, por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de beca 47866, registro 216108).

Este trabajo fue apoyado por CONACYT, apoyo 181368, FOSISS/CONACYT 2008/COI/8727, y el Hospital Infantil de México "Federico Gómez", protocolos HIM 2007/019 y HIM 2011/026.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor “Doc” Gilberto y co-tutora Dra. Mara, amigos y compañeros de laboratorio, Olivid, Rodrigo, Ari, Mari-Paz, Lorena, Marco, Violeta, Lili, Paty, Lulú.

A Iñaki F. de Trocóniz, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad de Navarra.

A mis sinodales de tesis por sus acertados comentarios y observaciones.

A todas las personas que han influido en mi vida y me han brindado su amistad y consejos, Melisa, Koldo, Nuria, María, Ariana, Elba, **Lupita, Arturo...**

... a todos, gracias.

DEDICATORIA

Con todo mi cariño para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano siempre para lograr todos mis objetivos, es para ustedes está tesis en agradecimiento por todo su amor. Dedicado a ustedes Familia.

Evelia Cabral Dorado,

Juan Carlos Jacobo Gómez,

Selene E. Jacobo Cabral,

J. Omar Jacobo Cabral,

y en especial a tí por estar siempre a mi lado, Violeta Zúñiga García.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades acerca del trasplante renal.....	1
1.2. Inmunosupresores.....	2
1.3. Tacrolimus	3
1.3.1. Mecanismo de acción.....	4
1.3.2. Farmacocinética	5
1.3.2.1. Absorción.....	5
1.3.2.2. Distribución.....	6
1.3.2.3. Metabolismo.....	6
1.3.2.4. Eliminación.....	7
1.3.3. Farmacocinética en pacientes pediátricos	7
1.3.4. Reacciones adversas	8
1.3.5. Interacciones con otros fármacos.....	9
1.3.6. Farmacogenética del tacrolimus	10
1.4. Farmacocinética poblacional y modelado.....	12
1.4.1. Modelado no lineal de efectos mixtos	13
1.4.2. Estudios farmacocinéticos poblacionales de tacrolimus	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17

3. JUSTIFICACIÓN	18
4. OBJETIVO	19
4.1. Objetivos específicos	19
5. HIPÓTESIS	20
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1. Pacientes y colección de datos	20
6.1.1. Esquemas de inmunosupresión y medicación	21
6.1.2. Seguimiento	23
6.1.3. Perfiles farmacocinéticos y medición de tacrolimus	23
6.1.4. Genotipificación de CYP3A5 y ABCB1	24
6.2. Modelado farmacocinético poblacional	25
6.2.1. Modelo base.....	26
6.2.2. Selección de covariables y modelo final.....	28
6.2.3. Validación	29
6.3. Análisis estadístico	30
7. RESULTADOS	31
7.1. Modelado farmacocinético poblacional	33
7.1.1. Desarrollo del modelo farmacocinético base	33
7.1.2. Análisis de covariables	36
7.1.3. Validación del modelo final	41
7.2. Influencia de la formulación de tacrolimus sobre descriptores farmacocinéticos.....	47
7.3. Desarrollo de un descriptor de la dosis de tacrolimus basado en el modelo final....	48
8. DISCUSIÓN	50
9. CONCLUSIÓN	55
BIBLIOGRAFÍA	56

PRODUCTOS DE LA TESIS.....	62
ANEXOS	64
Anexo 1. Test del modelo final vs modelos de la literatura	64
Anexo 2. Script de NONMEM del modelo final.....	65
Anexo 3. Script de NONMEM de simulación de dosis basada en el modelo final.....	67
Anexo 4. Artículo aceptado para su publicación en la revista Pediatric Transplantation	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de uso de anticuerpos como terapia de inducción de 1996 a 2009	2
Tabla 2. Porcentaje de utilización de inmunosupresores en el día 30 post-trasplante.....	3
Tabla 3. Seguimiento en pacientes estables del porcentaje del tipo de terapia usado	3
Tabla 4. Resumen de análisis poblacionales y modelado de la farmacocinética de tacrolimus.....	15
Tabla 5. Características de 53 pacientes pediátricos de trasplante renal.....	32
Tabla 6. Resumen de los distintos modelos estructurales probados en el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional base.....	35
Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo base	36
Tabla 8. Comparación de modelos farmacocinéticos probados durante el análisis covariable y construcción del modelo farmacocinético poblacional final.....	37
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo covariable final, y validación bootstrap	43
Tabla 10. Numerical predictive check (NPC) de los datos totales	46
Tabla 11. Numerical predictive check (NPC) estratificado de acuerdo al genotipo de CYP3A5: *1/*1, *1/*3 y *3/*3	46
Tabla 12. Comparación del modelo final con otros modelos de la literatura.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curvas tiempo-concentración de tacrolimus en sangre.....	31
Figura 2. Curso temporal de las concentraciones en sangre de tacrolimus estratificado por el tipo de formulación	33
Figura 3. Esquema del modelo farmacocinético estructural	34
Figura 4. Relación entre estimados poblacionales de CL/F del modelo final y los grupos de genotipo de CYP3A5.....	39
Figura 5. Relación entre el tipo de formulación de tacrolimus y los estimados individuales K_a y F	39
Figura 6. Efecto de las covariables sobre los perfiles farmacocinéticos típicos de tacrolimus.....	40
Figura 7. Curso temporal de las observaciones y predicciones individuales.	41
Figura 8. Gráficos de bondad de ajuste.	42
Figura 9. Prediction-corrected visual predictive check (pcVPC)	44
Figura 10. pcVPC estratificado de acuerdo al genotipo de CYP3A5	45
Figura 11. Relación entre la formulación de tacrolimus y ABC_{12} , C_{max} , $ABC_{12}/Dosis$ y $C_{max}/Dosis$	47
Figura 12. Predicción de la dosis de tacrolimus	50

RESUMEN

Antecedentes y Objetivos: Tacrolimus es un fármaco muy efectivo y ampliamente usado para prevenir el rechazo de órganos, caracterizado por una biodisponibilidad oral pobre, variabilidad farmacocinética interindividual (VII) alta, y un índice terapéutico estrecho. Los objetivos de este estudio fueron (i) desarrollar un modelo farmacocinético poblacional de tacrolimus en una población pediátrica, y (ii) probar la influencia de diferentes covariables como el tipo de formulación sobre sus propiedades farmacocinéticas para facilitar la individualización de la dosis.

Métodos: Perfiles farmacocinéticos completos en estado estacionario fueron obtenidos de 53 receptores pediátricos de trasplante renal quienes estaban recibiendo la formulación innovadora de tacrolimus dos veces al día o alguna formulación genérica dependiendo de su proveedor de seguridad social. Parámetros farmacocinéticos poblacionales y de variabilidad fueron estimados usando el software de modelado no lineal de efectos mixtos NONMEM® Version 7.2. Diferentes características como demográficas, datos clínicos, interacciones de fármacos, polimorfismos genéticos de *CYP3A5* y *ABCB1*, dosis de tacrolimus administrada y tipo de formulación, fueron probadas en busca de efectos covariables significativos sobre la farmacocinética de tacrolimus. Se propuso un calculador de la dosis óptima basado en el modelo farmacocinético poblacional final seleccionado.

Resultados: Los perfiles farmacocinéticos de tacrolimus exhibieron VII alta. Se observó que uno de los genéricos, Limustin®, muestra concentraciones normalizadas a la dosis marcadamente más bajas que el resto de las formulaciones. Un modelo de dos compartimentos con absorción y eliminación de primer orden describió los perfiles farmacocinéticos de tacrolimus en la población estudiada. La relación entre el genotipo de *CYP3A5* y CL/F de tacrolimus fue incluida en el modelo final. CL/F en pacientes portadores de *CYP3A5* *1/*1 y *1/*3 fue aproximadamente 2 y 1.5 veces más grande, respectivamente, que en portadores de *CYP3A5* *3/*3

(no expresadores), y explicó casi toda la VII en la CL/F de tacrolimus. Otras covariables retenidas en el modelo final fueron la dosis de tacrolimus y el tipo de formulación. De hecho el tipo de formulación fue significativo sobre la absorción y exposición ya que exhibieron diferencias marcadas especialmente en una formulación genérica sobre K_a y F. Simulación con el modelo final predijo diferentes dosis de tacrolimus dependiendo de las características de los pacientes que fueron retenidas como covariables significativas en el modelo farmacocinético.

Conclusiones: El modelado farmacocinético poblacional de tacrolimus en receptores pediátricos de trasplante renal generó la identificación del tipo de formulación de tacrolimus como una covariable significativa que afecta las concentraciones en sangre, y confirmó el efecto significativo previamente reportado del genotipo de *CYP3A5* sobre la CL/F de tacrolimus. Además permitió el diseño de una dosificación de tacrolimus propuesta basada en el modelo final que incluyó los efectos covariables significativos encontrados en este estudio que se espera ayude a mejorar la dosificación de tacrolimus.

ABSTRACT

Background and Objectives: Tacrolimus is a highly effective and widely used drug in preventing organ rejection characterized by a poor oral bioavailability, high inter-patient pharmacokinetic (PK) variability (IPV), and narrow therapeutic index. The aims of this study were (i) to develop a population PK model of tacrolimus in a pediatric population, and (ii) test the influence of different covariates as formulation type on its PK properties to facilitate dose individualization.

Methods: Full PK profiles at steady state were obtained from 53 pediatric renal transplant recipients who were receiving twice daily the innovator tacrolimus or some generic formulation depending on their social security provider. Population PK and variability parameters were estimated using the nonlinear mixed-effect modelling software NONMEM® Version 7.2. Different patient characteristics as demographics, clinical data, drug interactions, *CYP3A5* and *ABCB1* genetic polymorphisms, administered tacrolimus dose and formulation type, were tested for significant covariate effects on tacrolimus PK. An optimal dose calculator is proposed based on the final selected population PK model.

Results: Tacrolimus PK profiles exhibited high IPV. It was observed that one of generics, Limustin®, shows marked lower dose-normalized concentrations than the rest of formulations. A two compartments model with first order input and elimination described the tacrolimus PK profiles in the studied population. The relationship between *CYP3A5* genotype and tacrolimus CL/F was included in the final model. CL/F in *CYP3A5* *1/*1 and *1/*3 carriers was approximately 2- and 1.5-fold higher than in *CYP3A5* *3/*3 carriers (nonexpressers) respectively, and explained almost the entire IPV in CL/F. Other covariates retained in the final model were the tacrolimus dose and formulation type. In fact the formulation type was significant on absorption and exposure since exhibited marked differences especially in one

generic formulation on K_a and F . Simulation with the final model predicted different tacrolimus doses depending on the characteristics of the patients that were retained as significant covariates in the PK model.

Conclusions: Population PK modelling of tacrolimus in pediatric renal transplant recipients generated the identification of the tacrolimus formulation type as a significant covariate affecting the blood concentrations and confirmed the previously reported significant effect of *CYP3A5* genotype on tacrolimus CL/F. Further allowed the design of a proposed dosage of tacrolimus based on the final model that included the significant covariate effects found in this study that is expected to help to improve the dosing of tacrolimus.

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva tiempo-concentración
Alb	Albumina en sangre
ALT	Alanino aminotransferasa
ABC ₁₂	Área bajo la curva tiempo-concentración de 0 a 12 horas
ABCB1	Gen que codifica a la glicoproteína P
ASC	Área de superficie corporal
AST	Aspartato aminotransferasa
CL/F	Depuración aparente
CMV	Citomegalovirus
C _{max}	Concentración máxima
C _{min}	Concentración mínima
Cr	Creatinina en sangre
CWRES	Residuales ponderados condicionales de las predicciones poblacionales
CYP3A4	Citocromo p450 isoforma 3A4
CYP3A4	Gen que codifica al citocromo p450 isoforma 3A4
CYP3A5	Citocromo p450 isoforma 3A5
CYP3A5	Gen que codifica al citocromo p450 isoforma 3A5
Des	Formulación de tacrolimus desconocida
DPO	Días post-operatorios
DS	Desviación estándar
DTOT	Dosis total de tacrolimus
ERR	Error residual
F	Biodisponibilidad
FDTOT	Efecto de la dosis total de tacrolimus sobre la biodisponibilidad
FFOR	Efecto de la formulación de tacrolimus sobre la biodisponibilidad
FOCE	First Order Conditional Estimation
FOR	Formulación de tacrolimus
Fra	Framebin
η	Parámetro de efecto aleatorio de la variabilidad interindividual
Hb	Hemoglobina
Hct	Hematocrito
HIM	Hospital Infantil de México
IC95	Intervalos de confianza de 95%
INF _{CYP3A5}	Factor de influencia del genotipo de CYP3A5
IPRED	Predicciones individuales
IWRES	Residuales ponderados de las predicciones individuales
K	Potasio
K2EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético-disódico
K _a	Constante de absorción
KaFOR	Efecto de la formulación de tacrolimus sobre la constante de absorción

Lim	Limustin
mTOR	Enzima diana de rapamicina en células de mamífero (mammalian target of rapamycin)
Na	Sodio
NAPRTCS	North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies
NONMEM	Modelado no lineal de efectos mixtos (nonlinear mixed effects modelling)
NPC	Numerical predictive check
OBS	Concentraciones observadas
OFV	Valor de la función objetivo (objective function value)
pcVPC	Predicted-corrected visual predictive check
PRED	Predicciones típicas poblacionales
Pro	Prograf
PT	Proteínas totales en sangre
Q/F	Depuración aparente intercompartimental
RSE	Error estándar relativo
SCM	Método de construcción del modelo covariable paso a paso (Stepwise Covariate Model-building)
SEM	Error estándar de la media
SNP	Single nucleotide polymorphism
Ten	Tenacrine
t_{lag}	Tiempo de latencia
V	Volumen de distribución
V/F	Volumen de distribución aparente del compartimento central
VII	Variabilidad interindividual
VII-ERR	Variabilidad interindividual asociada al error residual
VII-F	Variabilidad interindividual asociada a la biodisponibilidad
VPC	Visual predictive check
$V_{T/F}$	Volumen de distribución aparente del compartimento periférico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades acerca del trasplante renal

El trasplante de órganos es una forma de tratamiento extremadamente exitosa para cientos de miles de pacientes quienes de otra manera habrían sido condenados a morir debido a la falla de un órgano vital [1], y consiste en transferir un órgano o un tejido de un individuo a otro para reemplazar su función [2].

Aunque el trasplante renal humano había sido probado esporádicamente antes de 1950, el trasplante renal fue el primer tipo de trasplante exitoso entre gemelos monocigóticos (año de 1954) lo cual dio el impulso para pruebas prolongadas [3]. Este primer trasplante de un órgano no fue un evento aislado sino más bien el resultado de un objetivo definido para el desarrollo de un programa de investigación de trasplante [4].

En México en el año 2011 existían alrededor de 8100 pacientes en espera de un trasplante renal. De los cuales, únicamente 2100 trasplantes se llevaron a cabo [2], en el 2012 se realizaron 2361 trasplantes de riñón y en el 2013 se reportaron 1958 trasplantes realizados hasta el tercer trimestre de ese año [5].

El problema central en el trasplante de órganos es la supresión del rechazo del aloinjerto provocado por el sistema inmune del paciente receptor del injerto. Así, el desarrollo de fármacos inmunosupresores es la clave para una función exitosa del aloinjerto. Los agentes inmunosupresores son usados para la inducción (inmunosupresión intensa en los días iniciales después del trasplante), mantenimiento y reversión del rechazo [6].

1.2. Inmunosupresores

El uso de fármacos inmunosupresores ha llevado a terapias de combinación de los mismos, que han bajado significativamente las tasas de rechazo agudo [4]. Los inmunosupresores usados para tratar el rechazo involucran a muchas clases de fármacos entre los que destacan los inhibidores de la calcineurina (ciclosporina A y tacrolimus), antimetabolitos (azatioprina y micofenolato de mofetilo), inhibidores de mTOR (sirolimus y everolimus), corticoesteroides (prednisona) y también últimamente se han usado anticuerpos anti células T (daclizumab y basiliximab) como terapia de inducción, es decir, una inmunosupresión intensiva, como parte del tratamiento inmunosupresor, inmediata al trasplante cuyo objetivo es evitar la reacción de rechazo agudo [7, 8]. De acuerdo a los resultados del Reporte Anual de Trasplante del 2010 del registro Norteamericano Renal Pediátrico de Ensayos y Estudios Colaborativos (NAPRTCS) que incluye datos arrojados por centros de Estados Unidos (USA) y Canadá [9], se muestra en la tabla 1 el porcentaje de uso de distintos anticuerpos como terapia de inducción por año.

Tabla 1. Porcentaje de uso de anticuerpos como terapia de inducción de 1996 a 2009.

	Porcentaje de Anticuerpo de Inducción (Iniciado en día del trasplante o el día 1 post-trasplante)													
	1996 n=632	1997 n=604	1998 n=560	1999 n=578	2000 n=472	2001 n=527	2002 n=488	2003 n=452	2004 n=440	2005 n=400	2006 n=363	2007 n=318	2008 n=307	2009 n=205
Ninguno	50.5	53	44.1	44.3	47.3	46.7	41.6	45.1	47.5	43.5	36.4	47.8	38.1	54.6
OKT3	21.7	14.4	9.6	4.7	0.4	1	0.8	0.4	0	0	0.8	0	0	0
Basiliximab	0	0.7	4.6	15.1	21.2	29	30.9	24.3	23.6	23	21.5	17.3	15.6	10.7
Daclizumab	0	4.8	17.91	24.7	19.5	15	15.2	12.8	12.5	13.5	16.3	6	10.4	8.8
Otro	0	0.2	1.1	0.7	5.9	3	4.5	5.5	5.7	5.5	10.5	9.1	9.5	3.4
ATG/ALG	27.9	27	22.7	10.6	5.7	5.3	7	11.7	10.7	14.5	14.6	19.8	26.4	22.4

OKT3 (origen murino del tipo IgG2a), Basiliximab (murino/humano anti-CD25) y Daclizumab (humanizado anti-IL2Ralpha) son anticuerpos monoclonales. ATG/ALG son anticuerpos policlonales, antitimocíticos (ATG) y antilinfocíticos (ALG). Adaptado de NAPRTCS, 2010 [9].

Además en las tablas 2 y 3 se muestra la proporción en el uso de los inmunosupresores al día 30 post-trasplante así como el cambio de la misma por año

(1996-2009), y la combinación de inmunosupresores o tipo de terapia usada durante el seguimiento a pacientes estables en 30 días, 1, 3 y 5 años post-trasplante, respectivamente [9].

Tabla 2. Porcentaje de utilización de inmunosupresores en el día 30 post-trasplante (1996-2009).

Porcentaje de Utilización de Fármaco. (Pacientes con injerto funcionando)														
	1996 n=598	1997 n=581	1998 n=534	1999 n=555	2000 n=454	2001 n=511	2002 n=478	2003 n=443	2004 n=434	2005 n=391	2006 n=356	2007 n=315	2008 n=306	2009 n=203
Prednisona	94.8	95.7	94.8	92.6	91.2	86.5	85.2	73.4	68.4	65.7	61.5	56.5	57.2	48.8
CsA	82.1	78.8	71.7	68.1	57.1	45.4	26.2	15.8	9.2	10.2	4.8	7.6	3.9	1
Tacrolimus	3.7	14.8	22.3	24.5	34.4	41.7	58.2	60.1	71.4	68.8	71.9	70.8	73.5	62.1
MMF	9	44.8	66.7	66.9	63.9	54.2	57.7	58.5	65.2	71.6	69.4	70.5	69.9	59.6
Azatioprina	49.3	34.4	19.7	16	13.7	12.9	2.7	3.8	3.2	1	2	3.2	3.6	2.5
Sirolimus	0	0	0.2	0.4	7.5	21.7	25.5	18.3	12.2	6.1	6.7	2.2	2.3	0.5

CsA=ciclosporina A; **MMF**=micofenolato de mofetilo. Adaptado de NAPRTCS, 2010 [9].

Tabla 3. Seguimiento en pacientes estables del porcentaje del tipo de terapia usado

Porcentaje de Utilización de Fármacos (Pacientes con injerto funcionando)								
	Era de trasplante 1996-2002				Era de trasplante 2003-2010			
	30 días	1 año	3 años	5 años	30 días	1 año	3 años	5 años
Prednisona/CsA/MMF	33.6	35.3	28.4	21.8	6.6	6.9	7.1	6.2
Prednisona/Csa/Aza	20.5	15.8	12.7	8.1	0.7	0.4	0.4	0.4
Prednisona/CsA	11.2	5.1	4.4	4.9	1.7	1.1	0.7	2.1
Prednisona/TAC/MMF	17.8	22.5	26.6	31.3	56.2	52.1	45.6	40.9
Prednisona/TAC/Aza	2.2	4.5	6.1	6.6	2.1	2.4	2.6	3.7
Prednisona/TAC	7.7	9.2	10.9	11.6	6.2	10.1	11.2	9.9
TAC/MMF	0.6	1.5	2.3	3.5	14.8	12.2	12.8	14.9
Otra combinación	6.4	6.2	8.6	12.3	11.9	14.8	19.7	21.9

Aza=azatioprina; **CsA**=ciclosporina A; **MMF**=micofenolato de mofetilo; **TAC**=tacrolimus. Adaptado de NAPRTCS, 2010 [9].

1.3. Tacrolimus

El tacrolimus en un inicio conocido como FK506, es una lactona macrólida derivada del hongo *Streptomyces tsukubaensis* usado clínicamente para la profilaxis o

reversión del rechazo de un órgano después del trasplante del mismo [10]. El tacrolimus inhibe a la calcineurina y, debido a que es más selectivo por las células T, su uso ha permitido una mayor preservación de otras líneas celulares derivadas de mieloides reduciendo la incidencia de infecciones al facilitar la disminución de las dosis de corticoesteroides [7]. Además es útil en el tratamiento de enfermedades de origen autoinmune.

1.3.1. Mecanismo de acción

El tacrolimus se une a una inmunofilina intracelular, la proteína fijadora de FK 12 (FKBP12), para crear un complejo que une a la calcineurina inhibiendo la actividad fosfatasa de ésta con una potencia alrededor de cien veces mayor que la de la ciclosporina. Como consecuencia, se bloquea la defosforilación del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) y su translocación al núcleo celular del linfocito T, con lo que se bloquea la expresión de los genes de citocinas tales como interleucina 2 (IL-2) e interferón gama. Además, tacrolimus inhibe la fosforilación de la proteína I κ B (la cual normalmente está unida a otro factor nuclear, NF- κ B, manteniéndolo inhibido y evitando su translocación al núcleo), con lo que impide la disociación de I κ B y NF- κ B, y bloquea la translocación al núcleo de NF- κ B. Como resultado global, el tacrolimus inhibe la transcripción de varios genes y esto desemboca en la inhibición de la síntesis de diferentes citocinas, principalmente la IL-2, así como la IL-3, IL-4, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el interferón γ . El bloqueo de estas citocinas resulta clave en la inhibición de la activación de las células T y, por lo tanto, de la respuesta inmunitaria dependiente. [6-8, 10-13].

1.3.2. Farmacocinética

1.3.2.1. Absorción

El tacrolimus puede encontrarse en formulaciones intravenosa, oral o tópica (ungüento), pero para su uso en el tratamiento o prevención de rechazo de injertos normalmente se opta por la formulación oral. El tacrolimus es un fármaco altamente lipofílico y esto contribuye a su muy variable absorción y es ésta la razón de que este fármaco requiera un metabolismo extenso antes de su depuración del cuerpo. Además la absorción se ve influenciada por la motilidad gastrointestinal [13, 14]. Generalmente, la biodisponibilidad es pobre de un promedio de aproximadamente 25%, pero puede oscilar de un 5% a 93% y en pacientes pediátricos se ha reportado una biodisponibilidad promedio de hasta 18.6% \pm 13.7 con un rango de 5.1 a 26.6% [15]. La biodisponibilidad se ve reducida en presencia de alimentos, por esto se recomienda administrar en forma consistente ya sea en ayunas o con el mismo tipo de alimentos [13]. El tacrolimus tiene un índice terapéutico estrecho de entre 5 a 10 ng/ml [16]. En función del tiempo tras un trasplante de riñón el índice terapéutico se ha reportado de 10-15 ng/ml dentro de los meses 1-6, de 8-12 ng/ml dentro de los meses 6-12, y de 5-10 ng/ml después de los 12 meses post-trasplante [17]. Además muestra amplia variación entre individuos en las concentraciones en sangre alcanzadas con una misma dosis. Los factores reportados a influir la farmacocinética de los inhibidores de la calcineurina incluyen el tipo de trasplante (riñón, hígado, corazón, etc.), la función hepática y renal, el uso de medicamentos concomitantes tales como corticoesteroides, el tiempo post-operatorio, edad y raza del paciente, hematocrito y concentraciones de albúmina, ingesta de alimentos y niveles de expresión de enzimas CYP3A y glicoproteína P [18].

1.3.2.2. Distribución

El tacrolimus se distribuye en la mayoría de los tejidos. Atraviesa la placenta y se puede incluso llegar a encontrar en la leche materna en niveles similares a los reportados en plasma. En sangre, el tacrolimus se une en mayor parte a los glóbulos rojos y, en el plasma, más del 98% se une a proteínas plasmáticas, fundamentalmente a la albúmina y a la α_1 -glicoproteína [12, 13].

1.3.2.3. Metabolismo

Los citocromos CYP3A4 y CYP3A5 son las principales enzimas responsables del metabolismo del tacrolimus, siendo la hidroxilación y desmetilación las principales rutas metabólicas. La proteína funcional CYP3A4 se encuentra en hígado e intestino delgado de todos los individuos, pero solo algunos individuos expresan niveles significativamente altos de la proteína funcional CYP3A5. Ésta se encuentra en hígado, intestino delgado y riñones de expresadores de CYP3A5 [13, 18].

La glicoproteína P es un transportador de eflujo dependiente de adenosin trifosfato localizado sobre la membrana externa de varios tipos de células entre ellas los hepatocitos y células epiteliales de los enterocitos del intestino. Debido a su localización anatómica este transportador ayuda a proteger al cuerpo contra xenobióticos tóxicos, pero también actúa contra algunos fármacos como el tacrolimus, por medio de excreción activa de estos compuestos fuera de las células y dentro del lumen intestinal, la bilis y orina, previniendo que alcancen el torrente sanguíneo [18].

1.3.2.4. Eliminación

Se han detectado por lo menos 15 metabolitos producto de la degradación del tacrolimus, siendo los principales el 13-O-desmetil y 15-O-desmetil tacrolimus; de ellos más del 95% son eliminados por la ruta biliar, mientras que la excreción urinaria aporta un promedio de 2.4% de la eliminación del tacrolimus. La semivida de eliminación varía de 12-19 horas, aunque hay quienes la han reportado de 12-35 horas [12, 13, 15].

1.3.3. Farmacocinética en pacientes pediátricos

De acuerdo al NAPRTCS, en USA en 2010 tacrolimus se utilizó en 47% de los trasplantes renales de pacientes pediátricos y su uso como inmunosupresión primaria incrementó de 6% en 1996 a 74% en 2009, además se ha visto una reducción en la tasa de rechazo agudo en pacientes de 6-12 años de edad donde se reportó una tasa de rechazo en trasplantes de donador vivo de 1.36 y de 1.58 en trasplantes de donador fallecido en el periodo del año 1987-1995, mientras que para el periodo de 1996-2010 estas tasas de rechazo disminuyeron a 0.47 y 0.62 respectivamente [9], lo que sugiere que el aumento en el uso de tacrolimus está relacionado con una disminución en la incidencia de rechazo agudo.

La mayoría de los datos farmacocinéticos de estudios reportados muestran una variabilidad más grande en la población pediátrica comparada con adultos. Una posible explicación podría ser la diversidad de edades entre las poblaciones pediátricas estudiadas, lo cual podría contribuir a las variaciones importantes en los parámetros farmacocinéticos y en los requerimientos de dosificación, así también cambios en varios parámetros fisiológicos en desarrollo pueden tener impacto en la disposición del fármaco (ej. pH gástrico, tiempo de vaciamiento gástrico, tiempo de tránsito intestinal, grasa corporal y composición de agua, y niveles de proteínas en plasma); [19].

Las rutas oxidativas catalizadas por el sistema enzimático del citocromo P 450 están inmaduras durante los primeros meses de vida y necesitan de 6 a 12 meses para alcanzar una actividad metabólica importante, la cual a esa edad podría ser más alta que el promedio de actividad en los adultos. Esta maduración gradual de la actividad de numerosos sistemas enzimáticos durante los primeros meses de vida contribuye significativamente a la gran variabilidad interindividual en la velocidad de eliminación en pacientes pediátricos de diferentes edades [13].

En general, la depuración de tacrolimus en niños es cerca de dos veces más rápida y el volumen de distribución (V) hasta 1.8 veces más alto, comparados con los mismos parámetros en adultos [19], lo que explica las diferencias en las dosis administradas, siendo más altas las de niños respecto a las de adultos para alcanzar concentraciones en sangre comparables.

1.3.4. Reacciones adversas

Los principales efectos adversos asociados con tacrolimus incluyen nefrotoxicidad, neurotoxicidad, diabetogénesis, trastornos gastrointestinales, hipertensión, infecciones y complicaciones malignas [15]. Además pueden presentar una amplia variedad de efectos adversos como: alteración isquémica de arterias coronarias, anemia, leucopenia, dolor de cabeza, diarrea, náusea, vómitos, úlcera gastrointestinal, dolor gastrointestinal y abdominal, hiperglucemia, hiperpotasemia; hipomagnesemia, hipofosfatemia, hipopotasemia, hipocalcemia, hiperuricemia, acidosis metabólica, hiperlipemia, entre otros más [20].

Los eventos adversos tienden a ocurrir más frecuentemente en los primeros meses después del trasplante y a declinar a partir de entonces en relación con las reducciones de las concentraciones de tacrolimus. La nefrotoxicidad, neurotoxicidad, diabetogénesis, trastornos gastrointestinales e infecciones ocurren

más frecuentemente o son más severos en concentraciones más altas. Otras reacciones (por ej. la disartria) parecen requerir de factores múltiples para emerger y, por lo tanto, son insensibles a la reducción de la concentración [15].

1.3.5. Interacciones con otros fármacos

La mayoría de los reportes de interacciones con tacrolimus se reportan de observaciones en adultos y muy pocos en pacientes pediátricos. Se han reportado un gran número de fármacos que pueden incrementar o disminuir las concentraciones en sangre de tacrolimus, entre los principales que las aumentan están: alopurinol, ciclosporina, claritromicina, clotrimazol, danazol, diltiazem, eritromicina, fluconazol, itraconazol, ketoconazol, lanzoprazol, metoclopramida, nifedipino, omeprazol, verapamilo, entre otros. Dentro de los principales fármacos reportados que disminuyen los niveles de tacrolimus están: antiácidos, bicarbonato de sodio, glucocorticoides, carbamazepina, fenitoína, fenobarbital, óxido de magnesio, primidona, rifampicina [19, 21].

También pueden ocurrir interacciones farmacodinámicas que afectan la función renal, éstas pueden presentarse con algunos fármacos administrados de forma concomitante al tacrolimus y, que se han reportado como causa de nefrotoxicidad aumentada, ejemplo de éstos fármacos son: amfotericina B, aminoglucósidos, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina [19].

En cuanto a interacciones de tacrolimus en las que éste afecta a otros fármacos se ha relacionado al tacrolimus con un posible efecto inhibitorio sobre el metabolismo del ácido micofenólico resultando en niveles aumentados de éste último [19].

1.3.6. Farmacogenética del tacrolimus

La farmacogenética investiga los factores genéticos que influyen en la respuesta de un fármaco en un paciente individual y que pueden ser útiles para predecir la dosis inicial requerida, identificando a los pacientes con un riesgo incrementado de presentar efectos adversos y ajustando la terapia de mantenimiento. Los polimorfismos de un solo nucleótido (o SNP por sus siglas en inglés) son variantes comunes de un gen y consisten en alteraciones de un solo nucleótido en la secuencia de el gen, tales alteraciones pueden reflejar cambios en la expresión o en la función de las proteínas codificadas por dicho gen; por ejemplo algunos SNPs de los genes que codifican enzimas metabolizadoras y transportadores de fármacos resultan en una actividad incrementada o disminuida de la proteína codificada [22], y como consecuencia pueden producir un metabolismo y concentraciones del fármaco alterados para los individuos portadores de tales polimorfismos.

La expresión atípica de CYP3A4, CYP3A5, y la glicoproteína P es uno de los factores responsables de la alta variabilidad en el comportamiento farmacocinético de los inhibidores de la calcineurina como el tacrolimus. Esto es parcialmente el resultado de SNPs de los genes que codifican estas enzimas y el transportador de fármacos.

El SNP más estudiado del *CYP3A4* es conocido como *CYP3A4* -392A>G, y el alelo variante resultado de este polimorfismo como *CYP3A4**1B, mientras que el alelo silvestre se conoce como *CYP3A4**1. La expresión de *CYP3A4**1B lleva a una actividad transcripcional aumentada de *CYP3A4* y a encontrar niveles más altos de esta proteína. El alelo *CYP3A4**1B está presente en aproximadamente 2-9.6% de los individuos caucásicos, 35-67% de africanos, 9.3-11% de hispanos y 0% de asiáticos. Aunque existen muy pocos estudios que reportan la asociación entre *CYP3A4**1B y la farmacocinética de tacrolimus algunos datos muestran que los individuos portadores de *CYP3A4**1B requieren de dosis más grandes de tacrolimus

para alcanzar las concentraciones en sangre deseadas comparados con los homocigotos de *CYP3A4**1 [18, 23].

CYP3A5 6986A>G es el SNP más estudiado referente al *CYP3A5*, al alelo variante producto de dicho polimorfismo se le conoce como *CYP3A5**3 mientras que al alelo silvestre se le refiere como *CYP3A5**1. Los portadores heterocigotos u homocigotos de *CYP3A5**1 se dice que son expresadores de la proteína funcional *CYP3A5*, y los portadores homocigotos del alelo variante *CYP3A5**3 tienen un codón de paro prematuro y producen niveles muy bajos o indetectables de la proteína funcional *CYP3A5* por lo que se dice que son no expresadores de *CYP3A5* [18]. Por lo tanto, los individuos portadores del alelo variante presentan una capacidad metabólica más baja. El alelo *CYP3A5**1 se encuentra en aproximadamente 5-15% de individuos caucásicos, 45-73% de afroamericanos, 15-35% de asiáticos y 25% de mexicanos [18]. Algunos estudios han reportado que las concentraciones de tacrolimus son mucho más altas en sujetos con el alelo *CYP3A5**3/*3 que en sujetos con el alelo *1/*1 ó *1/*3 [24], así mismo otros estudios han confirmado el impacto del polimorfismo *CYP3A5**1/*3 sobre la farmacocinética de tacrolimus reportando una depuración de 25-40% más grande y niveles en sangre hasta 3 veces más bajos en portadores del alelo silvestre *CYP3A5**1, muchos de estos estudios se realizaron en pacientes de trasplante renal con un seguimiento temporal de hasta 1 año [22].

Con respecto a la glicoproteína P se sabe que este transportador de eflujo es codificado por el gen *ABCB1* también conocido como *MDR1* (gen de resistencia a múltiples fármacos, por sus siglas en inglés), y tres polimorfismos principalmente han sido asociados con la variabilidad entre sujetos en la expresión de esta proteína, tales polimorfismos son *ABCB1* 1236C>T en el exón 12, *ABCB1* 2677G>T/A en el exón 21, y *ABCB1* 3435C>T en el exón 26; y a los alelos variantes resultantes de estos polimorfismos se conocen como *ABCB1* 1236T, 2677T/A, y 3435T, respectivamente, mientras que los alelos silvestres son *ABCB1* 1236C, 2677G, y 3435C, respectivamente. El haplotipo variante *ABCB1* 1236T-2677T-3435T (T-T-T) se encuentra en aproximadamente 32% de caucásicos, 5% de afroamericanos, 27%

de asiático-americanos y 35% de México-americanos. En teoría los polimorfismos de *ABCB1* resultan en disminución en la expresión de la glicoproteína P, lo que llevaría a tener niveles en sangre de tacrolimus mayores y un requerimiento de dosis más bajo en los individuos portadores de los alelos variantes. Pero aún es controversial la asociación de los polimorfismos de *ABCB1* con la variabilidad de los niveles en sangre de tacrolimus, ya que mientras algunos estudios han reportado niveles de tacrolimus más altos en portadores del alelo 2677T, del 3435T o del 1236T comparados con pacientes de trasplante que fueron homocigotos de los alelos silvestres 2677GG, 3435CC, o 1236CC respectivamente, otros estudios no han mostrado correlación entre los polimorfismos y las diferencias en las concentraciones de tacrolimus, y más bien atribuyen una importancia mayor para tal variación al polimorfismo de *CYP3A5* [15, 18, 22, 24].

1.4. Farmacocinética poblacional y modelado

La farmacocinética poblacional es una herramienta que permite estudiar las características básicas de la disposición de los fármacos en una población que juega un papel importante en la farmacología clínica y en el desarrollo de fármacos nuevos. La farmacocinética poblacional considera los parámetros farmacocinéticos de una población particular, así como la variabilidad inter e intraindividual a diferencia de la farmacocinética convencional para la cual una de sus limitaciones es un análisis de datos básico, sin tomar en cuenta la variabilidad individual que permita un análisis más amplio y diverso [25].

Un modelo es la relación entre los valores observados (ej. concentraciones plasmáticas) y todos aquellos factores que afectan a dicho valor (ej. función renal, hepática etc.). Los modelos farmacocinéticos de población se utilizan para almacenar nuestra experiencia sobre el comportamiento de un fármaco en un cierto grupo de individuos o población. Proporciona una guía inicial para desarrollar regímenes de dosificación de fármacos con el fin de alcanzar y mantener una

determinada concentración plasmática en cada paciente. Si se conocen los parámetros apropiados, podremos aplicar una ecuación farmacocinética para predecir la concentración de fármaco en un determinado compartimento tras la administración de determinada dosis y forma de administración. Cuando se quiere generalizar una ecuación farmacocinética para que esta sea aplicable a un gran número de pacientes, debe tenerse en cuenta la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos. Los parámetros poblacionales de un modelo de población se dividen en parámetros de efecto fijo, por ej. los valores medios de los parámetros farmacocinéticos; y parámetros de efecto aleatorio estos cuantifican la magnitud típica de la variabilidad cinética interindividual y la magnitud típica de la variabilidad residual como resultado de la variabilidad aleatoria intraindividual, errores de la técnica analítica, en la extracción de la muestra, así como el valor asociado a la elección del modelo (inexactitud del modelo).

Los aspectos fundamentales para el diseño de regímenes de dosificación en un paciente son las características de población que incluyen: 1) los valores medios de los parámetros, 2) la relación cuantitativa con las características fisiológicas del individuo (ej. peso, función renal, etc.) y, 3) su variabilidad entre la población de pacientes [26].

1.4.1. Modelado no lineal de efectos mixtos

Existen varios métodos para estimar los parámetros farmacocinéticos de una población. Algunos métodos toman los datos de todos los individuos y los fusionan como si se tratase de un único individuo y sobre este “paciente poblacional” se estiman los parámetros farmacocinéticos, otros métodos estiman en primer lugar los parámetros farmacocinéticos de cada individuo y, a partir de aquí, los de la población, existen también los métodos que no precisan de la estimación preliminar de parámetros individuales y, en los cuales la estimación se realiza en una sola etapa. Dentro éste último tipo de métodos, se encuentra el modelado no lineal de

efectos mixtos (NONMEM). A diferencia de otros métodos en éste el total de la población, incluso cuando solo existe un dato por individuo, casi siempre suministra suficientes datos para realizar estimaciones.

NONMEM permite la estimación directa de los parámetros poblacionales en una sola etapa analizando simultáneamente los datos provenientes de varios individuos, para lo cual emplea el método extendido de mínimos cuadrados. Los parámetros poblacionales del modelo se dividen en parámetros de efectos fijos y parámetros de efectos aleatorios [26].

1.4.2. Estudios farmacocinéticos poblacionales de tacrolimus

Se han realizado algunos estudios de modelado farmacocinético poblacional de tacrolimus en pacientes de trasplante de órganos, en general hasta el 2004 era pequeño el número de estudios reportados, hoy en día se sabe que éste ha aumentado, en la tabla 4 podemos ver un resumen de algunos de estos estudios y de los parámetros farmacocinéticos que estimaron, además se puede notar que la mayoría se realizó en pacientes adultos de trasplante de hígado, una menor parte en adultos con trasplante de riñón, y solo uno en pacientes pediátricos de trasplante de riñón. Existen varios modelos poblacionales de tacrolimus en los que una parte importante de la variabilidad cinética interindividual y del error aleatorio residual ha permanecido sin explicación, y en algunos incluso se ha observado un grado alto de imprecisión [15]. Se han realizado estudios más recientes en los que se estimaron parámetros farmacocinéticos poblacionales como la depuración, volumen de distribución y biodisponibilidad del tacrolimus, y en los que covariables como la fracción de hematocrito y la dosis de corticoesteroide tuvieron influencia significativa sobre la depuración y podrían ser importantes para el ajuste de la dosis [27, 28]. No obstante que se haya mejorado la precisión de los modelos, a excepción de algunos estudios recientes, la mayor parte se ha realizado en pacientes adultos y no tomaron en cuenta como covariables a evaluar la expresión de los genes *CYP3A* y de la

glicoproteína P, o el tipo de formulación de tacrolimus administrada lo cual podría mejorar el resultado del modelado.

Tabla 4. Resumen de análisis poblacionales y modelado de la farmacocinética de tacrolimus.

Tipo de trasplante	Etnicidad	Tipo de población	Parámetros farmacocinéticos medidos	Año	Referencia
Hígado	China, malaya, india	Pediátrica	CL(L/h) = 1.46*[1+0.339*(edad - 2.25)] V (L) = 39.1*[1+4.57*(BSA - 0.49)] F (%) = 0.197*[1+0.0887*(WT - 11.4)]; si BILI < 200µmol/L F (%) = 0.197*[1+0.0887*(WT - 11.4)] *[1.61]; si BILI ≥ 200µmol/L	2000	[29]
Hígado	Japonesa	Adulta	CL (L/h) = (0.737+0.134*POD) *0.728 ^{HF} *0.809 ^{RF} *HW/600	2001	[30]
Hígado	Española	Pediátrica	CL (L/h) = 10.4(WT/70) ^{3/4} *e ^{-0.00032 T} *e ^{-0.057 BILI} * (1 - 0.079 ALT)	2001	[31]
Hígado	Australiana	Pediátrica	CL/F hígado completo (L/h) = 44 CL/F hígado de disección (L/h) = 5.75 V/F (L) = 617	2001	[32]
Células hematopoyéticas	Estadounidense	Adulta	CL (L/h) = 5.22 CL (L/h) = 0.797; si BILI 2 -9.9mg/dl CL (L/h) = 0.581; si BILI ≥ 10mg/dl CL (L/h) = 0.587; si SCr ≥ 2.0mg/dl CL (L/h) = 0.814; si hay GVHD grado III y IV, y VOD F(%) = 28	2001	[33]
Riñón	Australiana	Adulta	CL/F (L/h) = 31.8; si HCT < 0.33 CL/F (L/h) = 24.2; si HCT > 0.33 V/F (L) = 2080	2002	[34]
Hígado	Australiana	Pediátrica	CL/F hígado completo (L/h) = 16.31 CL/F hígado de disección (L/h) = 8.51 V/F (L) = 565 CL/F ^a (L/h) = 8.31 V/F ^a (L) = 155 CL/F ^b hígado completo (L/h) = 17.9±8.8 CL/F ^b hígado de disección (L/h) = 11.6±8.8 V/F ^b (L) = 712±792 CL/F ^c hígado completo (L/h) = 12.8±3.5 CL/F ^c hígado de disección (L/h) = 8.2±3.4 V/F ^c (L) = 221±164	2002	[35]
Hígado	Japonesa	Adulta	CL ^d (L/h) = (0.737+0.0134*POD)*0.728 ^{HF} * 0.809 ^{RF} * HW/600 V ^d (L/kg) = 1.52 F ^d (%) = 6.77 CL ^e (L/h) = 0.0541*WT V ^e (L/kg) = 0.906 F ^e (%) = 25	2003	[36]

Hígado	Australiana	Adulta	CL/F ^b (L/h) = 26.5±8.2 V/F ^b (L) = 399±185	2003	[37]
Pulmón	Francesa	Adulta	ABC ₁₂ (µg*h/L) = 182.3±48.2, pacientes con CF C _{max} (µ/L) = 31.9±16.9, pacientes con CF t _{max} (h) = 1.5±0.6, pacientes con CF ABC ₁₂ (µg*h/L) = 184.0±55.1, pacientes sin CF C _{max} (µ/L) = 33.1±15.0, pacientes sin CF t _{max} (h) = 1.4±0.7, pacientes sin CF	2005	[38]
Hígado	-	Adulta	CL/F (L/h) = 21.3 V/F (L) = 316.1	2005	[39]
Hígado	Francesa	Adulta	CL _{max} = 36 TCL ₅₀ (días) = 6.3 V (L) = 1870	2005	[40]
Hígado	Coreana	Adulta	CL/F (L/kg/h) = 0.36 V/F (L) = 568	2006	[41]
Hígado	Japonesa	Pediátrica	CL/F = disminuyó cuando AST fue elevada, o incremento linealmente al tiempo postoperatorio, pero no cambió después del día 21. Incrementó 2 veces en receptores de injerto cuyo genotipo fue CYP3A5*1 en comparación de portadores de genotipo CYP3A5*3/*3 hepático.	2006	[42]
Hígado	Asiática	Adulta y pediátrica	CL _B /F (L/h) = 14.1 V _B /F (L) = 217 CL _P /F (L/h) = 537 V _P /F (L/h) = 563	2006	[10]
Hígado	Australiana	Adulta	ABC ₁₂ (µg*h/L) = 0.469, en pacientes con hipertensión ABC ₁₂ (µg*h/L) = 0.143, en pacientes con hipercalemia ABC ₁₂ (µg*h/L) = 0.351, en pacientes hiperglicemia	2006	[43]
Riñón	Francesa	Adulta	CL _{min} (L/h) = 1.81±0.22 CL _{max} (L/h) = 5.55 TCL ₅₀ (días) = 3.81±0.53 V (L/kg) = 98.4±13.1 F (%) = 17.3±1.57	2007	[27]
Hígado	China	Adulta	CL/F (L/h) = 22.1, modelo PK CL/F (L/h) = 15.9, modelo PK/PG k _a (h ⁻¹) = 4.48, (valor fijado)	2007	[44]
Riñón	China	Adulta	CL/F (L/h) = 21.7 V/F (L) = 241	2008	[45]
Riñón	-	Pediátrica	CL/F = más alta con nivel HCT bajo CL/F = más baja en pacientes CYP3A5*3/*3	2009	[46]
Riñón	Francesa	Adulta	CL/F (L/h) = 28±4; HCT y PXR-25385C>T SNP influenciaron a CL/F, pero solo HCT se retuvo en el modelo	2009	[28]

			final debido a que permitió una estimación más exacta, HCT correlacionó inversamente con CL/F		
Riñón	Francesa	Adulta	CL/F = 2 veces más alta en expresadores (<i>CYP3A5</i> *1/*1 y <i>CYP3A5</i> *1/*3) que en no expresadores (<i>CYP3A5</i> *3/*3) de <i>CYP3A5</i>	2010	[47]
Riñón	Francesa	Adulta	CL/F = 2 veces más alta en pacientes <i>CYP3A5</i> *1/*3 y <i>CYP3A5</i> *1/*1 (42 L/h) que <i>CYP3A5</i> *3/*3 (21 L/h). HCT correlacionó inversamente con CL/F	2011	[48]

ALT = alanino aminotransferasa; **AST** = alanino aminotransferasa; **ABC₁₂** = área bajo la curva concentración-tiempo de 0 a 12 h; **BILI** = bilirrubina total; **BSA** = área de superficie corporal; **C_{max}** = concentración de fármaco en sangre máxima; **CF** = fibrosis cística; **CL** = depuración; **CL_{max}** = valor máximo de depuración; **CL_{min}** = valor mínimo de depuración; **CL/F** = depuración aparente; **CL_B/F** = depuración aparente basada en las concentraciones de sangre total; **CL_P/F** = depuración aparente basada en las concentraciones en plasma; **CYP3A5*1/*1** = genotipo homocigótico del alelo silvestre de *CYP3A5*; **CYP3A5*1/*3** = genotipo heterocigótico de los alelos silvestre/variante de *CYP3A5*; **CYP3A5*3/*3** = genotipo homocigótico del alelo variante de *CYP3A5*; **F** = biodisponibilidad; **GVHD** = enfermedad del injerto contra el huésped; **HCT** = hematocrito; **HF** = función hepática; **HW** = peso hepático; **k_a** = constante de absorción; **PG** = farmacogenético; **PK** = farmacocinético; **POD** = días postoperatorios; **PXR-25385C>T SNP** = polimorfismo del gen *PXR*; **RF** = función renal; **SCr** = creatinina en suero; **t_{max}** = tiempo para alcanzar C_{max}; **TCL₅₀** = tiempo para obtener 50% de CL_{max}; **V** = volumen de distribución; **V/F** = volumen de distribución aparente; **V_B/F** = volumen de distribución aparente basado en las concentraciones de sangre total; **V_P/F** = volumen de distribución aparente basado en las concentraciones en plasma; **VOD** = enfermedad veno-oclusiva; **WT** = peso corporal

^a = promedios de estimados en P-PFARM

^b = estimados de parámetros bayesianos individuales en NONMEM

^c = estimados de parámetros bayesianos individuales en P-PHARM

^d = descrito previamente por Fukatsu et al.

^e = descrito previamente por Jusko et al.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México en el año 2011 hubo cerca de 8100 pacientes en espera de un trasplante renal, de los cuales, únicamente 2100 trasplantes se llevaron a cabo, además en el 2012 se realizaron 2361 trasplantes de riñón y en el 2013 fueron reportados 1958 trasplantes renales hasta el tercer trimestre de ese año [2, 5]. Pese al éxito de tacrolimus como terapia inmunosupresora en pacientes de trasplante sigue existiendo complejidad al tratar de implementar de manera adecuada terapias inmunosupresoras con este fármaco ya que es considerado potencialmente peligroso al mostrar una ventana terapéutica estrecha, por lo que en la actualidad

el monitoreo terapéutico de tacrolimus es necesario y se lleva a cabo midiendo las concentraciones mínimas también conocidas como niveles en valle; sin embargo, esto ha sido cuestionado al presentarse algunos casos de toxicidad y rechazo aun cuando las concentraciones mínimas estaban dentro del límite considerado como aceptable [13].

En los pacientes de trasplante renal los mayores riesgos de no contar con una óptima dosificación de tacrolimus (y por lo tanto no alcanzar los niveles terapéuticos del inmunosupresor o sobrepasar éstos), son que sufran rechazo del injerto, y/o presentar efectos adversos graves como nefrotoxicidad.

3. JUSTIFICACIÓN

El tacrolimus es uno de los fármacos inmunosupresores más usados para prevenir el rechazo en la terapia administrada a pacientes de trasplante de órganos incluyendo el de riñón. Pero debido a sus inconvenientes al momento de administrarlo (baja biodisponibilidad, un índice terapéutico estrecho, elucidación de variabilidad amplia entre individuos en sus concentraciones en sangre aun con una misma dosis) incluyendo eventos de rechazo de injerto o efectos adversos aun cuando se realiza monitoreo terapéutico, se eleva la importancia de tratar de optimizar su dosificación e intentar disminuir en la medida de lo posible la incidencia de rechazo del injerto y/o de efectos adversos debidos al fármaco. Esto podría lograrse creando un modelo farmacocinético adecuado de tacrolimus que explique con mayor precisión su variabilidad entre individuos, y ayude al desarrollo de un mejor régimen de dosificación; mediante el uso de herramientas computacionales de análisis farmacocinético poblacional, como NONMEM.

4. OBJETIVO

Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional de tacrolimus en pacientes pediátricos mexicanos de trasplante de riñón que explique con mayor precisión la farmacocinética tan variable de este fármaco en estos individuos, y el cual ayude a crear un régimen de dosificación mejor y más confiable para los pacientes.

4.1. Objetivos específicos

- Crear una base de datos que contenga la información demográfica, biológica, farmacogenética, así como de las concentraciones en sangre de tacrolimus, y de la terapia inmunosupresora y medicamentos concomitantemente administrados, de pacientes pediátricos de trasplante de riñón; la cual sirviera para realizar el análisis poblacional.
- Realizar el análisis de los datos y probar distintos modelos estructurales.
- Elegir el modelo que se ajuste más a los datos de los pacientes y muestre las mejores estimaciones de los parámetros farmacocinéticos poblacionales, como modelo base.
- Buscar y seleccionar posibles covariables con efecto significativo sobre el modelo y probar algunas que se han reportado en la literatura con influencia importante en las concentraciones en sangre y dosificación de tacrolimus, como el genotipo de *CYP3A5*.
- Construir el modelo covariable final.

- Evaluar el modelo final
- Diseñar un descriptor basado en el modelo final que ayude a optimizar la dosis de tacrolimus

5. HIPÓTESIS

El análisis poblacional y modelado de los datos clínicos obtenidos de los pacientes cuya terapia incluye tacrolimus explicará mejor la farmacocinética de este inmunosupresor, y ayudará a diseñar un régimen de dosificación más adecuado.

6. METODOLOGÍA

6.1. *Pacientes y colección de datos*

Se realizó un análisis retrospectivo de los datos de 53 pacientes pediátricos del Hospital Infantil de México (HIM) Federico Gómez, con trasplante renal y con función renal estable que dentro de su régimen inmunosupresor estaban siendo tratados con tacrolimus y, a los se les realizó un estudio de perfil farmacocinético de concentración en sangre de tacrolimus vs. tiempo a 12 horas. El estudio fue conducido de acuerdo a los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, y fue aprobado por el Consejo de Revisión Institucional interno y el Comité de Ética. Consentimiento informado por escrito fue obtenido para todos los pacientes.

Los datos son de pacientes a los cuales el trasplante se les realizó entre los años del 2007 a 2009.

6.1.1. Esquemas de inmunosupresión y medicación

Los pacientes podían estar dentro de dos posibles grupos de terapia inmunosupresora a los cuales fueron agregados aleatoriamente, uno que incluyó el corticoesteroide prednisona y otro libre de esteroides; además de recibir tacrolimus y micofenolato de mofetilo como terapia de mantenimiento. Otros fármacos que recibieron fue basiliximab o daclizumab como terapia inductora y una variedad de fármacos administrados concomitantemente a la terapia de inmunosupresión y que dependió de la etiología presente en cada paciente y se modificó según la evolución del mismo. Tomando en cuenta lo anterior el esquema de inmunosupresión fue dividida en 2 grupos:

Grupo I terapia habitual (44 pacientes):

- Basiliximab Anti CD25: Dos dosis el día del trasplante y en el 4º día post operatorio.
- Mofetil micofenolato: 900mg/m²sc/día dividido en dos tomas.
- Metilprednisolona: 2 bolos de metilprednisolona 10 mg/kg (Días 1 y 2 del trasplante renal).
- Prednisona: Se inicia en 2o. día post-operatorio 2 mg/kg/día, con reducción progresiva de la dosis para a los seis meses tener una dosis de 0.12 a 0.15 mg/kg/día y se mantiene a largo plazo.
- Tacrolimus: La dosis se ajusta para alcanzar niveles en valle entre 5 y 10 ng/ml.

Grupo II sin esteroides (9 pacientes):

- Daclizumab Anti CD25: 2 mg/kg IV 4 horas antes del trasplante. Posteriormente dosis de 1mg/kg en las semanas 2, 4, 5, 6, 8, 11, 15, 19 y 23

para alcanzar una dosis acumulada de 10 mg/kg a los 6 meses post-trasplante.

- Mofetil micofenolato: 900 mg/m²sc/día dividido en dos tomas. Inicia el día del trasplante renal. La dosis se disminuye a 600 mg/m²sc a las dos semanas post-trasplante.
- Tacrolimus: Se inicia el día del trasplante a dosis de 0.15 mg/kg dividido cada 12 horas, la dosis se ajusta para alcanzar los siguientes niveles en valle según el tiempo post-trasplante: Semanas 1 y 2, 12-15 ng/ml; semanas 3-8, 10-12 ng/ml; semanas 9-12, 8-10 ng/ml; semanas 13-20, 5-7 ng/ml; más de 20 semanas, 3-5 ng/ml.

La dosis de la terapia inmunosupresora incluyendo la administración de tacrolimus se modificó según la evolución clínica de cada paciente pudiendo incluso llegar al retiro y/o sustitución del fármaco en caso de aparición de rechazo o toxicidad, además los pacientes que fueron de riesgo alto o intermedio para infección por CMV recibieron profilaxis con ganciclovir o valganciclovir por 100 días. Los pacientes que presentaron rechazo agudo corroborado por biopsia renal fueron tratados con tres bolos de metilprednisolona 10 mg/kg iv. En caso de pertenecer al grupo sin esteroides, no recibieron más esteroides después de los bolos.

La mayoría de los pacientes recibió el régimen inmunosupresor estandarizado que incluía tacrolimus, micofenolato de mofetilo y prednisona, y algunos otros recibieron el esquema de inmunosupresión sin esteroides (prednisona). Los pacientes recibieron las formulaciones de tacrolimus autorizadas por su proveedor de seguridad social, por lo tanto aunque al momento del estudio la mayoría de los pacientes estuvo recibiendo la formulación innovadora Prograf® (Janssen-Cilag, S.A. de C.V.) algunos pacientes pudieron estar tomando una de las formulaciones genéricas Framebin® (Laboratorios Pisa, S.A. de C.V.), Limustin® (Landsteiner Scientific, S.A. de C.V.) o Tenacrine® (Vitae Laboratorios, S.A. de C.V.), y en unos

cuantos pacientes no se tuvo la información acerca de la formulación que estaban recibiendo.

6.1.2. Seguimiento

Los periodos de seguimiento de los datos que se tienen de la evolución de los pacientes después del trasplante son de aproximadamente de 1 a 2 años, o dependiendo de la fecha en que se realizó el trasplante a cada paciente. Para esto, todos los pacientes fueron vigilados en la consulta externa de nefrología del HIM y se monitorearon diferentes características (cada vez que acudían a su consulta clínica en el hospital), desde demográficas como: estatura, peso, superficie corporal, edad; también clínicas y biológicas como: creatinina en sangre, examen general de orina, niveles de células hemáticas, valores de distintos electrolitos en sangre (ej. Na, K, etc.), así como descriptores de la función hepática (proteínas totales, albumina, etc.) entre otras; también se monitorizaron las concentraciones en sangre de tacrolimus, registrando las dosis prescritas de los demás fármacos administrados. La periodicidad de monitoreo fue: desde el día cero (el día del trasplante o antes), después aproximadamente cada semana los primeros dos meses, cada dos semanas del segundo al sexto mes, cada mes hasta los 12 meses, cada tres meses el segundo año del trasplante, pudiendo variar a lapsos de tiempo mayores o menores dependiendo de la programación de la consulta de cada paciente por los médicos o de si llegó a presentar alguna internación hospitalaria por distintas causas. Además se contó con datos de SNPs de *CYP3A5*, así como de *ABCB1*.

6.1.3. Perfiles farmacocinéticos y medición de tacrolimus

Los datos de los perfiles farmacocinéticos se obtuvieron de estudios realizados a 9 puntos. El paciente debía llegar antes de la hora de la toma de su dosis matutina de

tacrolimus, en ayunas y habiendo tomado la dosis de la noche de manera exacta. Se les midió peso y talla, y se registró dosis de tacrolimus y otros medicamentos que estuvieran tomando concomitantemente. Posteriormente se procedía a iniciar el estudio farmacocinético el cual consistió en colocar un catéter i.v. y tomar 9 muestras sanguíneas de 1 ml en un tubo Vacutainer® con 7.2 mg de K2EDTA (excepto en la predosis en la que se tomaron 3.5 mL), a los siguientes tiempos: 0 (predosis), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 12 horas después de su dosis diaria matutina de tacrolimus. Las muestras de sangre fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Las concentraciones de tacrolimus en sangre fueron medidas usando el inmunoensayo de micropartícula quimioluminiscente (chemiluminescent microparticle immunoassay CMIA) en un sistema ARCHITECT (Abbott-Laboratories; Abbott Park, IL, USA) de acuerdo a la información del fabricante y a metodología reportada en otros estudios [49].

6.1.4. Genotipificación de *CYP3A5* y *ABCB1*

Los datos de los genotipos de *CYP3A5* y *ABCB1* de los pacientes se obtuvieron de los resultados arrojados por varias técnicas empleadas como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (dHPLC) y secuenciación directa de DNA utilizando el secuenciador ABI Prism 310, realizadas por personal de laboratorio de investigación de nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, y como ha sido reportado previamente por García-Roca *et al* [49].

Se diseñaron oligonucleótidos cebadores o “primers” con el fin de flanquear los polimorfismos *CYP3A5*/*1/*3 (dbSNP: rs776746) y *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A y 3435C>T (dbSNP: exon 12 rs1128503, exon 21 rs2032582 and exon 26 rs1045642; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), usando las secuencias *CYP3A5* ENSG00000106258 y *ABCB1* (*MDR1*) ENSG0000085563 como referencia

(Ensembl release 65-Dec 2011© WTSI/EBI <http://www.ensembl.org/index.html>), y el programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). El ADN fue obtenido de células de sangre periférica usando el mini kit QIAamp DNA (Qiagen Hilden, Germany) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

La genotipificación de *CYP3A5*/*1/*3 y *ABCB1* (*MDR1*) 1236C>T, 2677G>T/A y 3435C>T se llevó a cabo por amplificación a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y una subsecuente secuenciación de ADN. La concentración de ADN fue medida usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). La reacción de secuenciación fue realizada usando un kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle (Life Technologies Corporation) y después fue purificada usando columnas Centri-Sep (Princeton, Separations, Inc., Foster City, CA), de acuerdo a especificaciones del proveedor. Las muestras purificadas fueron mezcladas con 15 ml de formamida Hi-Di (Life Technologies Corporation), incubada a 96°C por 2.5 minutos y enfriada a 4°C. El análisis fue hecho en un analizador genético ABI PRISM 310 (Life Technologies Corporation). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las de referencia con el fin de caracterizar el polimorfismo presente en cada paciente.

6.2. Modelado farmacocinético poblacional

Fueron analizadas 405 concentraciones de tacrolimus en sangre de 53 pacientes. Estos datos de concentraciones de tacrolimus en sangre total contra tiempo fueron descritos a través de aproximación poblacional con el programa de modelado no lineal de efectos mixtos NONMEM versión 7.2 (ICON Development Solutions) [50]. El método de estimación usado durante el modelado farmacocinético fue la estimación condicional de primer orden (FOCE) con la opción de interacción. Las concentraciones de tacrolimus en sangre fueron obtenidas en condiciones de estado estacionario después de administración oral previa cada 12 horas (h), esta

característica del estudio fue tomada en cuenta durante el análisis usando la opción SS=1 provista por NONMEM [50, 51].

6.2.1. Modelo base

Primero se probaron distintos modelos compartimentales para ajustar a los datos experimentales de concentración contra tiempo de los 53 pacientes y se seleccionó el que tuvo mejor ajuste. En base al modelo seleccionado se probaron los siguientes modelos estructurales los cuales varían entre si en el proceso de absorción: I). Absorción de primer orden con tiempo de latencia (t_{lag}), II). Absorción por compartimentos de tránsito, como se propuso por Savic *et al* [52], y el cual es un modelo que describe la absorción del fármaco como un proceso de pasos múltiples representados por una cadena de compartimentos presistémicos, sin asignar una correlación física a cada compartimento de tránsito, y donde el número de compartimentos de tránsito óptimo es estimado. Se usaron las subrutinas ADVAN2 TRANS2, ADVAN4 TRANS4, y ADVAN6 dependiendo del modelo a probar.

Los parámetros farmacocinéticos que se estimaron fueron los parámetros de absorción, el volumen de distribución aparente del compartimento central (V/F), el volumen de distribución aparente del compartimento periférico (V_T/F), depuración oral aparente (CL/F) y depuración aparente intercompartimental (Q/F) después de administración oral.

La variabilidad interindividual (VII) fue descrita usando un modelo exponencial (ecuación 1) y se probó en los distintos parámetros como por ejemplo:

$$CL/F_i = CL/F_{pop} \cdot \exp(\eta_i) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde CL/F_i es la depuración de tacrolimus para el individuo i , CL/F_{pop} es el valor poblacional o valor típico en la población para la depuración de tacrolimus, η_i es el

cambio de CL/F para el individuo i con respecto al valor típico poblacional (efecto aleatorio individual) el cual es una variable asumida a ser simétricamente distribuida alrededor de cero y con una varianza de ω^2 , y una matriz varianza-covarianza Ω con elementos diagonales $\omega^2_1, \dots, \omega^2_m$, donde m es el número de parámetros farmacocinéticos estimados en el modelo.

Se probaron distintos modelos de error para describir la variabilidad residual, por ejemplo un modelo de error aditivo como el que se muestra a continuación:

$$OBS_{ij} = C_{PREDij} + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde OBS_{ij} y C_{PREDij} representan la concentración de tacrolimus en sangre j en el individuo i , observada y predicha respectivamente, ε_{ij} es el cambio residual de la observación con respecto a la predicción del modelo, el cual es una variable aleatoria asumida a ser simétricamente distribuida alrededor de cero con una varianza denotada por σ^2 .

La construcción del modelo se llevó a cabo paso a paso como se ha reportado en la literatura [50, 53-55] y, la discriminación y selección del modelo fue vía comparación del valor de la función objetivo (OFV) calculado por NONMEM, así como de gráficas de bondad de ajuste donde se observan elementos básicos de exploración gráfica como concentraciones observadas (OBS, o variable dependiente en NONMEM) y sus predicciones típicas poblacionales (PRED) y predicciones individuales (IPRED), residuales ponderados condicionales asociados con las predicciones poblacionales (CWRES) y residuales ponderados asociados con las predicciones individuales (IWRES). La diferencia entre los valores de la función objetivo entre dos modelos es aproximadamente chi cuadrada (χ^2) distribuida y diferencias más grandes de 3.8 y 6.0 puntos (1 y 2 grados de libertad respectivamente) son significativos al nivel de 5% ($p < 0.05$). También se tomó en

cuenta la precisión de estimados de los parámetros del modelo en base al error estándar proporcionado por NONMEM.

Para seleccionar a los individuos que tuvieron el mejor, mediano y peor ajuste, se calculó el error de desempeño medio absoluto (mean absolute performance error) para cada individuo [56]. El error de desempeño se calculó como sigue:

$$100 \times (C_{pred} - C_{obs})/C_{obs}$$

Donde C_{pred} y C_{obs} representan las concentraciones de tacrolimus predicha y observada, respectivamente.

6.2.2. Selección de covariables y modelo final

La búsqueda y selección de covariables se llevó a cabo como parte del análisis farmacocinético poblacional [57-59] usando el método de construcción del modelo covariable paso a paso (Stepwise Covariate Model-building, SCM). Primero se obtuvo un modelo libre de covariables (base), se investigaron gráficamente la influencia de las covariables sobre los parámetros farmacocinéticos individuales estimados en el modelo base y se identificaron las posibles covariables que podrían resultar con un efecto significativo en el modelo. En la primer etapa del SCM se probó la inclusión de las covariables una a una (etapa de inclusión hacia adelante, forward inclusión step), así todas las covariables que mostraron un efecto significativo en la inclusión fueron agregadas simultáneamente dentro de un modelo intermedio. Después en la siguiente etapa del método SCM cada covariable fue independientemente removida una a una del modelo intermedio para confirmar su significancia (etapa de eliminación hacia atrás, backward deletion step), manteniéndose en el modelo final solo aquellas covariables que mostraron ser estadísticamente significativas después de las 2 etapas. El nivel mínimo de significancia estadística durante la inclusión hacia adelante se estableció como $p < 0.01$ (correspondiente a una disminución en OFV de al menos 6.63 puntos para 1 grado de libertad). Y durante la eliminación hacia atrás el mínimo de significancia

fue $p < 0.001$ (un aumento de al menos 10.83 puntos en OFV para 1 gl), esta etapa tuvo un criterio estadístico más estricto para mantener una covariable en el modelo final. También se tomó en cuenta la mejora en la precisión de la estimación de los parámetros farmacocinéticos (error estándar), cambios en los valores de los parámetros, y reducción en la VII y en la variabilidad residual, para establecer la relevancia clínica de una covariable y mantenerla en el modelo final.

6.2.3. Validación

La precisión y robustez del modelo se evaluó usando simulaciones a través de las revisiones predictivas visuales (visual predictive checks, VPCs, o predicted-corrected visual predictive check, pcVPC), revisiones predictivas numéricas (numerical predictive checks, NPCs), así como con el método de validación interna bootstrap. Para los VPCs fueron simuladas en NONMEM 1000 bases de datos, usando el modelo obtenido previamente para simular las concentraciones del fármaco esperadas. De las concentraciones simuladas se calculó la mediana y fueron generados intervalos de predicción de 97.5%. Después a los datos de las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas (o reales) se superpusieron la mediana de las simulaciones y los intervalos de predicción, y se compararon visualmente. Para los NPCs se generaron 1000 bases de datos usando el modelo a evaluar, y se obtuvieron la mediana y percentiles 95 de descriptores farmacocinéticos como el área bajo la curva tiempo-concentración de 0 a 12 horas (ABC_{12}), concentración máxima (C_{max}) y concentración mínima o en "valle" (C_{min}) calculados a partir de las concentraciones del fármaco simuladas, estos valores se compararon con la distribución para estos descriptores mencionados pero calculados a partir de las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas. Para el bootstrap se generaron 2000 bases de datos a partir de la base de datos original por muestreo aleatorio con reemplazamiento de 1 individuo, por cada vez que se replicó una base de datos. Después cada nueva base de datos se ajustó al modelo a evaluar y se reestimaron los parámetros farmacocinéticos, por último se

calcularon valores de la mediana y percentiles 95 de los parámetros farmacocinéticos estimados en los 2000 replicados, y se compararon con los valores de los parámetros estimados anteriormente en el modelo a evaluar [57].

La evaluación gráfica y estadística de los modelos farmacocinéticos poblacionales base y final se llevó a cabo con los programas Pearl-Speaks-NONMEM (PsN) versión 3.4.2. (Copyright © 2008 by Mats Karlsson, Niclas Jonsson and Andrew Hooker. © 2006-2007 by Lars Lindbom. © 2000-2005 by Lars Lindbom and Niclas Jonsson) [60, 57], X-pose versión 4.3.0 [61], y R versión 3.0.1 (Copyright © 2013 The R Foundation for Statistical Computing) [62].

6.3. Análisis estadístico

Algunos gráficos, y análisis de comparación estadística fueron llevados a cabo con el programa GraphPad Prism for Windows versión 5.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Diferencias entre valores medios fueron evaluadas usando el test de t de Student. Cuando los datos no pasaron el test de normalidad D'Agostino & Pearson, se llevó a cabo el test de Mann Whitney para evaluar diferencias entre valores medianos.

ABC y Cmax fueron calculados usando un método no compartimental con el programa Phoenix 64 Winnonlin versión 6.3 (Pharsight, St. Louis, Missouri). ABC fue calculada usando el método "linear trapezoidal/Log interpolation".

7. RESULTADOS

Se recolectaron y fueron analizados los perfiles farmacocinéticos de 53 pacientes pediátricos con trasplante de riñón. Las principales características demográficas de los pacientes son mostradas en la tabla 5.

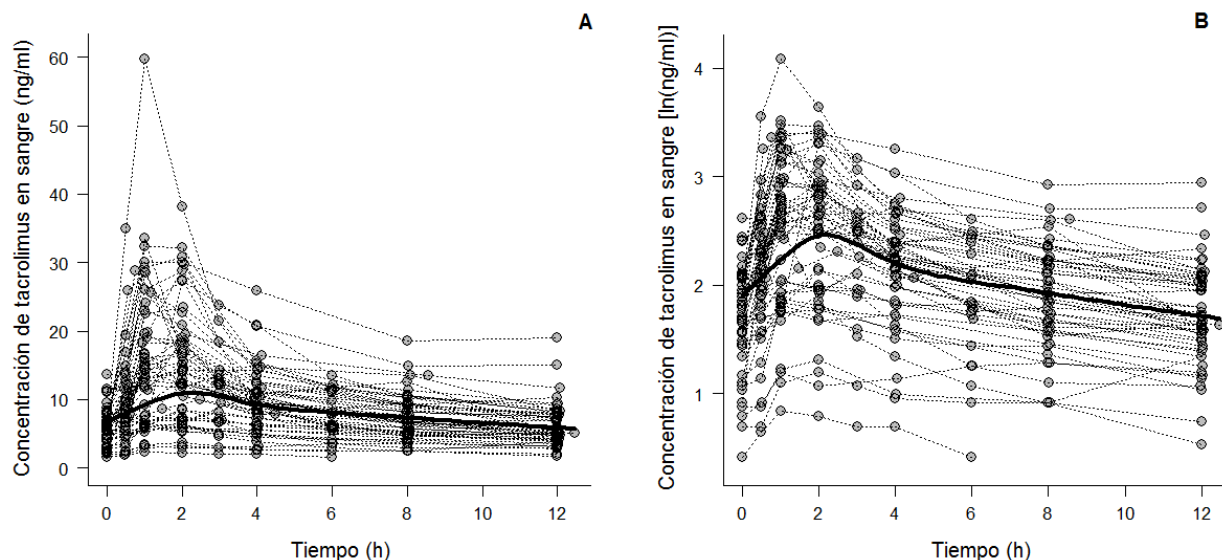


Figura 1. Curvas tiempo-concentración de tacrolimus en sangre a 12 h correspondientes a 53 pacientes pediátricos de trasplante renal. Los círculos representan las concentraciones de tacrolimus observadas (A) o el logaritmo neperiano de las concentraciones (B), y la línea representa la tendencia media.

Los perfiles tiempo-concentración de tacrolimus de los 53 pacientes (que tomaban tacrolimus cada 12h) son mostrados en la figura 1 y exhibieron una variabilidad entre individuos amplia, donde se observa un coeficiente de variación (CV) para el ABC_{12} normalizada a la dosis (ABC_{12}/D) de 67.5%, para la C_{max} normalizada a la dosis (C_{max}/D) de 63.7%, y para la C_{min} normalizada a la dosis (C_{min}/D) de 74.4%. Además sus valores medios fueron de 66 ng·h/ml/mg (DS 44.5), 9.6 ng/ml (DS 6.1), y 3.7 ng/ml (DS 2.8) respectivamente. Las concentraciones en sangre variaron desde 1.5 a 59.8 ng/ml.

Tabla 5. Características de 53 pacientes pediátricos de trasplante renal (19 femenino/34 masculino).

	Media	DS	Mediana	Rango
Edad (años)	14.6	3.2	16	2-19
Peso (kg)	48.2	15.2	48	11.2-75.5
Talla (cm)	149	17.8	153	81-170
ASC (m ²)	1.4	0.3	1.4	0.5-1.9
Cr (mg/dl)	1.1	0.4	1.1	0.4-2.6
Hb (g/dl)	12.9	1.7	13.3	8.5-17
Hct (%)	38.4	5	39.3	24.2-49.1
AST (U/L)	21.4	8.1	20	7-46
ALT (U/L)	38	13.4	35	22-103
PT (g/dl)	7.2	1.2	7.3	0.17-8.7
Alb (g/dl)	4.2	0.7	4.3	0.49-5.1
DPO (días)	391.6	327.2	244	50-1230
Dosis total de tacrolimus (mg)	2.3	1.3	2	0.5-6
Dosis ponderada de tacrolimus (mg/kg)	0.054	0.043	0.047	0.009-0.268
Dosis de prednisona ^a (mg/día)	6.7	2.2	7.5	2-12.5
Dosis de verapamilo ^a (mg/día)	184.5	94.8	170	37.5-360
Genotipo <i>CYP3A5</i> (n)				
*1/*1	3			
*1/*3	21			
*3/*3	29			
Genotipo <i>ABCB1</i>				
1236C>T (n)				
C/C	16			
C/T	18			
T/T	19			
2677G>T/A (n)				
G/G	18			
G/T ^b	19			
T/T ^c	16			
3435C>T (n)				
C/C	13			
C/T	22			
T/T	18			

^a Sólo algunos pacientes recibieron este fármaco

^b Incluye pacientes con genotipo G/A

^c Incluye pacientes con genotipo T/A

Alb=albúmina en sangre; **ALT**=alanino aminotransferasa; **AST**=aspartato aminotransferasa; **ASC**=área de superficie corporal; **Cr**=creatinina en sangre; **Hb**=hemoglobina; **Hct**=hematocrito; **DPO**=días post-operatorios; **PT**=proteínas totales en sangre.

En la figura 2 los perfiles farmacocinéticos medios según el tipo de formulación de tacrolimus que recibían los pacientes son mostrados en los cuales diferencias entre el tipo de formulación son elucidadas. Puede observarse que uno de los genéricos, Limustin®, muestra sus concentraciones en sangre normalizadas a la dosis

notoriamente más bajas que el resto de las formulaciones. Tales diferencias en los niveles de concentración son desvanecidas al final de la curva tiempo-concentración.

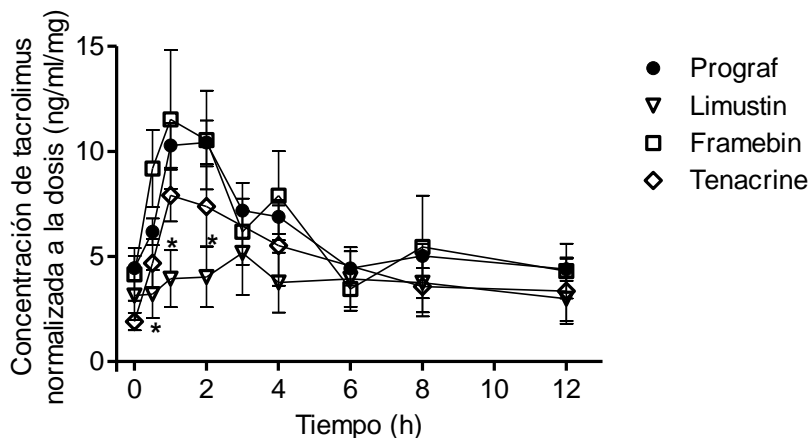


Figura 2. Curso temporal de las concentraciones en sangre de tacrolimus estratificado por el tipo de formulación que estaban recibiendo los pacientes (media \pm SEM de las concentraciones normalizadas a la dosis). Datos de pacientes con información desconocida sobre su formulación fueron omitidos.

7.1. Modelado farmacocinético poblacional

7.1.1. Desarrollo del modelo farmacocinético base

Aunque la línea de tendencia de los perfiles farmacocinéticos con concentraciones logarítmicas (figura 1, B) parece mostrar un comportamiento bicompartimental, se decidió hacer la búsqueda del modelo estructural probando diferentes modelos empezando desde uno monocompartimental más sencillo. La estimación de parámetros farmacocinéticos y modelado se hizo usando las concentraciones logaritmo transformadas.

En base al valor de OFV (el cual se sabe entre menor sea es mejor el ajuste del modelo a las observaciones), y a las gráficas de bondad de ajuste OBS vs. PRED, IPRED, se seleccionó el modelo estructural. En la tabla 6 se muestra un resumen de los distintos modelos que se probaron empezando desde el modelo más sencillo hasta el modelo estructural seleccionado como modelo base (E) que fue un modelo de 2 compartimentos con absorción de primer orden, tiempo de latencia y variabilidad interindividual en K_a , CL/F , F , y ERR (figura 3).

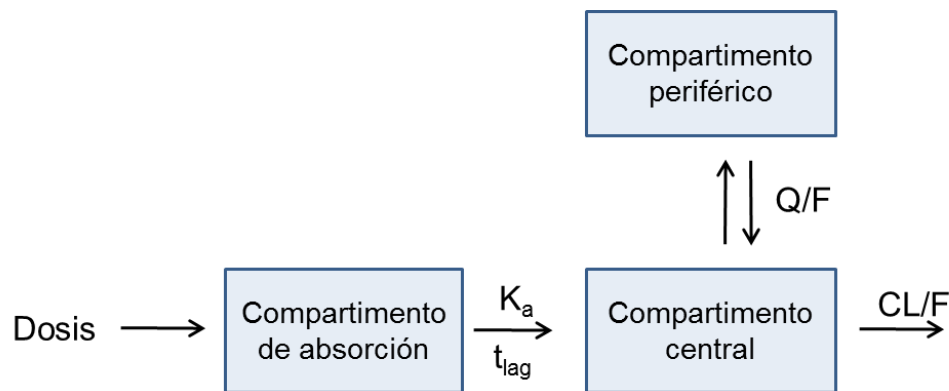
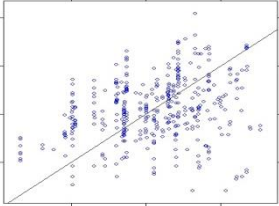
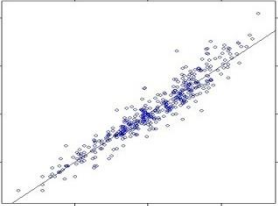
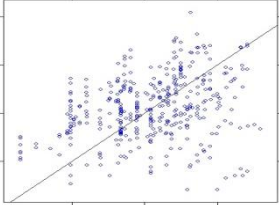
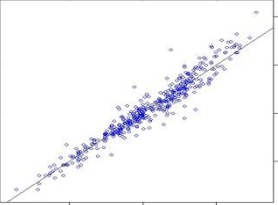
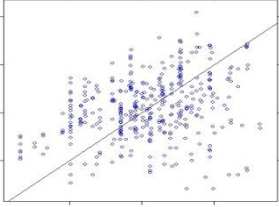
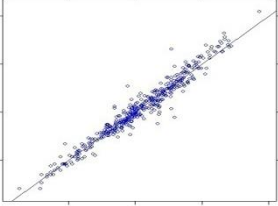
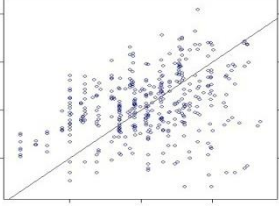
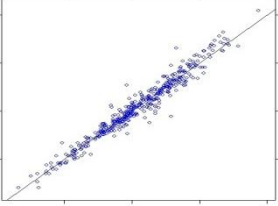
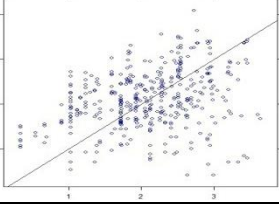
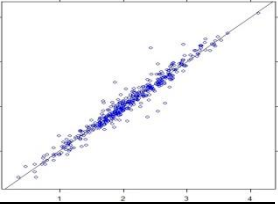


Figura 3. Esquema del modelo farmacocinético estructural seleccionado como modelo base. CL/F =depuración oral aparente; K_a =constante de absorción; Q/F =depuración aparente intercompartimental después de administración oral; t_{lag} =tiempo de latencia.

Aunque el modelo de absorción por compartimentos de tránsito (tabla 6, D) mostró un valor de OFV más bajo que el primer modelo con t_{lag} probado (tabla 6, C), no fue seleccionado como modelo base ya que al probar estimar variabilidad entre individuos en parámetros que representan el retraso en la absorción del fármaco como el tiempo de tránsito medio o en el número de compartimentos de tránsito esta no resultó significativa, y ya que la utilidad de este tipo de modelo es estimar variabilidad en el tiempo de retraso en la absorción se optó por no utilizarlo, además de que su tiempo de cómputo (aproximadamente 10 h) fue muy largo y mucho más grande que el del modelo con t_{lag} .

Tabla 6. Resumen de los distintos modelos estructurales probados en el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional base.

Modelo	Descripción	OFV	OBS vs. PRED	OBS vs. IPRED
A	1 compartimento con absorción de primer orden	-464.716		
B	2 compartimentos con absorción de primer orden	-534.112		
C	2 compartimentos con absorción de primer orden y t_{lag}	-612.734		
D	2 compartimentos con absorción de primer orden por compartimentos de tránsito	-623.271		
E	2 compartimentos con absorción de primer orden y t_{lag} + VII-F + VII-ERR	-707.46		

OBS=concentración de tacrolimus en sangre observada [ln(ng/ml)]; **IPRED**=concentración de tacrolimus individual predicha [ln(ng/ml)]; **OFV**=valor de la función objetivo; **PRED**=concentración de tacrolimus poblacional predicha [ln(ng/ml)]; t_{lag} =tiempo de latencia; **VII-ERR**=variabilidad interindividual en el error residual; **VII-F**=variabilidad interindividual en la biodisponibilidad.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo base.

Parámetro	Estimado	RSE (%)	VII (%)	RSE (%)
K_a (h^{-1})	0.38	(21.8)	79	(24)
V/F (L)	36.5	(29.2)	-	-
CL/F (L/h)	19.89	(9.3)	30	(27)
Q/F (L/h)	46.91	(10.8)	-	-
V_T/F (L)	362.07	(21.4)	-	-
t_{lag} (h)	0.37	(5.7)	-	-
F (%)	100 ^a	-	72	(28)
ERR [ln (ng/ml)]	0.125	(6.7)	32	(53)

^a Se tomó como 100%, no se pudo estimar

CL/F=depuración oral aparente; **ERR**=error residual; **F**=biodisponibilidad; **VII**=variabilidad interindividual; **K_a** =constante de absorción; **Q/F**=depuración aparente intercompartimental después de administración oral; **RSE**=error estándar relativo [(error estándar/estimado del parámetro) \times 100]; **t_{lag}** =tiempo de latencia; **V/F**=volumen de distribución aparente del compartimento central; **V_T/F** =volumen de distribución aparente del compartimento periférico.

Los valores típicos de los estimados de parámetros farmacocinéticos y de variabilidad interindividual (VII) del modelo base son resumidos en la tabla 7. Aunque no se pudo estimar un valor de biodisponibilidad (F) y este se asumió como 100% ya que sólo se contó con datos de administración oral sí se estimó un valor de VII para F, el cual se muestra alto (72%), también se estimó VII para K_a , CL/F, ERR.

7.1.2. Análisis de covariables

Las covariables investigadas para encontrar un efecto significativo sobre la farmacocinética de tacrolimus fueron las siguientes: edad, sexo, peso, área de superficie corporal (ASC), creatinina en sangre (Cr), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hct), aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), proteínas totales en sangre (PT), albúmina en sangre (Alb), días post-operatorios (DPO), dosis

de prednisona, dosis de verapamilo, dosis total de tacrolimus (DTOT), formulación de tacrolimus (FOR), genotipo de *CYP3A5* y *ABCB1*.

Tabla 8. Comparación de modelos farmacocinéticos probados durante el análisis covariable y construcción del modelo farmacocinético poblacional final.

Modelo	Descripción	OFV
E	2 compartimentos con absorción de primer orden y t_{lag} + VII-F + VII- ERR, (Modelo base)	-707.5
F	Como el modelo E + KaFOR + FDTOT + FFOR + CYP3A5-CL/F + ABCB1-CL/F, (Modelo intermedio)	-828.8
G	Como el modelo F, pero ABCB1-CL/F fue removido, (Modelo después la “eliminación hacia atrás”)	-817.5
H	Como el modelo G, pero fue removida VII- CL/F, y reducido el número de parámetros en FFOR y KaFOR, (Modelo final)	-826.3

VII-CL/F=variabilidad interindividual en la depuración oral aparente; **ABCB1-CL/F**=efecto del genotipo *ABCB1* sobre la depuración oral aparente; **CYP3A5-CL/F**=efecto del genotipo *CYP3A5* sobre la depuración oral aparente; **FDTOT**=efecto de la dosis total de tacrolimus sobre la biodisponibilidad; **FFOR**=efecto de la formulación de tacrolimus sobre la biodisponibilidad; **KaFOR**=efecto de la formulación de tacrolimus sobre la constante de absorción; **VII-ERR**=variabilidad interindividual en el error residual; **VII-F**=variabilidad interindividual en la biodisponibilidad; t_{lag} =tiempo de latencia.

La prueba de influencia de las covariables se llevó a cabo con el método SCM sobre el modelo base. Durante la etapa de inclusión hacia adelante (forward inclusion) las covariables que mostraron influencia significativa sobre los parámetros farmacocinéticos reduciendo el OFV en al menos 6.63 puntos ($p < 0.01$) y que fueron incluidas en el modelo intermedio fueron FOR como un valor categórico para K_a , así como DTOT y FOR como valores continuo y categórico respectivamente para F, y los genotipos de *CYP3A5* y *ABCB1* como valores categóricos para CL/F. Las mencionadas covariables fueron incluidas al modelo base obteniéndose un modelo intermedio. Después de la etapa de eliminación hacia atrás (backward deletion) donde una a una se eliminó las covariables del modelo intermedio para confirmar su relevancia, todas las covariables incluidas en el modelo intermedio excepto el genotipo de *ABCB1* tuvieron el suficiente efecto sobre los parámetros farmacocinéticos para satisfacer el cambio requerido en OFV al incrementarlo en

más de 10.83 puntos ($p < 0.001$) cuando éstas fueron eliminadas, y de esta manera ser retenidas en el modelo final (tabla 8).

Las relaciones que describen el modelo final fueron:

$$K_a = \theta_1 \times KaFOR \times \eta_1 \quad (\text{Ec. 3})$$

$$CL/F = \theta_3 \times INF_{CYP3A5} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$F = 1 \times e^{(\theta_{10} \times (Dosis - 2))} \times FFOR \times \eta_3 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$V/F = \theta_2 \times \eta_4 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$Q/F = \theta_4 \quad (\text{Ec. 7})$$

$$V_T/F = \theta_5 \quad (\text{Ec. 8})$$

$$t_{lag} = \theta_6 \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde KaFOR es el efecto de la formulación sobre K_a , INF_{CYP3A5} el efecto de $CYP3A5$, FFOR el efecto de la formulación sobre F , θ el valor típico (poblacional) de cada parámetro farmacocinético, y η el correspondiente parámetro asociado a la variabilidad interindividual en los casos en donde fue estimada.

La inclusión del efecto del genotipo $CYP3A5$ sobre CL/F redujo la variabilidad interindividual en CL/F de 30% mostrado en el modelo base a casi 0% después de la etapa de eliminación hacia atrás lo cual causó dificultades para estimar esta variabilidad por lo tanto se tomó como despreciable y se decidió remover la variabilidad interindividual en CL/F del modelo final (ver tablas 8 y 9). Así que basado en el genotipo $CYP3A5$ el valor de estimado de CL/F para individuos portadores de $CYP3A5^{*1/*1}$ y $*1/*3$ fue 23.1 L/h y 17.9 L/h respectivamente y para portadores de $*3/*3$ (no expresadores de $CYP3A5$) fue 11.9 L/h, por lo tanto CL/F en no expresadores de $CYP3A5$ fue más bajo que en expresadores de $CYP3A5$ (tanto $*1/*1$ como $*1/*3$) como está representado en la figura 4.

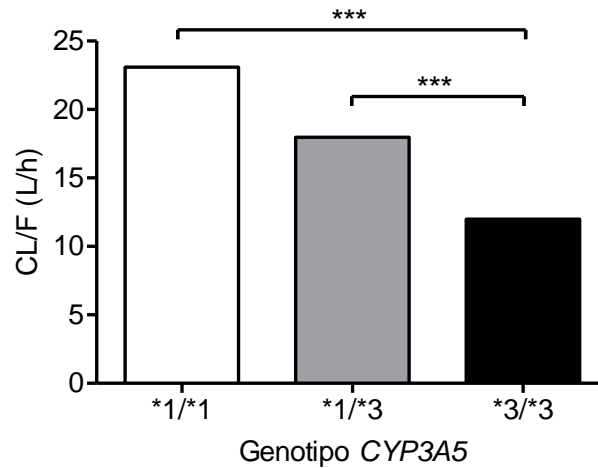


Figura 4. Relación entre estimados poblacionales de depuración oral aparente (CL/F) del modelo final y los grupos de genotipo de CYP3A5 (**= $p < 0.001$; test Kruskal-Wallis con comparación múltiple Dunn).

La adición del efecto de FOR sobre K_a , y tanto de FOR como DTOT sobre F produjo una reducción en la variabilidad interindividual para estos parámetros farmacocinéticos (K_a , y F) de 79% y 72% observada en el modelo base a 37% y 38% respectivamente en el modelo final.

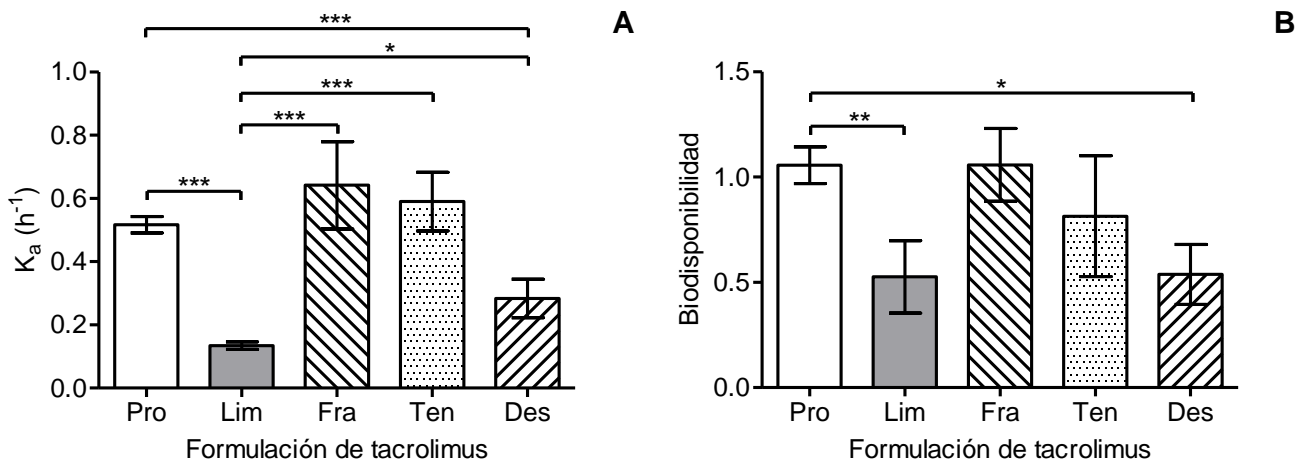


Figura 5. Relación entre el tipo de formulación de tacrolimus que los pacientes estaban recibiendo y los estimados individuales (media, \pm error estándar de la media SEM) de los parámetros: (A) constante de absorción (K_a) y (B) biodisponibilidad del modelo final (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; t-student).

Las formulaciones de tacrolimus que los pacientes podían estar recibiendo fueron la formulación innovadora Prograf® (Pro) o alguna de las formulaciones genéricas Limustin® (Lim), Framebin® (Fra) o Tenacrine® (Ten), y en unos cuantos casos no se contó con la información de la formulación tomada por algunos pacientes y en estos se manejó como “desconocida” (Des). En el caso de los pacientes tomando Lim sus estimados individuales en el modelo final para K_a y F fueron significativamente más bajos que los de pacientes que estaban recibiendo la formulación innovadora Pro y en el caso de K_a siendo incluso menor que en los pacientes que se les administró las otras formulaciones genéricas (figura 5), y algo similar se observó cuando descriptores farmacocinéticos de la exposición del fármaco fueron relacionados al tipo de FOR (figura 11). Por otra parte el factor de influencia de Pro, Fra y Ten fue muy similar y esto causó dificultades para estimar exitosamente el error estándar de los parámetros farmacocinéticos poblacionales por lo que se optó por reducir el número de parámetros involucrados en el factor de influencia del tipo de FOR y fue incorporada la influencia de Pro, Fra y Ten en un solo parámetro y la influencia de Lim y Des cada una con parámetros separados (ver tablas 8 y 9).

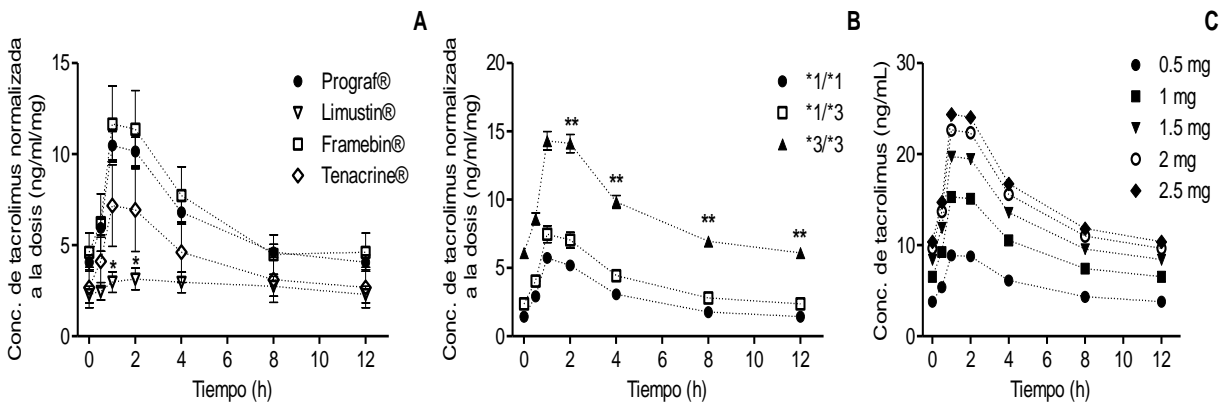


Figura 6. Efecto de las covariables sobre los perfiles farmacocinéticos típicos de tacrolimus. (A) Comparación de la formulación de tacrolimus sobre la población completa, (B) comparación del genotipo de *CYP3A5* sobre la formulación Prograf®, (C) comparación de la dosis total de tacrolimus (DTOT) sobre el genotipo *CYP3A5* *3/*3 y la formulación Prograf®.

La figura 6 muestra el efecto de las covariables seleccionadas sobre los perfiles farmacocinéticos de tacrolimus, (i) tipo de formulación sobre K_a y F (panel A), (ii) genotipo de $CYP3A5$ sobre CL/F (panel B), y efecto de la dosis sobre F (panel C). En la cual se llevó a cabo una simulación usando el modelo final pero removiendo la variabilidad interindividual y residual para explorar solamente el efecto de las covariables. Además la figura 7 muestra los perfiles farmacocinéticos individuales observados (reales) y sus correspondientes predicciones individuales hechas por el modelo final, para los pacientes con mejor, mediano y peor ajuste en cada uno de los diferentes genotipos de $CYP3A5$ (*1/*1, *1/*3, *3/*3).

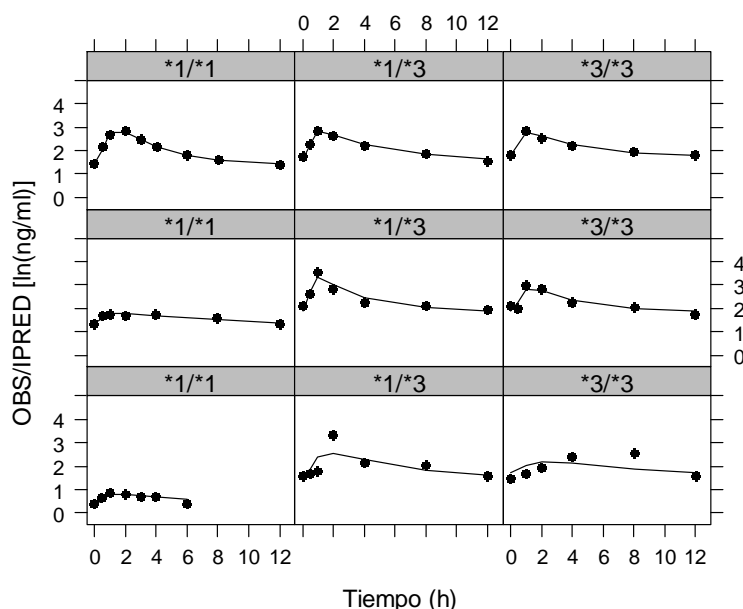


Figura 7. Curso temporal de las observaciones (círculos) y predicciones (líneas) individuales para los pacientes con mejor (paneles superiores), mediano (paneles del medio), y peor (paneles inferiores) ajuste, para los genotipos *1/*1 (1ª columna), *1/*3 (2ª columna), y *3/*3 (3ª columna) de $CYP3A5$.

7.1.3. Validación del modelo final

Los parámetros farmacocinéticos poblacionales y la VII que se estimaron usando el modelo final son presentados en la tabla 9. El desempeño del modelo final fue

evaluado con gráficas de diagnóstico de rutina comparando las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas (OBS) con las predicciones poblacionales e individuales (PRED, IPRED, respectivamente) del modelo las cuales tuvieron suficiente bondad de ajuste y no mostraron sesgo estructural (figura 8: A y B).

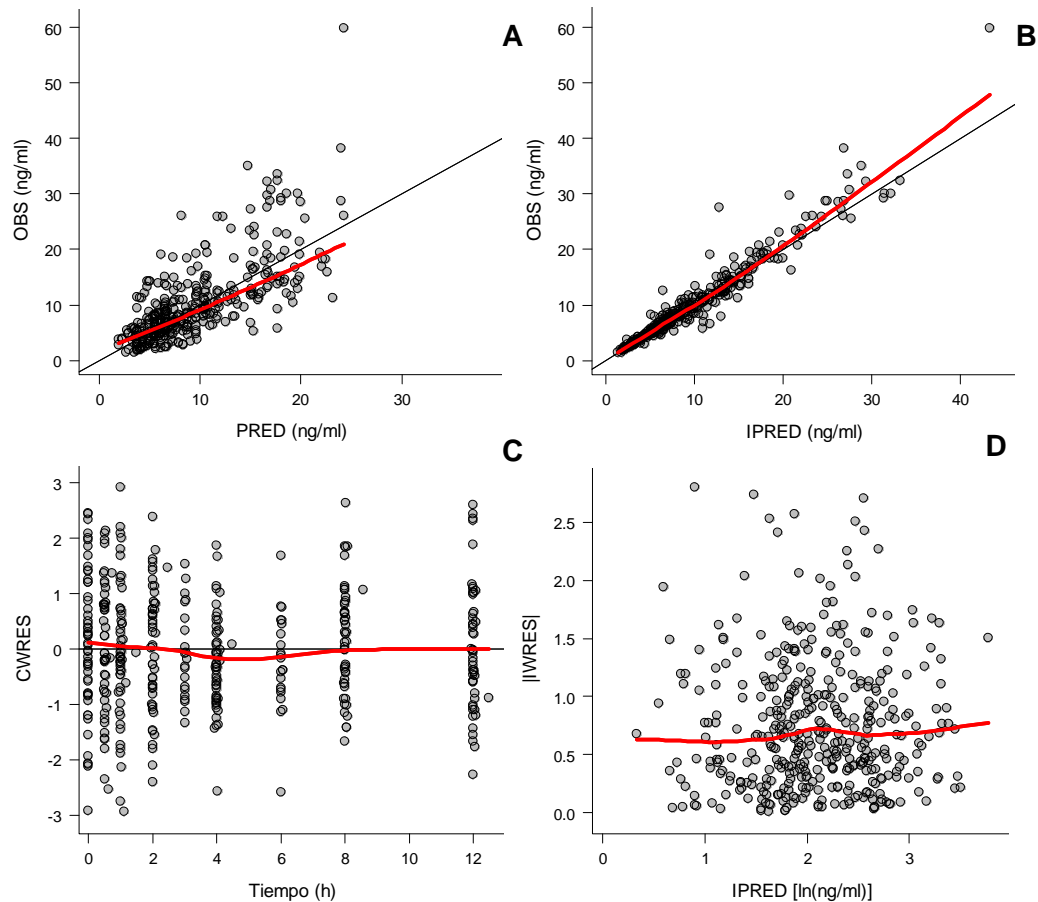


Figura 8. Gráficos de bondad de ajuste. (A) concentraciones de tacrolimus en sangre observadas (OBS) vs. concentraciones poblacionales predichas por el modelo (PRED), (B) OBS vs. concentraciones individuales predichas por el modelo (IPRED), (C) residuales ponderados condicionales (CWRES) vs. tiempo, (D) residuales ponderados individuales (IWRES) vs. IPRED.

Además los residuales fueron homogéneamente distribuidos sobre el tiempo de muestreo y no reflejaron desviaciones sistemáticas (figura 8: C y D), lo que sugiere que el modelo no es sesgado en sus predicciones.

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo covariable final, y validación bootstrap.

Parámetro farmacocinético	Media poblacional	RSE (%)	VII (%)	RSE (%)	Bootstrap (n= 2000)		
					Mediana	P5	P95
K_a (h^{-1})= $\theta_1 \times KaFOR$							
θ_1	0.52	27	37	38	0.52	0.39	0.7
Si FOR=Pro, Fra, o Ten, entonces $KaFOR=1$							
Si FOR=Lim, $KaFOR=1+\theta_{13}$							
Si FOR=Des, $KaFOR=1+\theta_{14}$							
θ_{13}	-0.76	6	-	-	-0.76	-0.83	-0.69
θ_{14}	-0.51	23	-	-	-0.52	-0.68	-0.2
V/F (L)	24.16	39	66	46	23.71	14.44	37.5
CL/F (L/h)= $\theta_3 \times INF_{CYP3A5}$							
θ_3	11.98	8	-	-	12.03	10.67	13.91
Si $CYP3A5^*1/*1$, $INF_{CYP3A5}=1+\theta_9$							
Si $CYP3A5^*1/*2$, $INF_{CYP3A5}=1+\theta_8$							
Si $CYP3A5^*3/*3$, $INF_{CYP3A5}=1$							
θ_8	0.5	38	-	-	0.5	0.13	0.77
θ_9	0.93	33	-	-	0.95	0.16	2.21
Q/F (L/h)	32.49	20	-	-	32.65	24.3	39.71
V_T/F (L)	383.5	34	-	-	373.79	251.71	708.49
t_{lag} (h)	0.39	6	-	-	0.39	0.35	0.43
F (%) ^a = $100 \times FDTOT \times FFOR$	100 ^a	-	38	22	-	-	-
$FDTOT=e^{(\theta_{10} \times (Dose-2))}$							
θ_{10}	-0.3	19	-	-	-0.3	-0.4	-0.22
FFOR:							
Si FOR=Pro, Fra, o Ten, $FFOR=1$							
Si FOR=Lim, $FFOR=1+\theta_{11}$							
Si FOR=Des, $FFOR=1+\theta_{12}$							
θ_{11}	-0.53	22	-	-	-0.53	-0.67	-0.3
θ_{12}	-0.53	16	-	-	-0.51	-0.66	-0.34
ERR [ln (ng/mL)]	0.12	8	35	49	0.12	0.11	0.14

^a Se asumió como 100%, no se pudo estimar

CL/F=depuración oral aparente; **CYP3A5**=genotipo del gen que codifica al citocromo P450-5; **ERR**=error residual; **F**=biodisponibilidad; **FDTOT**=efecto de la dosis total de tacrolimus sobre F; **FFOR**=efecto de FOR sobre la F; **FOR**=formulación de tacrolimus que podía ser Prograf® (Pro), Limustin® (Lim), Framebin® (Fra), Tenacrine® (Ten) o desconocida (Des); **INF_{CYP3A5}**=influencia del genotipo CYP3A5; **K_a**=constante de absorción; **KaFOR**=efecto de FOR sobre K_a; **P5**=percentil 5; **P95**=percentil 95; **Q/F**=depuración aparente intercompartimental después de administración oral; **RSE**=error estándar relativo [(error estándar/estimado del parámetro)x100]; **θ_1** =valor típico de K_a; **θ_3** =valor típico de CL/F; **θ_8** =efecto de CYP3A5 sobre CL/F si es *1/*3; **θ_9** = efecto de CYP3A5 sobre CL/F si es *1/*1; **θ_{10}** =valor típico del efecto de la dosis de tacrolimus sobre F; **θ_{11}** =efecto de FOR sobre F si es Lim; **θ_{12}** = efecto de FOR sobre F si es Des; **θ_{13}** =efecto de FOR sobre K_a si es Lim; **θ_{14}** =efecto de FOR sobre K_a si es Des; **t_{lag}**=tiempo de latencia; **V/F**=volumen de distribución aparente del compartimento central; **V_T/F**=volumen de distribución aparente del compartimento periférico; **VII**=variabilidad interindividual.

Además para evaluar la exactitud del modelo final se llevó a cabo un procedimiento bootstrap donde se replicaron 2000 bases de datos a partir de los datos originales por muestreo aleatorio con reemplazo de 1 individuo nuevo simulado por el programa (NONMEM), por cada replicado, y en donde en cada base de datos replicada se reestimaron los parámetros farmacocinéticos. Después la mediana y percentiles 5 y 95 del total de los parámetros farmacocinéticos reestimados en el procedimiento bootstrap se compararon con los valores de los parámetros estimados previamente en el modelo final (tabla 9) observándose valores muy cercanos entre los parámetros del modelo final y los resultados de la validación bootstrap, lo que indica que los parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados con el modelo final fueron exactos y que el modelo fue estable al cambio de individuos en estudio.

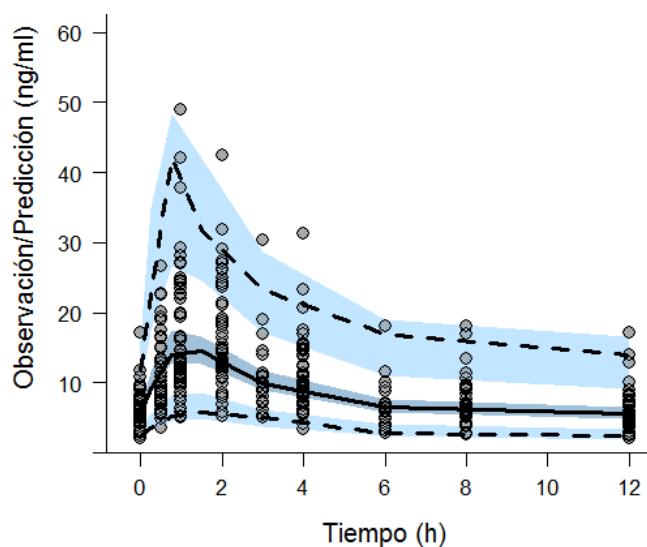


Figura 9. Evaluación del modelo final usando un prediction-corrected visual predictive check (pcVPC). Comparación entre las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas (círculos) y las simuladas a partir del modelo final. Intervalos de predicción de 2.5%, 50% 97.5% con IC95 (áreas de color) obtenidos de 1000 bases de datos simuladas.

El modelo final además fue evaluado por medio de las simulaciones pcVPC y NPC. En el pcVPC a partir de los estimados de parámetros farmacocinéticos poblacionales obtenidos en el modelo final fueron simulados un total de 1000 bases de datos para obtener las correspondientes concentraciones de tacrolimus

simuladas, después se calculó la mediana y los percentiles 2.5 y 97.5% de las simulaciones así como sus IC95, y las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas fueron traslapadas o superpuestas sobre los intervalos de predicción y comparadas visualmente. La figura 9 representa los resultados del pcVPC y muestra que la mayoría de los perfiles tiempo-concentración observados caen dentro de los intervalos de predicción de 2.5-97.5% y estuvieron simétricamente distribuidos alrededor de la mediana de predicción, por lo tanto las concentraciones de tacrolimus fueron bien predichas por el modelo final.

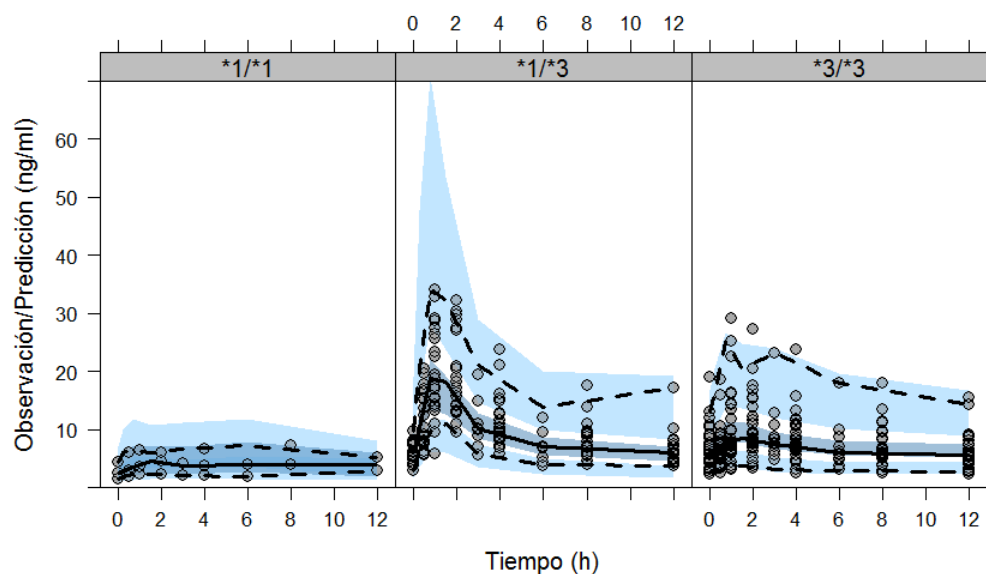


Figura 10. Evaluación del modelo final usando un pcVPC estratificado de acuerdo al genotipo de CYP3A5: *1/*1, *1/*3 y *3/*3. Comparación entre las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas (círculos) y las simuladas a partir del modelo. Intervalos de predicción de 2.5%, 50% y 97.5% con IC95 (áreas de color) obtenidos de 1000 bases de datos

Resultados parecidos fueron obtenidos cuando el pcVPC se estratificó en base al genotipo CYP3A5 de los individuos (figura 10). También se realizó un estudio NPC simulando 1000 bases de datos a partir de los datos originales y del modelo final, en donde la mediana y percentiles 5 y 95 del ABC₁₂, ABC₁₂/D, C_{max} y C_{min} de tacrolimus calculadas a partir de las concentraciones de tacrolimus simuladas fueron comparados con los respectivos valores medianos de estos descriptores farmacocinéticos calculados a partir de las concentraciones de tacrolimus en sangre

observadas (reales). Los valores de ABC_{12} , ABC_{12}/D , C_{max} y C_{min} calculados de los datos simulados fueron muy cercanos a los respectivos valores calculados de los datos reales (tabla 10), y resultados similares fueron obtenidos cuando el NPC fue estratificado por el genotipo *CYP3A5* (tabla 11).

Tabla 10. Numerical predictive check (NPC) de los datos totales (1000 bases de datos simuladas).

Descriptor	Observaciones		Simulaciones	
	Mediana		Mediana	[rango percentil 5-95]
C_{max}	15.5		14.53	[12.53–16.67]
ABC_{12}	106.8		100.19	[88.29–113.45]
ABC_{12}/D	57.49		53.27	[46.07–61.69]
C_{min} (ng/ml)	5.3		5.59	[4.94–6.38]

ABC_{12} (ng·h/ml)=área bajo la curva tiempo-concentración de tacrolimus en sangre de 0 a 12 horas; **ABC_{12}/D** [(ng·h/ml)/mg]= ABC_{12} normalizada a la dosis; **C_{max}** (ng/ml)=concentración máxima de tacrolimus en sangre; **C_{min}** (ng/ml)=concentración mínima de tacrolimus en sangre al último punto de la cinética (12 h).

Tabla 11. Numerical predictive check (NPC) estratificado de acuerdo al genotipo de *CYP3A5*: *1/*1, *1/*3 y *3/*3 (1000 bases de datos simuladas).

Genotipo <i>CYP3A5</i>	Observaciones				Simulaciones			
	C_{max}	ABC_{12}	ABC_{12}/D	C_{min}	C_{max}	ABC_{12}	ABC_{12}/D	C_{min}
*1/*1	5.8	59.64	9.94	3.9	5.61 [3.16–9.66]	38.3 [22.24–67.42]	6.74 [3.95–11.79]	3.48 [2.13–5.57]
*1/*3	19.07	112.97	46.86	5.45	17.67 [14.49–21.91]	108.47 [91.36–130.95]	41.6 [33.9–50.95]	5.5 [4.56–6.6]
*3/*3	14	106.8	83.6	5.5	12.52 [10.04–15.19]	97.23 [81.42–115.14]	74.69 [62.67–89.96]	5.93 [4.94–7.04]

Valores expresados como mediana [rango percentil 5-95].
 ABC_{12} (ng·h/ml)=área bajo la curva tiempo-concentración de tacrolimus en sangre de 0 a 12 horas; **ABC_{12}/D** [(ng·h/ml)/mg]= ABC_{12} normalizada a la dosis; **C_{max}** (ng/ml)=concentración máxima de tacrolimus en sangre; **C_{min}** (ng/ml)=concentración mínima de tacrolimus en sangre al último punto de la cinética (12 h).

También se exploró el potencial efecto de covariables como Hct, DPO reportadas previamente en la literatura como significativas, agregándolas al modelo farmacocinético final y usando las mismas relaciones reportadas [63, 64] pero no fueron detectados efectos significativos ($p < 0.05$), ver resultados en tabla 12 (anexo 1).

7.2. Influencia de la formulación de tacrolimus sobre descriptores farmacocinéticos

Además del desarrollo del modelo farmacocinético poblacional de tacrolimus se exploró la relación o influencia del tipo de formulación de este inmunosupresor que estaban tomando los pacientes al momento del estudio farmacocinético, directamente sobre descriptores farmacocinéticos de exposición como ABC_{12} y C_{max} calculados de los perfiles tiempo-concentración en sangre a 12 horas de los 53 pacientes pediátricos de trasplante renal.

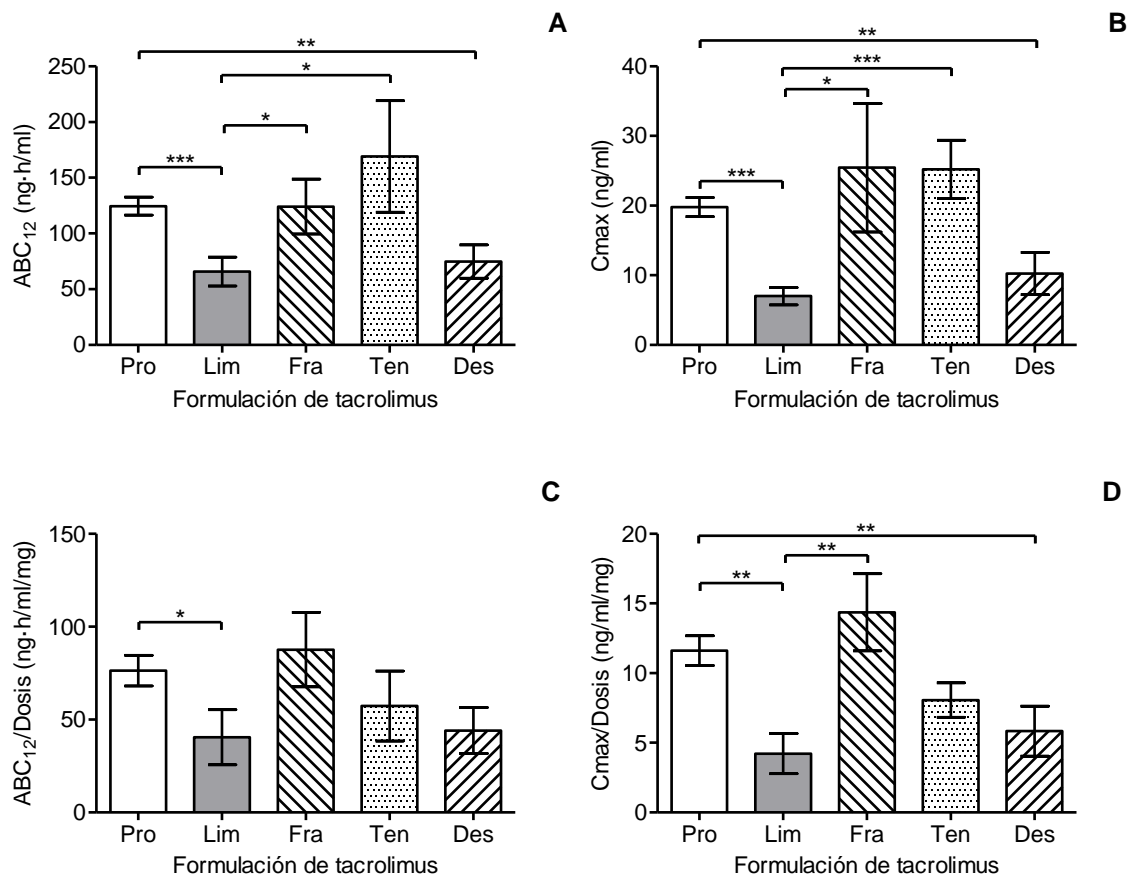


Figura 11. Relación entre el tipo de formulación de tacrolimus que los pacientes estaban recibiendo y los descriptores farmacocinéticos (media, \pm SEM) calculados de las concentraciones de tacrolimus en sangre observadas. (A) área bajo la curva tiempo concentración de 0 a 12 horas (ABC_{12}), (B) concentración máxima (C_{max}), (C) ABC_{12} normalizada a la dosis y (D) C_{max} normalizada a la dosis, (*= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; t-student).

En la figura 11A se observa que el ABC_{12} fue significativamente más pequeña en pacientes que estaban tomando la formulación genérica de tacrolimus Lim que el ABC_{12} de los que tomaban la formulación innovadora Pro (65.8 ± 13 vs. 124.5 ± 8.1 ng·h/ml, $p < 0.001$, t test), mostrándose incluso menor que el ABC_{12} de pacientes que tomaban los otros genéricos Fra y Ten (65.8 ± 13 vs. 124.2 ± 24.6 , 169.0 ± 50 ng·h/ml, $p < 0.05$, $p < 0.05$; respectivamente, t test). Algo similar se observó para la C_{max} (figura 11B), la cual fue significativamente menor en pacientes que estaban tomando Lim que la C_{max} de los que tomaban Pro (7 ± 1.3 vs. 19.8 ± 1.4 ng/ml, $p < 0.001$, t test), y también se mostró menor que la C_{max} de pacientes que tomaban Fra y Ten (7 ± 1.3 vs. 25.4 ± 9.2 , 25.2 ± 4.2 ng/ml, $p < 0.05$, $p < 0.001$; respectivamente, t test). Cuando estos parámetros se normalizaron a la dosis, en el caso del ABC_{12}/D la diferencia se mantuvo estadísticamente significativa sólo entre Pro y Lim (figura 11C), aunque se sigue observando la misma tendencia entre Lim y las otras formulaciones genéricas que en el panel superior en el que los valores de ABC_{12} no se normalizaron a la dosis, y para $C_{max}/Dosis$ se mantuvo la diferencia estadísticamente significativa entre Pro y Lim, así como entre Lim y Fra (figura 11D), aunque también se sigue observando la tendencia entre Lim y Ten que en el panel superior.

7.3. Desarrollo de un descriptor de la dosis de tacrolimus basado en el modelo final

Basado en los parámetros farmacocinéticos del modelo final estimados con las ecuaciones 3-9, así como en las ecuaciones de las micro (Ec. 10-12) y macro constantes (Ec. 13-14) de disposición (distribución+eliminación), fue propuesta una guía para dosificar tacrolimus usando la ecuación para un modelo de 2 compartimentos con absorción de primer orden (administración oral) la cual incluye un tiempo de latencia y tomando en consideración la relación de las covariables con efecto significativo retenidas en el modelo final, genotipo de *CYP3A5*, dosis, FOR:

$$K = k_{10} = \frac{CL/F}{V/F} \quad (\text{Ec. 10})$$

$$k_{12} = \frac{Q/F}{V/F} \quad (\text{Ec. 11})$$

$$k_{21} = \frac{Q/F}{V_T/F} \quad (\text{Ec. 12})$$

$$\beta = \frac{1}{2} \times \left[(k_{12} + k_{21} + k_{10}) - \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - (4 \times k_{21} \times k_{10})} \right] \quad (\text{Ec. 13})$$

$$\alpha = \frac{k_{21} \times k_{10}}{\beta} \quad (\text{Ec. 14})$$

$$\text{Dosis (mg/kg)} = \frac{\text{Conc. diana} \times V/F}{K_a \cdot F \cdot Wt \cdot \left\{ \frac{(k_{21} - \alpha) \cdot e^{-\alpha(\tau - t_{lag})}}{(K_a - \alpha) \cdot (\beta - \alpha)} + \frac{(k_{21} - \beta) \cdot e^{-\beta(\tau - t_{lag})}}{(K_a - \beta) \cdot (\alpha - \beta)} + \frac{(k_{21} - K_a) \cdot e^{-K_a(\tau - t_{lag})}}{(\alpha - K_a) \cdot (\beta - K_a)} \right\}}$$

Donde α y β son macro-constantes de disposición de un modelo farmacocinético biexponencial, k_{10} es la constante de eliminación (K), k_{12} es una microconstante de distribución desde el compartimento central al compartimento periférico, k_{21} es una microconstante de distribución desde el compartimento periférico al compartimento central, τ es el intervalo de dosificación (12 h), t_{lag} es el tiempo de latencia o retraso en la absorción, F es la biodisponibilidad, K_a es la constante de absorción, CL/F es la depuración aparente, Q/F es la depuración aparente intercompartimental, V/F es el volumen de distribución aparente del compartimento central, V_T/F es el volumen de distribución aparente del compartimento periférico y Wt es el peso corporal medio de la población (kg).

Con el modelo final y esta propuesta de dosificación fueron simuladas 1000 bases de datos en el programa NONMEM y se predijo la dosis de tacrolimus necesaria para tener una concentración diana en valle de 6 ng/ml para individuos con diferente genotipo de *CYP3A5* y tomando diferente formulación de tacrolimus como Pro o Lim (figura 12). Las dosis medianas predichas para individuos tomando Pro con genotipo *CYP3A5* *1/*1, *1/*3 y *3/*3 fueron 0.18 mg/kg/día, 0.14 mg/kg/día y 0.1 mg/kg/día respectivamente, mientras que para individuos tomando Lim en todos los casos las

dos predichas fueron significativamente más altas ($p < 0.001$) con valores medianos de 0.26 mg/kg/día, 0.22 mg/kg/día y 0.18 mg/kg/día para *1/*1, *1/*3 y *3/*3 respectivamente.

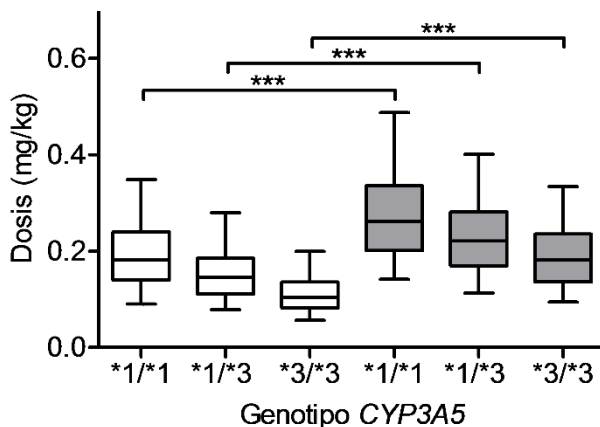


Figura 12. Predicción de la dosis de tacrolimus necesaria para alcanzar una concentración diana en sangre de 6 ng/ml, para individuos recibiendo la formulación innovadora Prograf (cajas blancas) o la formulación genérica Limustin (cajas grises) y con diferentes genotipos de *CYP3A5*. La simulación fue llevada a cabo con el descriptor basado en la ecuación farmacocinética de 2 compartimentos y el modelo final (**= $p < 0.001$). Las cajas representan la mediana y percentiles 25 y 75; las barras de error representan los percentiles 5 y 95.

8. DISCUSIÓN

Este trabajo tuvo como objetivo describir los perfiles farmacocinéticos de tacrolimus de pacientes pediátricos de trasplante de riñón por medio de un modelo farmacocinético poblacional y probar diferentes covariables potenciales que podrían tener un efecto significativo sobre la farmacocinética de este inmunosupresor de índice terapéutico estrecho, tales como datos demográficos, clínicos y polimorfismos de *ABCB1* y *CYP3A5*.

En un estudio farmacogenético reciente se reportó una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de los fenotipos funcional (expresador) y no funcional (no expresador) de *CYP3A5* entre pacientes de trasplante renal mexicanos e

individuos de raza negra y caucásica, pero no significativa comparada con poblaciones sudasiáticas [49], también se encontró que pacientes que fueron homocigotos y heterocigotos expresadores (genotipos *CYP3A5**1/*1 y *1/*3, respectivamente) tuvieron un requerimiento de dosis de tacrolimus mediano de 0.16 mg/kg/día y 0.13 mg/kg/día respectivamente los cuales fueron significativamente más altos que en pacientes homocigotos no expresadores (*CYP3A5**3/*3) con un requerimiento de dosis mediano de 0.07 mg/kg/día; y no fue observada diferencia significativa en la dosis cuando se comparó niños contra adultos [49]. En el presente estudio la población se conformó por 53 receptores pediátricos de trasplante renal y tuvo de manera similar requerimientos de dosis de tacrolimus con medianas de 0.18 mg/kg/día y 0.13 mg/kg/día para portadores de *CYP3A5**1/*1 y *1/*3 respectivamente, y de 0.06 mg/kg/día para portadores de *3/*3. En este contexto tener una guía para dosificar a los pacientes en una manera más individualizada y basada en factores que podrían estar afectando la farmacocinética de tacrolimus cobra una gran importancia.

Aunque las propiedades farmacocinéticas de tacrolimus han sido estudiadas principalmente en adultos, hay quienes han abordado la farmacocinética de tacrolimus en las poblaciones pediátricas y han encontrado que en general CL/F y V/F en niños es cerca de 2 veces más grande con respecto a pacientes adultos [19, 46, 65]. Los resultados del presente trabajo están de acuerdo con los de esos estudios previos.

Además estudios que llevaron a cabo aproximación farmacocinética poblacional han encontrado que variables biológicas y clínicas como Hct, DPO, AST o dosis de prednisona administrada concomitantemente [27, 28, 34, 46, 63, 64, 66], y también polimorfismos de enzimas involucradas en el metabolismo de tacrolimus tales como *CYP3A5**3 y *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A y 3435C>T [46, 47, 63, 64, 66-69] afectaron significativamente la farmacocinética de tacrolimus en sus poblaciones. En el presente trabajo se incluyó en el análisis covariable las mencionadas variables biológicas y clínicas, incluso sobre el modelo final se probaron relaciones

covariables reportadas previamente pero no se encontró efecto significativo de estas (tabla 12), a excepción de *CYP3A5*. Con respecto a lo mencionado antes, valores anormalmente bajos de Hct (<33%) han sido relacionados a una fracción reducida de tacrolimus unido a células rojas y una fracción de plasma incrementada, la cual es más fácilmente metabolizada por el hígado resultando en CL/F de tacrolimus más alta [28, 63, 64]. La concentración de AST se ha identificado como un marcador de daño hepático [70], en la cual cuando es anormalmente alta (≥ 200 U/L) la eliminación hepática de tacrolimus puede estar reducida. En la población de estudio del presente trabajo los valores de Hct y AST estuvieron dentro de lo que es considerado normal con valores medios de $38.4 \pm 5\%$ y 21.4 ± 8.1 U/L respectivamente, lo cual podría explicar la carencia de cambios significativos en CL/F relacionados a estas variables. Similarmente, se ha reportado que dosis muy altas de prednisona (>25 mg/día) incrementan CL/F de tacrolimus hasta 1.6 veces [27], pero en el presente estudio la dosis coadministrada media de prednisona fue 6.7 ± 2.2 mg/día. Además algunos estudios en pacientes adultos [27, 37, 40] y pediátricos [71] han identificado que el incremento en los días post-operatorios (DPO) está relacionado a un incremento en CL/F de tacrolimus probablemente porque inmediatamente después de la cirugía cambios en la motilidad gastrointestinal ocurren y son asociados con alteraciones en el metabolismo de fármacos resultando en CL/F baja. La motilidad gastrointestinal recupera su condición basal dos meses después del trasplante [27], y en el presente trabajo los pacientes estuvieron en una condición estable con un valor medio de DPO de 391.6 ± 327.2 días, por lo que que DPO no se vio como un factor que afectara a la CL/F.

En algunos estudios un modelo de 1 compartimento se ha usado para ajustar los datos [27, 34, 63, 64] probablemente porque sus datos no describieron completamente la farmacocinética del fármaco por tener sólo concentraciones en sangre en valle, pero otros encontraron que un modelo de 2 compartimentos ajustó mejor sus datos [28, 46, 47, 66-68], en el presente trabajo después de probar y comparar diferentes modelos se seleccionó un modelo de 2 compartimentos con absorción y eliminación de primer orden y un tiempo de retraso en la absorción, para

ajustar a los datos. Este modelo fue capaz de describir la absorción, y el valor poblacional estimado de K_a fue 0.52 h^{-1} que es cercano a valores reportados en otros estudios [34, 46]. Además en el modelo final no se estimó el valor de F sino que fue asumido como 100% debido a que sólo se contó con datos de administración oral, pero fue capaz de estimar la variabilidad entre individuos de F , y encontró que el tipo de formulación de tacrolimus tuvo influencia significativa sobre K_a y F .

Otros valores de parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados con el modelo final que están de acuerdo con lo que ha sido reportado en estudios previos son $t_{lag}=0.39 \text{ h}$ [46, 72], $V/F=24.16 \text{ L}$ [46, 66], $V_T/F=383.5 \text{ L}$ [68, 72] y $Q/F=32.49 \text{ L/h}$ [67, 68, 72, 73].

Con respecto a CL/F en este estudio su valor poblacional estimado fue 11.98 L/h que está de acuerdo con lo reportado en otros estudios [46, 47, 63, 68]. Además sólo el genotipo de *CYP3A5* tuvo la influencia suficiente sobre CL/F para ser retenido en el modelo final. Los datos mostraron que la CL/F en pacientes con genotipos *CYP3A5**1/*3 y *1/*1 fue 50% y 92.9% respectivamente más alta que en pacientes con el genotipo *CYP3A5**3/*3 y concuerda con reportes previos donde portadores de *CYP3A5**1/*1 o *1/*3 tuvieron una CL/F hasta 2 o 3 veces más alta que portadores de *CYP3A5**3/*3 [46, 47, 63, 64, 66, 68, 69, 74]. Por otra parte estudios previos [63, 66, 68, 74] al igual que el presente trabajo no encontraron suficiente efecto del genotipo de *ABCB1* sobre la CL/F para ser retenido en el modelo final, sin embargo la influencia de *ABCB1* permanece controversial ya que aunque la mayoría de los estudios no ha encontrado efecto significativo de *ABCB1* sobre la farmacocinética de tacrolimus hay unos pocos que sí han encontrado significancia en esta variable [67, 75]. Adicionalmente el modelo final obtenido en el presente trabajo fue comparado con otros modelos previamente desarrollados en los cuales se reportó efecto significativo sobre la CL/F de tacrolimus de covariables como Hct y DPO [63, 64]. Se comparó el modelo de Han *et al* descrito en el 2013 y se agregó la relación covariable exponencial y de potencia de Hct y DPO,

respectivamente a la CL/F que su modelo reporta como significativa así como también se incluyó una relación exponencial del peso corporal al V/F, además de manera similar se probó la relación potencial de Hct sobre la CL/F reportada por Zuo *et al* en el 2013, en ambos casos las relaciones probadas se agregaron a las que en el presente estudio previamente se observaron como significativas y habían sido retenidas en el modelo final, pero en ninguno de los 2 casos fue observada una mejora en el modelo final (tabla 12). La razón de este resultado muy posiblemente es lo que ya anteriormente se mencionó, en el caso de Hct que sus valores en los pacientes fueron normales, y en cuanto a DPO que los pacientes se encontraban en una condición estable post-trasplante.

En los últimos años hasta el presente ha incrementado el uso de formulaciones genéricas de tacrolimus y otros fármacos inmunosupresores como una alternativa al producto de marca original o innovador, pero dada la importancia de un fármaco como tacrolimus con índice terapéutico estrecho el cual lleva a que variaciones pequeñas en la exposición del fármaco podrían resultar en inmunosupresión reducida o toxicidad del fármaco con efectos adversos potencialmente graves sobre los pacientes, es esencial que las formulaciones genéricas sean idénticas o bioequivalentes al medicamento innovador. En el 2008 Petan *et al* [76] llevaron a cabo un estudio donde analizaron las propiedades fisicoquímicas de cinco formulaciones genéricas contra la formulación innovadora de tacrolimus Prograf®, el cual concluye que las formulaciones genéricas probadas no son bioequivalentes a Prograf®, lo que sugiere que el uso de estos genéricos podría ser un riesgo potencial para los pacientes de trasplante. Además otros estudios han reportado que sustitución en el tratamiento de Prograf® a una formulación genérica resultó principalmente en disminuciones significativas en las concentraciones en sangre de tacrolimus, y que cuando este tipo de cambios en la terapia con tacrolimus u otros fármacos de índice terapéutico estrecho es llevado a cabo requieren de cuidado clínico meticuloso y monitoreo terapéutico [77-79]. En el presente trabajo se tuvieron hallazgos similares, en cuanto a diferencias significativas en la exposición del fármaco entre diferentes formulaciones se refiere, cuantificando la magnitud del

ABC₁₂. Además el tipo de formulación fue incluida en el modelo final. Un estudio reciente encontró disolución y contenido de tacrolimus significativamente más bajos en la formulación genérica Limustin® con respecto al producto innovador [80]. En el presente análisis la relación covariable obtenida en el modelo final entre el tipo de formulación y los parámetros farmacocinéticos K_a y F (ver Ec. 3,5, y tabla 9) probablemente están representando tales limitaciones fisicoquímicas o de calidad entre formulación.

9. CONCLUSIÓN

Un modelo farmacocinético poblacional fue construido y validado para describir el curso temporal de las concentraciones en sangre de 53 receptores pediátricos de trasplante renal quienes en el momento del estudio farmacocinético estaban tomando diferentes formulaciones de tacrolimus incluyendo el producto innovador o algunas formulaciones genéricas. El modelado farmacocinético poblacional incluyó la búsqueda de covariables significativas que pudieran tener efecto sobre los parámetros farmacocinéticos estimados. El genotipo de *CYP3A5* mostró influencia significativa sobre la depuración, también el tipo de formulación de tacrolimus tuvo efecto significativo sobre la constante de absorción y la biodisponibilidad relativa.

Un estimador de la dosis de tacrolimus fue desarrollado en base al modelo farmacocinético poblacional final, el cual se espera pueda ayudar a mejorar la dosificación de rutina en la práctica clínica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calne R. Clinical transplantation: current problems, possible solutions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005;360(1461):1797-801.
2. CENATRA. Informe Anual 2011 sobre donación y trasplante Centro Nacional de Trasplantes, Mexico. 2011. <http://www.cenatra.salud.gob.mx>. Accessed March 12 2012.
3. Murray JE, Tilney NL, Wilson RE. Renal transplantation: a twenty-five year experience. *Ann Surg*. 1976;184(5):565-73.
4. Sayegh MH, Carpenter CB. Transplantation 50 years later—progress, challenges, and promises. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2761-6.
5. CENATRA. Informe Anual 2013 sobre donación y trasplante Centro Nacional de Trasplantes, Mexico. 2013. <http://www.cenatra.salud.gob.mx>. Accessed December 20 2013.
6. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2715-29. doi:10.1056/NEJMra033540.
7. Duncan MD, Wilkes DS. Transplant-related immunosuppression: a review of immunosuppression and pulmonary infections. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(5):449-55.
8. Heilman RL, Mazur MJ, Reddy KS. Immunosuppression in simultaneous pancreas-kidney transplantation: progress to date. *Drugs*. 2010;70(7):793-804. doi:10.2165/11535430-000000000-00000.
9. NAPRTCS. 2010 Annual Transplant Report. 2010. web.emmes.com/study/ped/annlrept/2010_Report.pdf. Accessed January 2011.
10. Sam WJ, Tham LS, Holmes MJ, Aw M, Quak SH, Lee KH et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in whole blood and plasma in asian liver transplant patients. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(1):59-75. doi:10.2165/00003088-200645010-00004.
11. Suzuki N, Sakane T, Tsunematsu T. Effects of a novel immunosuppressive agent, FK506, on human B cell activation. *Clinical and experimental immunology*. 1990;79(2):240-5.
12. Sádaba B, Azanza J, Quetglas EG, Fernández V. Posibles indicaciones del tratamiento de las enfermedades autoinmunes con tacrolimus. *Rev Med Univ Navarra*. 2004;48(3):24-38.
13. Reyes-Pérez H, Medeiros-Domingo M. Uso de tacrolimus en pediatría. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*. 2006;63(4):276-85.
14. de Jonge H, Naesens M, Kuypers DR. New insights into the pharmacokinetics and pharmacodynamics of the calcineurin inhibitors and mycophenolic acid: possible consequences for therapeutic drug monitoring in solid organ transplantation. *Therapeutic drug monitoring*. 2009;31(4):416-35. doi:10.1097/FTD.0b013e3181aa36cd.
15. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(10):623-53.
16. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*. 1995;29(6):404-30.
17. Sadaba B. Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el tras-plante. *Monitoring and secondary effects of immunosuppressants in the transplant*. *An Sist Sanit Navar*. 2006;29(Suplemento 2).
18. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(3):141-75. doi:10.2165/11317350-000000000-00000.

19. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(4):283-95. doi:10.2165/00003088-200140040-00004.
20. Vademecum. Tacrolimus. www.vademecum.es/principios-activos-tacrolimus-l04ad02. Accessed July 2013.
21. Tredger JM, Brown NW, Dhawan A. Immunosuppression in pediatric solid organ transplantation: opportunities, risks, and management. *Pediatric transplantation*. 2006;10(8):879-92. doi:10.1111/j.1399-3046.2006.00604.x.
22. de Jonge H, Kuypers DR. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2008;22(1):6-20. doi:10.1016/j.trre.2007.09.002.
23. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2003;74(3):245-54. doi:10.1016/s0009-9236(03)00168-1.
24. Choi JH, Lee YJ, Jang SB, Lee JE, Kim KH, Park K. Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;64(2):185-91. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02874.x.
25. Williams PJ, Ette EI. The role of population pharmacokinetics in drug development in light of the Food and Drug Administration's 'Guidance for Industry: population pharmacokinetics'. *Clin Pharmacokinet*. 2000;39(6):385-95. doi:10.2165/00003088-200039060-00001.
26. Calvo Malvar M, Benítez Estévez A. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. *Revisión de métodos Química Clínica*. 2004;23(6):417-22.
27. Antignac M, Barrou B, Farinotti R, Lechat P, Urien S. Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;64(6):750-7.
28. Benkali K, Premaud A, Picard N, Rerolle JP, Toupance O, Hoizey G et al. Tacrolimus population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis and Bayesian estimation in renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet*. 2009;48(12):805-16. doi:10.2165/11318080-000000000-00000.
29. Sam WJ, Aw M, Quak SH, Lim SM, Charles BG, Chan SY et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in Asian paediatric liver transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2000;50(6):531-41.
30. Fukatsu S, Yano I, Igarashi T, Hashida T, Takayanagi K, Saito H et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult recipients receiving living-donor liver transplantation. *European journal of clinical pharmacology*. 2001;57(6-7):479-84.
31. Garcia Sanchez MJ, Manzanares C, Santos-Buelga D, Blazquez A, Manzanares J, Urruzuno P et al. Covariate effects on the apparent clearance of tacrolimus in paediatric liver transplant patients undergoing conversion therapy. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40(1):63-71.
32. Staatz CE, Taylor PJ, Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants. *Transplantation*. 2001;72(6):1056-61.
33. Jacobson P, Ng J, Ratanatharathorn V, Uberti J, Brundage RC. Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in hematopoietic cell transplant (HCT) patients. *Bone marrow transplantation*. 2001;28(8):753-8. doi:10.1038/sj.bmt.1703224.
34. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Tett SE. Population pharmacokinetics of tacrolimus in adult kidney transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2002;72(6):660-9. doi:10.1067/mcp.2002.129304.

35. Staatz CE, Tett SE. Comparison of two population pharmacokinetic programs, NONMEM and P-PHARM, for tacrolimus. *European journal of clinical pharmacology*. 2002;58(9):597-605. doi:10.1007/s00228-002-0517-7.
36. Fukudo M, Yano I, Fukatsu S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T et al. Forecasting of blood tacrolimus concentrations based on the Bayesian method in adult patients receiving living-donor liver transplantation. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(13):1161-78.
37. Staatz CE, Willis C, Taylor PJ, Lynch SV, Tett SE. Toward better outcomes with tacrolimus therapy: population pharmacokinetics and individualized dosage prediction in adult liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(2):130-7. doi:10.1053/jlts.2003.50023.
38. Saint-Marcoux F, Knoop C, Debord J, Thiry P, Rousseau A, Estenne M et al. Pharmacokinetic study of tacrolimus in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis lung transplant patients and design of Bayesian estimators using limited sampling strategies. *Clin Pharmacokinet*. 2005;44(12):1317-28. doi:10.2165/00003088-200544120-00010.
39. Zahir H, McLachlan AJ, Nelson A, McCaughan G, Gleeson M, Akhlaghi F. Population pharmacokinetic estimation of tacrolimus apparent clearance in adult liver transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring*. 2005;27(4):422-30.
40. Antignac M, Hulot JS, Boleslawski E, Hannoun L, Touitou Y, Farinotti R et al. Population pharmacokinetics of tacrolimus in full liver transplant patients: modelling of the post-operative clearance. *European journal of clinical pharmacology*. 2005;61(5-6):409-16. doi:10.1007/s00228-005-0933-6.
41. Lee JY, Hahn HJ, Son IJ, Suh KS, Yi NJ, Oh JM et al. Factors affecting the apparent clearance of tacrolimus in Korean adult liver transplant recipients. *Pharmacotherapy*. 2006;26(8):1069-77. doi:10.1592/phco.26.8.1069.
42. Fukudo M, Yano I, Masuda S, Goto M, Uesugi M, Katsura T et al. Population pharmacokinetic and pharmacogenomic analysis of tacrolimus in pediatric living-donor liver transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2006;80(4):331-45. doi:10.1016/j.clpt.2006.06.008.
43. Dansirikul C, Staatz CE, Duffull SB, Taylor PJ, Lynch SV, Tett SE. Relationships of tacrolimus pharmacokinetic measures and adverse outcomes in stable adult liver transplant recipients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2006;31(1):17-25. doi:10.1111/j.1365-2710.2006.00697.x.
44. Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ, Zhang GL. Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2007;32(5):505-15. doi:10.1111/j.1365-2710.2007.00850.x.
45. Zhang GM, Li L, Chen WQ, Bi SS, Liu X, Zhang XL et al. [Population pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant patients]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 2008;43(7):695-701.
46. Zhao W, Elie V, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, Leroy V et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009;86(6):609-18. doi:10.1038/clpt.2009.210.
47. Benkali K, Rostaing L, Premaud A, Woillard JB, Saint-Marcoux F, Urien S et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in renal transplant recipients on a new once-daily formulation. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(10):683-92. doi:10.2165/11535950-000000000-00000.
48. Woillard JB, de Winter BC, Kamar N, Marquet P, Rostaing L, Rousseau A. Population pharmacokinetic model and Bayesian estimator for two tacrolimus formulations--twice daily Prograf and once daily Advagraf. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71(3):391-402. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03837.x.

49. Garcia-Roca P, Medeiros M, Reyes H, Rodriguez-Espino BA, Alberu J, Ortiz L et al. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res.* 2012;43(4):283-7.
50. Beal S, Sheiner L, Boeckmann A. NONMEM Users Guide (1989-2006). Icon Development Solutions. Ellicott City, MD, USA2006.
51. Bauer R. NONMEM Users Guide Introduction to NONMEM 7.2. 0. ICON Development Solutions Ellicott City, MD. 2011.
52. Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, Karlsson MO. Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2007;34(5):711-26. doi:10.1007/s10928-007-9066-0.
53. Jonsson EN, Wade JR, Karlsson MO. Comparison of some practical sampling strategies for population pharmacokinetic studies. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics.* 1996;24(2):245-63.
54. Dartois C, Brendel K, Comets E, Laffont CM, Laveille C, Tranchand B et al. Overview of model-building strategies in population PK/PD analyses: 2002-2004 literature survey. *Br J Clin Pharmacol.* 2007;64(5):603-12. doi:10.1111/j.1365-2125.2007.02975.x.
55. Karlsson MO, Jonsson EN, Wiltse CG, Wade JR. Assumption testing in population pharmacokinetic models: illustrated with an analysis of moxonidine data from congestive heart failure patients. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics.* 1998;26(2):207-46.
56. Troconiz IF, Armenteros S, Planelles MV, Benitez J, Calvo R, Dominguez R. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modelling of the antipyretic effect of two oral formulations of ibuprofen. *Clin Pharmacokinet.* 2000;38(6):505-18. doi:10.2165/00003088-200038060-00004.
57. Lindbom L, Pihlgren P, Jonsson EN. PsN-Toolkit--a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modeling using NONMEM. *Computer methods and programs in biomedicine.* 2005;79(3):241-57. doi:10.1016/j.cmpb.2005.04.005.
58. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic--pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics.* 1992;20(5):511-28.
59. Wahlby U, Jonsson EN, Karlsson MO. Comparison of stepwise covariate model building strategies in population pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis. *AAPS pharmSci.* 2002;4(4):E27. doi:10.1208/ps040427.
60. Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN. Perl-speaks-NONMEM (PsN)--a Perl module for NONMEM related programming. *Computer methods and programs in biomedicine.* 2004;75(2):85-94. doi:10.1016/j.cmpb.2003.11.003.
61. Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose--an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Computer methods and programs in biomedicine.* 1999;58(1):51-64.
62. Team RC. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria2013.
63. Han N, Yun HY, Hong JY, Kim IW, Ji E, Hong SH et al. Prediction of the tacrolimus population pharmacokinetic parameters according to CYP3A5 genotype and clinical factors using NONMEM in adult kidney transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology.* 2013;69(1):53-63. doi:10.1007/s00228-012-1296-4.
64. Zuo XC, Ng CM, Barrett JS, Luo AJ, Zhang BK, Deng CH et al. Effects of CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in Chinese adult renal transplant recipients: a population pharmacokinetic analysis. *Pharmacogenetics and genomics.* 2013;23(5):251-61. doi:10.1097/FPC.0b013e32835fcbb6.

65. Wallemacq PE, Furlan V, Moller A, Schafer A, Stadler P, Firdaous I et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 1998;23(3):367-70.
66. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M et al. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Therapeutic drug monitoring*. 2009;31(2):187-97. doi:10.1097/FTD.0b013e31819c3d6d.
67. Musuamba FT, Mourad M, Haufroid V, Delattre IK, Verbeeck RK, Wallemacq P. Time of drug administration, CYP3A5 and ABCB1 genotypes, and analytical method influence tacrolimus pharmacokinetics: a population pharmacokinetic study. *Therapeutic drug monitoring*. 2009;31(6):734-42. doi:10.1097/FTD.0b013e3181bf8623.
68. Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, Zhong MK. Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. 2011;36(5):614-24. doi:10.1111/j.1365-2710.2010.01206.x.
69. Zhao W, Fakhoury M, Baudouin V, Storme T, Maisin A, Deschenes G et al. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of once daily prolonged-release formulation of tacrolimus in pediatric and adolescent kidney transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology*. 2013;69(2):189-95. doi:10.1007/s00228-012-1330-6.
70. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *The American journal of gastroenterology*. 2003;98(5):960-7. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07486.x.
71. Yasuhara M, Hashida T, Toraguchi M, Hashimoto Y, Kimura M, Inui K et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of FK 506 in pediatric patients receiving living-related donor liver transplantations. *Transplantation proceedings*. 1995;27(1):1108-10.
72. Grover A, Frassetto LA, Benet LZ, Chakkera HA. Pharmacokinetic differences corroborate observed low tacrolimus dosage in Native American renal transplant patients. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2011;39(11):2017-9. doi:10.1124/dmd.111.041350.
73. Gaïes E, Mongi Bacha M, Woillard J-B, Eljebari H, Helal I, Abderrahim E et al. Tacrolimus population pharmacokinetics and bayesian estimation in Tunisian renal transplant recipients. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2013;5.
74. Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplantation proceedings*. 2010;42(9):3455-8. doi:10.1016/j.transproceed.2010.08.063.
75. Wang J, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Zheng H, Iacono A et al. Impact of ABCB1 (MDR1) haplotypes on tacrolimus dosing in adult lung transplant patients who are CYP3A5 *3/*3 non-expressors. *Transplant immunology*. 2006;15(3):235-40. doi:10.1016/j.trim.2005.08.001.
76. Petan JA, Undre N, First MR, Saito K, Ohara T, Iwabe O et al. Physicochemical properties of generic formulations of tacrolimus in Mexico. *Transplantation proceedings*. 2008;40(5):1439-42. doi:10.1016/j.transproceed.2008.03.091.
77. Abdunour HA, Araya CE, Dharnidharka VR. Comparison of generic tacrolimus and Prograf drug levels in a pediatric kidney transplant program: brief communication. *Pediatric transplantation*. 2010;14(8):1007-11. doi:10.1111/j.1399-3046.2010.01393.x.
78. Johnston A, Keown PA, Holt DW. Simple bioequivalence criteria: are they relevant to critical dose drugs? Experience gained from cyclosporine. *Therapeutic drug monitoring*. 1997;19(4):375-81.

79. Johnston A. Equivalence and interchangeability of narrow therapeutic index drugs in organ transplantation. *European journal of hospital pharmacy Science and practice*. 2013;20(5):302-7. doi:10.1136/ejhpharm-2012-000258.
80. 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. (accepted 07-12-2014). *Pediatric transplantation*. 2014.

PRODUCTOS DE LA TESIS

Como productos del presente trabajo de tesis doctoral se derivaron los siguientes:

Estancias académicas

- Estancia doctoral en modelado farmacocinético/farmacodinámico poblacional y farmacometría, en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra (UNAV), Pamplona, España, y bajo cotutoría del Dr. en Farmacia Iñaki Fernández de Trocóniz, profesor adjunto de la mencionada institución. Del 1 de febrero de 2011 al 2 febrero de 2012. Duración: 12 meses.
- 2º estancia doctoral para finalizar objetivos y publicación de artículo resultantes de la tesis doctoral “Análisis farmacocinético poblacional de tacrolimus en pacientes pediátricos con trasplante renal”, en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra (UNAV), Pamplona, España, y bajo cotutoría del Dr. en Farmacia Iñaki Fernández de Trocóniz, profesor adjunto de la mencionada institución. Del 1 de septiembre al 1 octubre de 2013. Duración: 1 mes.

Participación en congresos

- Population Approach Group Europe meeting (PAGE 2011), June 7-10, 2011, Athens, Greece.
- The Second Indiana Clinical and Translational Sciences Institute (CTSI) Symposium on Disease and Therapeutic Response Modeling November 13 - 14, 2012, Indianapolis, Indiana, USA.

- 20° Congreso Latinoamericano de Farmacología y Terapéutica, 5° Congreso Iberoamericano de Farmacología, 5° Congreso Internacional y 11° Congreso Nacional de la Sociedad Cubana de Farmacología “LATINFARMA 2013”, 21-25 de octubre, 2013, La Habana, Cuba.

Artículos

- Jacobo-Cabral CO, García-Roca P, Reyes H, Lozada-Rojas L, Cruz-Antonio L, Medeiros M, Castañeda-Hernández G. Limustin®, a non-innovator tacrolimus formulation, yields reduced drug exposure in pediatric renal transplant recipients. *Pediatric transplantation*. 2014. (**Aceptado 12-07-2014**).
- Jacobo-Cabral CO, García-Roca P, Romero-Tejeda EM, Reyes H, Medeiros M, Castañeda-Hernández G, F-Troconiz I. Population Pharmacokinetic Analysis of Tacrolimus in Mexican Pediatric Renal Transplant Patients: Role of CYP3A5 Genotype and Formulation. (**Próximo a enviar**).

ANEXOS

Anexo 1. Test del modelo final vs modelos de la literatura

Tabla 12. Comparación del modelo final con otros modelos de la literatura.

Modelo final	Modelos de la literatura	Resultados del test	Referencia
$CL = \theta_3 \times [(1), \text{ si } CYP3A5^*3^*3; (1+\theta_8), \text{ si } CYP3A5^*1^*3; \text{ o } (1+\theta_9), \text{ si } CYP3A5^*3^*3]$ si $CYP3A5^*3^*3$, $CL(L/h) = 11.98$ si $CYP3A5^*1^*3$, $CL(L/h) = 17.97$ si $CYP3A5^*1^*1$, $CL(L/h) = 23.12$.	$K_a(h^{-1}) = 4.5$ (valor fijado) $CL = \theta_2 \times \exp(\theta_4 \text{ si } CYP3A5^*1^*3; \theta_3 \text{ si } CYP3A5^*3^*3) \times \exp(\theta_6 \text{ si } LowHct; \theta_7 \text{ si } NormalHct) \times (DPO)^{\theta_8}$	Se probó el modelo covariable de la literatura sobre CL Y V en NONMEM. El efecto de CYP3A5 sobre CL es similar a nuestro modelo, pero no hubo influencia significativa Hct y DPO sobre CL, ni de WTKG sobre V, y no mejoró la OFV del modelo.	Han <i>et al</i> , 2013 [63]
$F = 1 \times e(\theta_{10} \times (DOSE-2) \times [(1) \text{ si FOR es Pro, Fra, Ten; } (1+\theta_{11}) \text{ si FOR es Lim; o } (1+\theta_{12}) \text{ si FOR es Des}] \times \exp(\eta_3)$	$V = \theta_3 \times \exp(\theta_9 \times WTKG/59.025)$		
$K_a = \theta_1 \times [(1), \text{ si FOR es Pro, Fra, o Ten; } (1+\theta_{13}), \text{ si FOR es Lim; o } (1+\theta_{14}), \text{ si FOR es Des}] \times \exp(\eta_1)$		Se probó el modelo covariable de la literatura sobre CL. El efecto de CYP3A5 sobre CL es similar a nuestro modelo, pero no hubo un efecto significativo Hct sobre CL, y no mejoró la OFV del modelo.	Zuo <i>et al</i> , 2013 [64]
$V = \theta_2 \times \exp(\eta_4)$	$CL = 26.6 \times (Hct/27.9)^{-0.451} \times CYP3A$		
$Q = \theta_4$	$CYP3A = \text{actividad combinada de genotipo } CYP3A4 \text{ y } CYP3A5$	*CYP3A4 se asumió como *1/*1 ya que no se contó con suficiente información acerca del genotipo de CYP3A4.	
$V_p = \theta_5$			
$t_{lag} = \theta_6$			
$\text{Error residual} = \theta_7 \times \exp(\eta_2)$			

CYP3A4=genotipo del citocromo P450-4; **CYP3A5**= genotipo del citocromo P450-5; **FOR**=formulación de tacrolimus que podía ser Prograf® (Pro), Limustin® (Lim), Framebin® (Fra), Tenacrine® (Ten) o desconocida (Des); **LowHct**=nivel de hematocrito ≤ 33%; **NormalHct**=nivel de hematocrito > 33%; **OFV**=valor de la función objetivo; **DPO**=días post-operatorios; **t_{lag}**=tiempo de latencia; **WTKG**=peso en kilogramos.

Anexo 2. Script de NONMEM del modelo final

```
$INPUT ID TIME DV AMT DTOT MDV EVID CMT SS II FOR C3A5
$SUBROUTINE ADVAN4 TRANS4
$PK
```

```
;;; KAFOR-DEFINITION START
IF(FOR.EQ.1.OR.FOR.EQ.3.OR.FOR.EQ.4) KAFOR = 1 ; if FOR is PROGRAF, FRAMEBIN or TENACRINE
IF(FOR.EQ.2) KAFOR = ( 1 + THETA(13)) ;LIMUSTIN
IF(FOR.EQ.5) KAFOR = ( 1 + THETA(14)) ;unknown
;;; KAFOR-DEFINITION END
```

```
;;; KA-RELATION START
KACOV=KAFOR
;;; KA-RELATION END
```

```
;;; F1FOR-DEFINITION START
IF(FOR.EQ.1.OR.FOR.EQ.3.OR.FOR.EQ.4) F1FOR = 1 ; if FOR is PROGRAF, FRAMEBIN or TENACRINE
IF(FOR.EQ.2) F1FOR = ( 1 + THETA(11)) ;LIMUSTIN
IF(FOR.EQ.5) F1FOR = ( 1 + THETA(12)) ;unknown
;;; F1FOR-DEFINITION END
```

```
;;; F1DTOT-DEFINITION START
F1DTOT = EXP(THETA(10)*(DTOT - 2.00))
;;; F1DTOT-DEFINITION END
```

```
;;; F1-RELATION START
F1COV=F1DTOT*F1FOR
;;; F1-RELATION END
```

```
;;; CLC3A5-DEFINITION START
IF(C3A5.EQ.3) CLC3A5 = 1 ; Most common
IF(C3A5.EQ.2) CLC3A5 = ( 1 + THETA(8))
IF(C3A5.EQ.1) CLC3A5 = ( 1 + THETA(9))
;;; CLC3A5-DEFINITION END
```

```
;;; CL-RELATION START
CLCOV=CLC3A5
;;; CL-RELATION END
```

```
TVF1=1
TVF1 = F1COV*TVF1
F1=TVF1*EXP(ETA(3))
```

;----- Parameters -----

TVKA=THETA(1)

TVKA = KACOV*TVKA

KA=TVKA*EXP(ETA(1))

TVV2=THETA(2)

V2=TVV2*EXP(ETA(4))

TVCL=THETA(3)

TVCL = CLCOV*TVCL

CL=TVCL ;*EXP(ETA(5))

Q=THETA(4)

V3=THETA(5)

ALAG1=THETA(6)

;----- Scale parameter -----

S2=V2/1000

\$ERROR (OBSERVATION ONLY)

IPRED=LOG(F)

W=THETA(7)*EXP(ETA(2))

IRES=DV-IPRED

IWRES=IRES/W

Y=IPRED+W*EPS(1) ;;ADITIVE, EPS= 1FIX

\$ESTIMATION MAXEVAL=9999 METHOD=1 INTERACTION MSFO=msfb7 PRINT=5

\$COVARIANCE

*Anexo 3. Script de NONMEM de simulación de dosis basada en el modelo final
(Fig. 14)*

```

$INPUT ID TIM2 TIME AMT ADDL II SS DV FOR C3A5
$SUBROUTINE ADVAN4 TRANS4
$PK

;;; KAFOR-DEFINITION START
IF(FOR.EQ.1) KAFOR = 1 ;;IF FOR IS PROGRAF, FRAMEBIN OR TENACRINE
IF(FOR.EQ.2) KAFOR = ( 1 + THETA(11)) ;LIMUSTIN
KACOV=KAFOR

IF(FOR.EQ.1) F1FOR = 1 ; IF FOR IS PROGRAF, FRAMEBIN OR TENACRINE
IF(FOR.EQ.2) F1FOR = ( 1 + THETA(10)) ;LIMUSTIN
F1COV=F1FOR

;;; CLC3A5-DEFINITION START
IF(C3A5.EQ.3) CLC3A5 = 1 ; Most common
IF(C3A5.EQ.2) CLC3A5 = ( 1 + THETA(8))
IF(C3A5.EQ.1) CLC3A5 = ( 1 + THETA(9))
CLCOV=CLC3A5

TVF1=1

TVF1 = F1COV*TVF1
F1=TVF1*EXP(ETA(3))

;----- Parameters -----
TVKA=THETA(1)

TVKA = KACOV*TVKA
KA=TVKA*EXP(ETA(1))

TVV2=THETA(2)
V2=TVV2*EXP(ETA(4))

TVCL=THETA(3)

TVCL = CLCOV*TVCL
CL=TVCL

Q=THETA(4)
V3=THETA(5)

```

ALAG1=THETA(6)

;----- Scale parameter -----
 S2=V2/1000 ;escalar = comp. central AMT= mg

;;-----Calculation of the dose required to Cmin=6 ng/mL at 12 h-----

K10=CL/V2

K12=Q/V2

K21=Q/V3

BETA=0.5*((K12+K21+K10)-SQRT(((K12+K21+K10)**2)-4*K21*K10))

ALFA=(K10*K21)/BETA

AA1=((K21-ALFA)*EXP(-ALFA*(12-0.39)))/((KA-ALFA)*(BETA-ALFA)) ;12-0.39 =T-ALAG1

AA2=((K21-BETA)*EXP(-BETA*(12-0.39)))/((KA-BETA)*(ALFA-BETA))

AA3=((K21-KA)*EXP(-KA*(12-0.39)))/((ALFA-KA)*(BETA-KA))

AAA=AA1+AA2+AA3

DOSS=6*V2/((KA*F1*AAA)*1000*48.2) ;;Target conc. -> ****6ng/ml ***WAS DIVIDED BETWEEN 1000

;;BECAUSE THERE IS ONE ESCALE (S2=V2/1000)

;;patients mean weight (48.2 kg)

§ERROR

W=THETA(7)*EXP(ETA(2))

IF (ICALL.EQ.4) THEN

IF(F.NE.0) Y=LOG(F)+W*EPS(1)

ENDIF

STUD=IREP

§SIMULATION (023467) ONLY SUBPROBLEMS=1000

Anexo 4. Artículo aceptado para su publicación en la revista *Pediatric Transplantation*

Pediatr Transplant 2014

© 2014 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Pediatric Transplantation

DOI: 10.1111/ptr.12335

Limustin[®], a non-innovator tacrolimus formulation, yields reduced drug exposure in pediatric renal transplant recipients

Jacobo-Cabral CO, García-Roca P, Reyes H, Lozada-Rojas L, Cruz-Antonio L, Medeiros M, Castañeda-Hernandez G. (2014) Limustin[®], a non-innovator tacrolimus formulation, yields reduced drug exposure in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transplant*, 000: 000–000. DOI: 10.1111/ptr.12335.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the bioavailability of two oral tacrolimus formulations, the innovator Prograf[®] and a formulation commercialized in Mexico with the brand name Limustin[®], in children. Stable Mexican pediatric renal transplant recipients received the product authorized by their social security provider, being either Prograf[®] or Limustin[®]. At steady state, blood samples were drawn and tacrolimus blood concentration against time curves was constructed. CYP3A5 genotype was also determined. There was no significant difference in dose or in trough concentrations between formulations. However, AUC and C_{max} were significantly higher with Prograf[®]. The lower tacrolimus bioavailability with Limustin[®] was observed in both, expressers and non-expressers of the functional CYP3A5 protein. Dose-normalized AUC values in expressers were 12.7 ± 11.9 and 48.7 ± 20.4 ng-h/mL/mg for Limustin[®] and Prograf[®], whereas in non-expressers, dose-normalized AUC was 54.4 ± 49.1 and 110.4 ± 42.9 ng-h/mL/mg for Limustin[®] and Prograf[®], respectively ($p < 0.05$). Pharmaceutical quality analysis showed that Limustin[®] dissolution at 120 min was $31.1 \pm 6.2\%$ while Prograf[®] dissolution was $100 \pm 4.8\%$. Furthermore, the mean percentage of labeled amount of Limustin[®] and Prograf[®] was $91.0 \pm 3.1\%$ and $100.0 \pm 0.7\%$, respectively. Hence, Limustin[®] exhibits pharmaceutical characteristics dissimilar to the innovator that likely explain the reduced tacrolimus exposure in children. We consider Limustin[®] is not adequate for pediatric use.

Carlos O. Jacobo-Cabral¹, Pilar García-Roca², Herlinda Reyes³, Lucero Lozada-Rojas⁴, Leticia Cruz-Antonio⁴, Mara and Gilberto Castañeda-Hernandez¹

¹Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, DF, Mexico, ²Laboratorio de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, DF, Mexico, ³Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Mexico City, DF, Mexico, ⁴Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, DF, Mexico

Key words: tacrolimus – pediatric – bioavailability – bioequivalence – renal transplant

Gilberto Castañeda-Hernández, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Instituto Politécnico Nacional 2508, Colonia San Pedro Zacatenca, México City, DF 07360, México
Tel.: XXXXXXXX
Fax: XXXXXXXX
E-mail: gcastane@investav.mx
Mara Medeiros, Laboratorio de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Colonia Doctores, México City, DF 06720, México
Tel.: XXXXXXXX
Fax: XXXXXXXX
E-mail: medeiro.mara@gmail.com

Accepted for publication 12 July 2014

The success of organ transplantation is linked to the development of potent immunosuppressive agents aimed to prevent rejection. Most immunosuppressants are considered critical drugs due to their NTI. That is, small differences in dose or blood concentration may lead to serious

therapeutic failures and/or adverse reactions. Therefore, therapeutic drug monitoring is recommended for many of the drugs currently used in transplantation such as calcineurin inhibitors, sirolimus and mycophenolate (1).

Innovator pharmaceutical products only have patent protection for a limited number of years after achieving final approval. After that, generic drugs may be produced by competitors. Generic products of NTI are considered as an opportunity to reduce the costs for specialized treatments. In the USA, which is the largest pharmaceutical

Abbreviations: AUC, area under the curve; CMIA, chemiluminescent microparticle immunoassay; HPLC, high-performance liquid chromatography; NTI, narrow therapeutic index; PCR, polymerase chain reaction.



Jacobo-Cabral et al.

1 market in the world, generic drug prescription
2 has increased from 19% in 1984 to 75% in 2009.
3 The driving factor for this change is that generics
4 with multiple competing firms can cost 70–80%
5 less than reference originator products (2).
6 Generics contain the same active ingredient and
7 are identical in strength, dosage form, and route
8 of administration. A generic is approved by
9 national regulators based on bioequivalence test-
10 ing, considering only bioavailability data result-
11 ing from circulating drug concentrations
12 determined in adult healthy volunteers. It should
13 be noted that data in children are not required, as
14 bioequivalence extrapolation to pediatric patients
15 is automatically assumed. This assumption is not
16 limited to generic immunosuppressants. To
17 obtain a new patent, some companies have devel-
18 oped novel formulations in the field of antirejec-
19 tion medications. For example, Novartis
20 introduced micro-emulsified ciclosporin (3), and
21 Astellas introduced modified-release tacrolimus
22 (4). None of these formulations has documented
23 bioequivalence in children. Hence, switching of
24 formulations in pediatric patients with organ
25 transplantation represents a risk (5, 6).

26 One concern is that in many countries, such as
27 USA and Mexico, bioequivalence is deemed if
28 the 90% confidence intervals of the geometric
29 mean C_{max} and AUC test/reference ratios fall
30 within the limits of 80% to 125%. This range
31 may be too large to ensure efficacy and safety for
32 NTI drugs (7–9). In fact, Canada and the Euro-
33 pean Union have narrowed the bioequivalence
34 criteria for NTI drugs to 90–111.1% (10). As
35 drug formulation is a major source of variability,
36 *in vitro* dissolution testing is considered as a use-
37 ful pharmaceutical quality parameter, particu-
38 larly when a significant *in vitro/in vivo* correlation
39 has been documented (10).

40 Despite the ongoing debate on the suitability
41 of generic immunosuppressive agents for patients
42 with organ transplantation, non-innovator formu-
43 lations are been used at present (4, 8, 11–13).
44 Moreover, generic immunosuppressants are
45 being administrated to pediatric patients,
46 although information on the bioavailability of
47 these products in children is particularly scarce.
48 Our group has reported that a mycophenolate
49 mofetil generic formulation that is bioequivalent
50 in adults also exhibits a comparable bioavailabil-
51 ity with regard to that of the innovator in pedi-
52 atric patients (14). However, this does not appear
53 to be the case for certain generic tacrolimus for-
54 mulations. Abdunour and colleagues observed
55 that tacrolimus trough concentrations might
56 change when pediatric transplant recipients are
57 switched from the innovator to a generic product

available in the USA (15). It should be consid-
ered that the factors that determine tacrolimus
bioavailability differ with age, and therefore,
data cannot be directly extrapolated from the
adult to the pediatric population (7, 16, 17).
Extreme caution is thus indicated when switching
innovator to generic tacrolimus formulations in
children (15).

It has been reported that certain non-inno-
vator immunosuppressive products used in several
countries do not exhibit equivalent pharmaceuti-
cal properties with regard to innovator products
(11, 18–20). Such formulations should not be
considered as generics. The impact of pharmaceu-
tical differences in bioavailability, and specifi-
cally in pediatric patients, remains unknown.
Therefore, we decided to examine tacrolimus bio-
availability after administration of the innovator
and one of these formulations, a product com-
mercialized in Mexico with the brand name
Limustin[®] in children. It should be noted that
the American Society of Transplantation has
encouraged the performance of bioavailability
studies of non-innovator immunosuppressive
products in pediatric patients (21).

For evident ethical reasons, it is not possible
to carry out a bioequivalence study in healthy
children volunteers (21, 22). Therefore, we
studied tacrolimus steady state bioavailability
in a group of stable Mexican pediatric kidney
transplant recipients treated with the immuno-
suppressive medication delivered by their social
security provider. Hence, patients were receiv-
ing either the innovator Prograf[®] or Limustin[®],
according to the provider's drug acquisition
policy. The CYP3A5 genotype of the partici-
pating children was determined, as it is well
known that the expresser/non-expresser pheno-
type plays a significant role in tacrolimus bio-
availability (23). Additionally, pharmaceutical
quality attributes of the two formulations stud-
ied were determined.

Patients and methods

Patients

Pediatric stable renal transplant recipients from the Hospi-
tal Infantil de México Federico Gómez, located at Mexico
City, were invited to participate in this study. The study was
conducted according to the principles of the revised World
Medical Association's Declaration of Helsinki 2008 and
was approved by the Institutional Internal Review Board
and Ethics Committee. Parental written informed consent
and assent of the patient were obtained in all cases. The
study was conducted at least six months post-transplant. All
patients exhibited a stable renal function, defined as no
increment of serum creatinine above 0.2 mg/dL from the
lowest value obtained when the first month post-transplant
was detected.

Tacrolimus formulations

The Hospital Infantil de Mexico receives low socioeconomic-level patients (2) and therefore relies on social security for medication. Patients participating in this study were receiving the tacrolimus formulations authorized by their social security providers. Two oral tacrolimus formulations were hence studied: the innovator Prograf® (Janssen-Cilag, Mexico City, Mexico) and Limustin® (Landsteiner Scientific, Toluca, Mexico), a non-innovator commercialized in Mexico. Limustin® is denoted as *non-innovator*, instead of *generic*, as published data on its bioequivalence are not available and differences in its pharmaceutical properties with regard to the innovator have been reported (19).

Bioavailability study design

All patients received induction with anti-IL2-receptor antibodies. Most patients received a standardized immunosuppressive regimen including tacrolimus, mycophenolate mofetil, and prednisone, while other patients only received tacrolimus and mycophenolate mofetil. Other drugs that the patients could be receiving were verapamil, prazosin, amlodipine, omeprazole, captopril, losartan, trimethoprim-sulfamethoxazole, nystatin, valganciclovir, hydralazine, clonidine, hydrochlorothiazide, loratadine, ambroxol, omega-3, phosphates solution, macrodantin, etc. depending on the etiology of each patient. Concomitant medication is indicated in Table 1. The twice-daily tacrolimus dose (every 12 h) adjustment was performed in accordance with local practice, typically based on monitoring of the trough blood levels to try to maintain these concentrations within a range of 5–10 ng/mL (23). Patients arrived to the hospital facilities to receive their morning tacrolimus dose, after an overnight fast. An indwelling cannula was inserted in a suitable forearm vein, and blood samples were collected from each

Table 1. Demographic data of pediatric renal transplant recipients being treated with two tacrolimus formulations: Prograf® and Limustin®

	Prograf® (n = 29)	Limustin® (n = 9)	p Value*
Age (yr)	14 (12–16)	17 (14.5–17)	0.015
Weight (kg)	42.4 ± 14.4	55.3 ± 15.8	0.027
Height (cm)	147 (140.5–156)	162 (152.1–167.5)	0.008
Gender (n, %)			
Male	17 (58.6%)	8 (88.9%)	0.12
Female	12 (41.4%)	1 (11.1%)	
CYP3A5 genotype† (n, %)			
Expressers	16 (55.2%)	6 (66.7%)	0.70
Non expressers	13 (44.8%)	3 (33.3%)	
Concomitant medications (n, %)			
Mycophenolate mofetil	29 (100%)	9 (100%)	–
Prednisone	23 (79.3%)	9 (100%)	0.30
Verapamil	14 (48.3%)	6 (66.7%)	0.45
Amlodipine	2 (6.9%)	0 (0%)	0.58
Prazosin	2 (6.9%)	1 (11.1%)	0.61

Data are expressed as median (25th, 75th percentile), mean ± SD, or number of patients (n) and percentage (%) for non-continuous data.

†CYP3A5 phenotypes: expressers or *1*3, or non-expressers of the functional protein (*2*3), as determined by genotyping (see text for details). Comparisons were carried out using the Students' *t* test, the Mann-Whitney *U* test or the Fisher exact test, as appropriate.

Non-innovator tacrolimus in children

patient in Vacutainer® tubes with 7.2 mg of K₂EDTA at times 0 (predose), and half, one, two, three, four, six, eight and 12 h after the morning-daily tacrolimus dosing. Blood samples were stored at –70 °C until analysis. Sampling was started at 8:00 am. Breakfast, lunch, and dinner were provided at 10:00 am, 1:00 pm, and 7:00 pm, respectively. There was no restriction in water intake or administration of concomitant medications indicated by the clinical staff (Table 1).

Bioavailability parameters were determined as described by Reyes and colleagues (26). Briefly, tacrolimus blood concentration against time curves was constructed for each patient, and peak (*C*_{max}) and trough (*C*₀) concentrations were directly determined from these plots. The AUC from 0 to 12 h was estimated by the trapezoidal rule.

Assay of tacrolimus

Concentrations of tacrolimus in whole blood were assessed using the CMIA in an ARCHITECT system (Abbott Laboratories; Abbott Park, IL, USA), according to manufacturer's information (23).

Genotyping of CYP3A5

DNA was obtained from peripheral blood cells using QIA-amp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the recommendations of the manufacturer. *CYP3A5*/*1/*3 genotyping was performed by amplification through PCR and subsequent DNA sequencing. DNA concentration was measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). We designed PCR primers to flank the *CYP3A5*/*1/*3 polymorphisms (dbSNP: rs776746, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), using the *CYP3A5* ENSG00000106258 sequence as reference (Ensembl release 65-Dec 2011© WTSI/EBI <http://www.ensembl.org/index.html>), and the Primer3 software (27) (<http://frodo.wi.mit.edu/>). The amplicon size was 211 bp. Primer sequences were as follows: forward 5'-TTATGGAGAGTGGCATAGGAG-3', primer reverse 5'-GGTTCAGTTCATTAGGGTGTG-3'.

PCR was set up as follows: 2.5 mM of MgCl₂, 1× of PCR buffer, 0.2 mM of dNTP Mix, one unit of Taq Platinum DNA polymerase, 3.5 pmol of each primer (forward and reverse), and 100 ng of DNA; reactions were adjusted to 20 µL with DNase free water. All reagents were purchased from Invitrogen (Life Technologies Corporation, Mexico City, DF, Mexico). PCR included an initial incubation at 95 °C for five min followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, and 72 °C for 75 s.

We removed unincorporated primers and nucleotides with ExoSAP-IT (USB, Affymetrix, Inc., Cleveland, OH, USA) according to supplier specifications.

Sequencing reaction was performed using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies Corporation). Sequencing reaction was set up as follows: 100 ng of PCR product, 8 µL of BigDye mix, and 3 pmol of primer; reactions were adjusted to 20 µL with DNase free water. Sequencing reaction starts with an incubation at 95 °C for five min followed by 35 cycles at 95 °C for 30 s and 57 °C for four min. The sequencing reaction was purified using Centri-Sep columns (Princeton, Separations, Inc., Foster City, CA, USA), according to supplier specifications. The purified samples were mixed with 15 mL of Hi-Di Formamide (Life Technologies Corporation), incubated at 96 °C for two and half min and chilled at 4 °C. The analysis

Jacobo-Cabral et al.

was performed on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation). Obtained sequences were compared with the reference to characterize the polymorphisms present in each patient.

Accordingly, children presenting the homozygous *CYP3A5*1/*1* or the heterozygous *CYP3A5*1/*3* genotypes were considered to be expressers of the functional *CYP3A5* protein, while children exhibiting the homozygous *CYP3A5*3/*3* genotype were considered as non-expressers (23, 28).

Pharmaceutical quality attributes

Prograf[®] (batch 5D5020E) and Limustin[®] (batch LPTI-SO9E023) 5 mg tacrolimus capsules were purchased from a local pharmacy. The content of the active ingredient was quantitated by HPLC. Briefly, analyses were performed on LaChrom Elite[®] HPLC system (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) equipped with a reversed phase Novapak C₁₈ 3.9 × 150 mm column 4 μm (Waters Assoc., Milford, MA, USA) eluted with a mobile phase consisting of a mixture of HPLC grade water and methanol (15:85) at a flow rate of 0.5 mL/min. The column was kept at room temperature. The effluent of the column was monitored by UV detection at 230 nm.

Tacrolimus dissolution was studied using the method described in the Food and Drug Administration Dissolution Data Base (29). Briefly, a USP apparatus II (paddle) with a rotation speed of 50 RPM was employed. Capsules were placed in 900 mL of dissolution medium at a temperature of 37.0 ± 0.5 °C and a pH of 4.5. Samples were drawn at 15, 30, 60, 90, and 120 min, and the tacrolimus concentration in these samples was determined by the HPLC procedure mentioned above.

Statistical analysis

Data were tested for normal distribution using D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Results are expressed as mean ± s.d. or median (25th, 75th percentile) values. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California). Comparisons between groups were performed using Student's *t*-test or Mann-Whitney, as appropriate according to the normality test. *p* Values of <0.05 were considered to be statistically significant.

AUC, apparent oral clearance (CL/F), and other pharmacokinetic parameters were calculated using a non-compartmental method with Phoenix 64 WinNonlin software version 6.3 (Pharsight, St. Louis, MO, USA). AUC was calculated using the linear trapezoidal/Log interpolation method.

Results

A total of 38 pediatric patients with stable kidney transplant function were included in this study. Twenty-nine patients were receiving the innovator tacrolimus formulation (Prograf[®]), while nine patients were receiving Limustin[®]. All patients were at steady state, having received the same tacrolimus dose for at least one month. Demographic data are shown in Table 1. Children taking Limustin[®] were older, and thus

heavier and taller. There was a higher proportion (88.9%) of males in the Limustin[®] group, with regard to the Prograf[®] group (58.6%). Nineteen children were considered as expressers of the functional *CYP3A5* protein, the additional 19 patients being non-expressers. With respect to the immunosuppressive regime, all children received mycophenolate mofetil, in addition to tacrolimus. Prednisone was used in 79.3% and 100% of the patients treated with Prograf[®] or Limustin[®], respectively.

Data observed in the 38 children studied treated with either Prograf[®] or Limustin[®] are shown in Fig. 1 and Table 2. Tacrolimus blood concentrations were higher with the innovator; despite that there was no significant difference in C₀

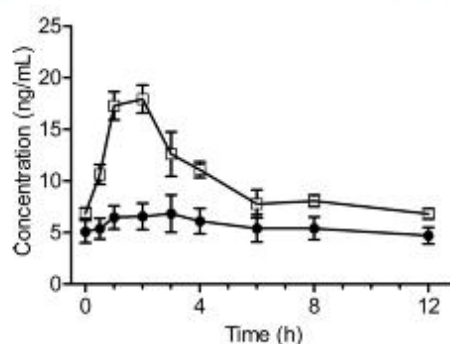


Fig. 1. Tacrolimus whole-blood concentrations (mean ± s.e.m.) observed in stable pediatric renal transplant recipients treated with Prograf[®] (□) or Limustin[®] (●).

Table 2. Tacrolimus bioavailability parameters observed in stable pediatric transplant recipients treated with Prograf[®] and Limustin[®]

Formulation	Prograf [®] (n = 29)	Limustin [®] (n = 9)	<i>p</i> Value
Dose (mg)	2.1 ± 1.2	2.8 ± 1.8	0.2
Dose (mg/kg)	0.06 ± 0.05	0.055 ± 0.04	0.8
AUC (ng·h/mL)	125 ± 43.3	65.8 ± 39.05***	0.0009
AUC/Dose (ng·h/mL/mg)	76.4 ± 44.6	40.5 ± 44.4*	0.04
C _{max} (ng/mL)	19.8 ± 7.3	7.0 ± 3.8***	<0.0001
C _{max} /Dose (ng/mL/mg)	11.6 ± 5.7	4.2 ± 4.3**	0.0011
C ₀ (ng/mL)	6.9 ± 2.7	5.1 ± 3.3	0.09
CL/F (L/h)	17.5 ± 9.5	67.3 ± 80.7**	0.0019
CL/F/Wt (L/h/kg)	0.5 ± 0.4	1.5 ± 2.1*	0.018
CL/F/BSA (L/h/m ²)	14.7 ± 9.3	48.7 ± 65.2**	0.008

Bioavailability was determined at steady state. AUC corresponds to the area under the curve from zero to 12 h. Data are presented as mean ± SD. Comparisons between the Prograf[®] and Limustin[®] groups were carried out by the Student's *t* test. Statistically significant differences are indicated as: **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. BSA = body surface area; Wt = weight.

values or in dose between formulations. AUC and C_{max} values were significantly lower with Limustin[®] than with Prograf[®], indicating a reduced drug exposure. Similar results were obtained when patients were classified as expresser or non-expressers of the functional CYP3A5 protein (Fig. 2, Table 3). For the two phenotypes, tacrolimus blood concentrations, as well as AUC and C_{max} values, were higher with Prograf[®] than with Limustin[®], while no significant difference between formulations was detected in C_0 . Furthermore, dose-normalized AUC and C_{max} , as well as weight-normalized and body surface-normalized CL/F (CL/F/Wt and CL/F/BSA, respectively), were calculated. We observed significantly higher values of AUC/Dose and C_{max} /Dose for individuals receiving Prograf[®]

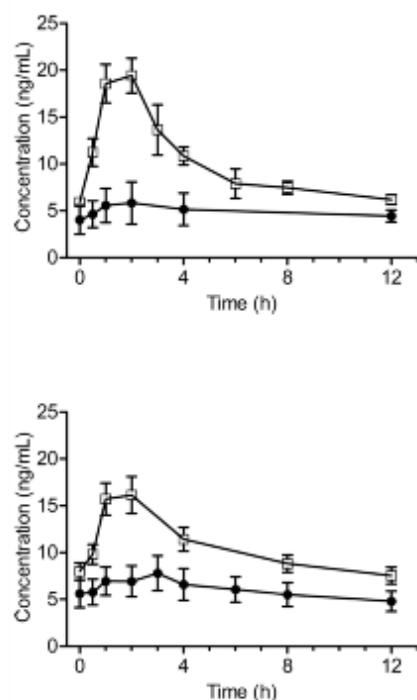


Fig. 2. Tacrolimus whole-blood concentrations (mean \pm s.e.m.) observed in stable pediatric renal transplant recipients treated with Prograf[®] (□) or Limustin[®] (●), according to CYP3A5 phenotype. (a) Expressers of the functional CYP3A5 protein (genotypes CYP3A5*1/*1 and CYP3A5*1/*3). (b) Non-expressers of the functional CYP3A5 protein (genotype CYP3A5*3/*3).

Non-innovator tacrolimus in children

than those receiving Limustin[®] in both CYP3A5 expressers and non-expressers. For both tacrolimus formulations, the values of AUC/dose and C_{max} /dose were higher in CYP3A5 non-expressers than CYP3A5 expressers. CL/F/Wt values were significantly higher in patients receiving Limustin[®] than in those receiving Prograf[®]. This was also the case for CL/F/BSA. In CYP3A5 expresser patients, the Limustin[®] dose in mg was significantly higher than that of Prograf[®]. Nonetheless, when dose was expressed as mg/kg, the difference did not achieve statistical significance. For the two formulations, the used tacrolimus doses were higher for patients with the expresser phenotype compared with non-expressers.

Pharmaceutical quality attributes are shown in Fig. 3. Tacrolimus content in Prograf[®] and Limustin[®] was $100.0 \pm 0.7\%$ and $91.0 \pm 3.1\%$ of the label claim (5 mg), respectively. This difference achieved statistical significance when compared by the Student *t*-test. It can also be appreciated that the dissolution profiles of the two assayed formulations were markedly different. Tacrolimus released from Limustin[®] was impaired with regard to Prograf[®]. At 120 min, Prograf[®] achieved 100% dissolution, while dissolution with Limustin[®] was 31% of the label claim.

Discussion

We observed that tacrolimus exposure with Limustin[®] was reduced with regard to Prograf[®]. AUC, and C_{max} values with the innovator were about twice higher, despite a lack of significant difference in dose and in C_0 . The lack of differences in C_0 was expected, as the clinical staff adjusted tacrolimus dosing with the purpose of maintaining trough tacrolimus blood concentrations in the 5–10 ng/mL range (23). Although other studies suggest a reasonable correlation between trough levels and AUC (30), our results confirm that trough concentration is not a good indicator of tacrolimus exposure in pediatric patients (17, 31). Other strategies should be used for tacrolimus therapeutic monitoring, especially when formulations other than the innovator are administered.

In the present study, tacrolimus bioavailability was examined in pediatric patients. It should be noted that a bioequivalence study in healthy children volunteers is not feasible, due to ethical concerns (21, 32). The strength of the study is that a nine-point PK profile was obtained, allowing an accurate estimation of bioavailability parameters. Furthermore, data were controlled by CYP3A5 genotype and *in vitro* dissolution

Jacobo-Cabral et al.

Table 3. Tacrolimus bioavailability parameters observed in stable pediatric transplant recipients who were expressers or non-expresser of the CYP3A5 functional protein treated with Prograf[®] and Limustin[®]

Phenotype formulation	CYP3A5 expresser		CYP3A5 non-expresser	
	Prograf [®] (n = 16)	Limustin [®] (n = 3)	Prograf [®] (n = 13)	Limustin [®] (n = 6)
Dose (mg)	2.8 ± 1.2	4.8 ± 1.3*	1.3 ± 0.6	1.8 ± 0.9
Dose (mg/kg)	0.09 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.032 ± 0.02
AUC (ng·h/mL)	121.9 ± 41.2	53.8 ± 38.4*	127.8 ± 47.2	71.7 ± 41.1*
AUC/Dose (ng·h/mL/mg)	48.7 ± 20.4	12.7 ± 11.9**	110.4 ± 42.9	54.4 ± 48.1*
C _{max} (ng/mL)	21.7 ± 7.5	6.03 ± 3.8**	17.4 ± 6.5	7.5 ± 4.02**
C _{max} /Dose (ng/mL/mg)	8.8 ± 4.1	1.4 ± 1.3**	15 ± 5.7	5.61 ± 4.7**
C ₀ (ng/mL)	6.1 ± 1.8	4.03 ± 2.7	8.0 ± 3.3	5.6 ± 3.6
CL/F (L/h)	23.5 ± 8.7	135.8 ± 117.3***	10.1 ± 3.3	33.04 ± 26.4**
CL/F/Wt (L/h/kg)	0.71 ± 0.4	3.2 ± 3.3**	0.23 ± 0.08	0.7 ± 0.6*
CL/F/BSA (L/h/m ²)	20.6 ± 8.6	101.4 ± 99.3**	7.5 ± 2.3	22.4 ± 19.3*

Bioavailability was determined at steady state. AUC corresponds to the area under the curve from zero to 12 h. Data are presented as mean ± SD. Comparisons between the Prograf[®] and Limustin[®] groups were carried out by the Student's *t* test. Statistically significant differences are indicated as: **p* < 0.05, ***p* < 0.01 and ****p* < 0.001. BSA = body surface area; Wt = body weight.

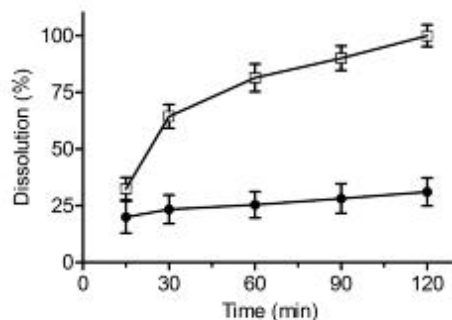


Fig. 3. Dissolution profiles at a pH of 1.2 and a temperature of 37.0 ± 0.5 °C of Prograf[®] (○) and Limustin[®] (●). Data are presented as mean ± s.e.m. of 12 tablets.

information is provided. Our design, however, also exhibits limitations that should be noted. A parallel group design was used. A crossover design is more appropriate for bioavailability comparisons between formulations. However, we chose not to use a crossover design as immunosuppressant formulation switching is not recommended during treatment of organ transplant recipients and pediatric patients are considered as a high-risk population (21). Hence, tacrolimus formulations were not assigned by randomization, but decided by the social security provider. Children taking Limustin[®] were older than those in the Prograf[®] group. It has been reported that tacrolimus bioavailability increases with age, younger children requiring higher doses to achieve the same AUC (17). As there was no significant difference in the tacrolimus dose, a higher AUC could be expected in patients taking Limustin[®]. However, opposite results were

obtained. On the other hand, the proportion of male patients was higher in the Limustin[®] group. Population pharmacokinetic studies, however, have shown that gender has no influence on tacrolimus exposure (28, 33). Hence, the lower bioavailability observed with Limustin[®] cannot be explained by differences in age or gender.

The higher tacrolimus bioavailability yielded by Prograf[®] was observed in both, expressers or non-expressers of the functional CYP3A5 protein, according to genotyping. Hence, it appears that the lower tacrolimus exposure observed with Limustin[®] cannot be attributed to a phenotype misdistribution between the two groups. Phenotype, however, was an important determinant of the tacrolimus dose. As previously reported in Mexican pediatric and adult patients, doses required to achieve target trough levels were higher in expressers than in non-expressers (23). Other factor that must be considered is the immunosuppressive regimen, as it has been documented that comedication alters tacrolimus bioavailability in pediatric transplant recipients (7, 16, 17, 34). All children studied were taking mycophenolate mofetil. Therefore, the influence of this drug on tacrolimus exposure with Prograf[®] or Limustin[®] was balanced and does not likely underlie the observed differences in bioavailability between formulations. On the other hand, all children treated with Limustin[®], but only 79.3% of those taking Prograf[®], were receiving prednisone. It has been reported that glucocorticoids are inducers of CYP3A and thus increase tacrolimus metabolism (17). However, as most patients in both groups were receiving concomitant prednisone, the impaired tacrolimus exposure observed with Limustin[®] does not likely appear to be due to a steroid interaction.

Non-innovator tacrolimus in children

1 Tacrolimus is a class II drug in the biopharma-
2 ceutical classification system (35). That is, it
3 exhibits low solubility and high permeability.
4 Therefore, drug dissolution in the gastrointesti-
5 nal tract is a rate-controlling step for absorption
6 (36). Hence, the pharmaceutical formulation is of
7 paramount importance to yield an adequate bio-
8 availability (19, 35). It has been reported that
9 several non-innovator formulations from differ-
10 ent countries exhibit different dissolution param-
11 eters with regard to the innovator, Limustin[®],
12 being one of such products (19). In the present
13 study, we have confirmed the presence of such
14 dissimilarities, as the dissolution of Limustin[®],
15 determined according to the FDA recommended
16 methodology, was impaired compared to Prograf[®].
17 It was also observed that the tacrolimus
18 content in Limustin[®] was decreased with regard
19 to Prograf[®]. However, the magnitude of the
20 reduction in drug content does not explain the
21 marked differences observed in the dissolution
22 profile, as it can be clearly appreciated in Fig. 3.
23 Our results suggest that the reduction in tacroli-
24 mus dissolution is due to the pharmaceutical
25 technology employed in the manufacture of
26 Limustin[®]. Limustin[®]-impaired dissolution is
27 consistent with the reduced bioavailability that
28 we observed in children. It is likely that such
29 reduction in exposure should also be observed in
30 adult healthy volunteers and transplant patients.
31 However, as no published study on Limustin[®]
32 bioequivalence is available, the bioavailability of
33 this formulation in adults remains unknown.

34 The reduced AUC and C_{max} values that we
35 observed with Limustin[®] in children are likely
36 the outcome of a low amount of drug dissolved
37 in the gastrointestinal lumen limiting the extent
38 of absorption (35, 36). As a result of the slow
39 release rate of Limustin[®], absorption is delayed
40 and lasts for a longer period with regard to
41 the faster dissolution of Prograf[®]. Hence, the blood
42 concentration against time curve of Limustin[®] is
43 flatter, and comparable trough levels can be
44 attained despite important differences in AUC
45 and C_{max} . This has been shown to be the case
46 with nimesulide. Nimesulide, as tacrolimus, is a
47 class II drug in the biopharmaceutical classifica-
48 tion system (37, 38). It has been reported that a
49 non-innovator nimesulide formulation commer-
50 cialized in Italy that exhibits a lower and delayed
51 dissolution results in reduced bioavailability.
52 Lower AUC and C_{max} are obtained, despite com-
53 parable trough concentrations; that is, 12 h as
54 nimesulide is given b.i.d., with regard to the
55 innovator (38).

56 In conclusion, the data here presented provide
57 evidence that Limustin[®], an oral non-innovator

tacrolimus formulation commercialized in Mex-
ico, is not suitable for pediatric use as it pro-
vides a reduced exposure in children. The
impact of the low exposure in the transplant/
patient outcome (graft survival, rejection epi-
sodes, death) is not known; Abdounour
reported that in four children inadvertently
switched to generic formulations of tacrolimus,
one of them had biopsy proven acute rejection
despite the trough levels being similar with the
generic and Prograf[®] (15). Hence, insufficient
tacrolimus exposure can occur when switching
from tacrolimus innovator to a generic. There-
fore, extreme caution must be taken when
switching immunosuppressive formulations in
pediatric patients submitted to organ transplan-
tation due to the lack of information about bio-
availability in children. This applies not only to
generics, but also to novel modified-release inno-
vator formulations (3, 4).

Our results support the position of the Ameri-
can Society of Transplantation on performing
bioavailability studies of non-innovator immu-
nosuppressant formulations in children (21).
Such studies, although urgently needed, are sel-
dom performed at present. Moreover, regulatory
agencies in Mexico, as well as in other countries,
should consider the use of stricter bioequivalence
criteria for NTI drugs, including immunosup-
pressive agents, as it is the case in Europe and
Canada. Formulations that not comply with
such strict criteria for immunosuppressants
should not be used (39).

Acknowledgments

This study was supported by CONACYT, grant 181368,
FOSSIS/CONACYT 2008/COI/8727, and Hospital Infantil
de México HIM/2011/026. Carlos O. Jacobo-Cabral is a
CONACYT fellow. Mara Medeiros received a CONACYT
grant 205627.

References

1. WEHR LT. Therapeutic drug monitoring in pediatric renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2014; ???-???.
2. KARAMEHC J, RUDIC O, RUDIC G, et al. Financial aspects and the future of the pharmaceutical industry in the United States of America. *Mater Sociomed* 2013; 25: 286-290.
3. DUNN CJ, WAUSTAFF AJ, PERRY CM, PLOSKER GL, GOA KL. Cyclosporin: An updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral) in organ transplantation. *Drugs* 2001; 61: 1957-2016.
4. SILVA HT Jr, YANG HC, MEIER-KRIESCHE HU, et al. Long-term follow-up of a phase iii clinical trial comparing tacrolimus extended-release/MMF, Tacrolimus/MMF, and Cyclosporine/MMF in de novo kidney transplant recipients. *Transplantation* 2014; 97: 636-641.
5. BENNETT WM, DEMATTOS A, NORMAN DJ, MEYER MM, OLYAEI A. Which cyclosporin formulation? *Lancet* 1996; 348: 205.

Jacobo-Cabral et al.

6. FILLER G, EHRRICH J. Which cyclosporin formulation? *Lancet* 1996; 348: 1176-1177.
7. del MAR FERNÁNDEZ DE GATTA M, SANTOS-BUELGIA D, DOMÍNGUEZ-GIL A, GARCÍA MJ. Immunosuppressive therapy for paediatric transplant patients: Pharmacokinetic considerations. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41: 115-135.
8. PONDROM S. Can generics be trusted? *Am J Transplant* 2010; 10: 708-709.
9. van GELDER T. Substitution EACoG. European Society for Organ Transplantation Advisory Committee recommendations on generic substitution of immunosuppressive drugs. *Transpl Int* 2011; 24: 1135-1141.
10. PALYLYK-COLWELL E, JAMALI F, DRYDEN W, et al. Bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences discussion. *J Pharm Pharm Sci* 1998; 1: 2-7.
11. AL AMERI MN, WHITTAKER C, TUCKER A, YAQOUB M, JOHNSTON A. A survey to determine the views of renal transplant patients on generic substitution in the UK. *Transpl Int* 2011; 24: 770-779.
12. SOMMERS CD, PANG ES, GHASRIANI H, et al. Analyses of marketplace tacrolimus drug product quality: Bioactivity, NMR and LC-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2013; 85: 108-117.
13. van GELDER T, GABARDI S. Methods, strengths, weaknesses, and limitations of bioequivalence tests with special regard to immunosuppressive drugs. *Transpl Int* 2013; 26: 771-777.
14. GONZÁLEZ-RAMÍREZ R, GONZÁLEZ-BANUELOS J, VILLA MS, et al. Bioavailability of a generic of the immunosuppressive agent mycophenolate mofetil in pediatric patients. *Pediatr Transplant* 2014; ???-???
15. ABUOLNOUR HA, ARAYA CE, DHARNDHARAKA VR. Comparison of generic tacrolimus and Prograf drug levels in a pediatric kidney transplant program: Brief communication. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 1007-1011.
16. WALLEMACQ PE, VERBECK RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40: 283-295.
17. KIM JS, AVILES DH, SILVERSTEIN DM, LEBLANC PL, MATTI VEHÄKARI V. Effect of age, ethnicity, and glucocorticoid use on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric renal transplant patients. *Pediatr Transplant* 2005; 9: 162-169.
18. ESQUIVEL A, GONZÁLEZ-RAMÍREZ R, ALBERU J, GRACIDA C, MEDEIROS M, CASTANEDA-HERNÁNDEZ G. Comparison of dissolution properties of 2 enteric-coated formulations containing mycophenolate sodium: Myfortic vs Femulan. *Transplant Proc* 2010; 42: 353-356.
19. PETAN JA, UNDRÉ N, FIRST MR, et al. Physicochemical properties of generic formulations of tacrolimus in Mexico. *Transplant Proc* 2008; 40: 1439-1442.
20. SHIBATA H, SAITO H, KAWANISHI T, OKUDA H, YOMOTA C. Comparison of particle size and dispersion state among commercial cyclosporine formulations and their effects on pharmacokinetics in rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2012; 60: 967-975.
21. ALLOWAY RR, ISAACS R, LAKE K, et al. Report of the American Society of Transplantation conference on immunosuppressive drugs and the use of generic immunosuppressants. *Am J Transplant* 2003; 3: 1211-1215.
22. World Health Organization. Pediatric Clinical Trials Guidance for Assessors, June 2001. Available at: <http://www.who.int/childmedicines/CTguidance.pdf> (accessed April 28, 2014).
23. GARCÍA-ROCA P, MEDEIROS M, REYES H, et al. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res* 2012; 43: 283-287.
24. CANTU G, RODRÍGUEZ G, LUQUE-COQUI M, et al. Analysis of socio-demographic features of patients with end stage chronic renal disease: Differences in a six year period. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2012; 69: 290-294.
25. ESQUIVEL A, GONZÁLEZ R, ALBERU J, GRACIDA C, MEDEIROS M, CASTANEDA-HERNÁNDEZ G. Intimidation against renal transplantation scientist. *Rev Invest Clin* 2012; 64: 215-219.
26. REYES H, HERNÁNDEZ AM, VALVERDE S, et al. Efficacy and safety of conversion of mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in Mexican renal transplant children. *Pediatr Transplant* 2010; 14: 746-752.
27. ROZEN S, SKALETSKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132: 365-386.
28. HAN N, YUN HY, HONG JY, et al. Prediction of the tacrolimus population pharmacokinetic parameters according to CYP3A5 genotype and clinical factors using NONMEM in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 53-63.
29. Food and Drug Administration. FDA-Recommended Dissolution Methods. Available at <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cde/dissolution/index.cfm> (accessed April 28, 2014).
30. FILLER G, GRUYAS R, MAI L, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK 506) in children and adolescents with renal transplants. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1668-1671.
31. CLAEYS T, VAN DYCK M, VAN DAMME-LOMBAERTS R. Pharmacokinetics of tacrolimus in stable paediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 335-342.
32. HOPP K. Patient recruitment-European perspective. *Pediatrics* 1999; 104: 623-626.
33. SAINT-MARCOUX F, WORLARD JB, JURADO C, MARQUET P. Lessons from routine dose adjustment of tacrolimus in renal transplant patients based on global exposure. *Ther Drug Monit* 2013; 35: 322-327.
34. SAAVEDRA SI, SASSO AJ, QUINONES SL, et al. Relative bioavailability study of two oral formulations of mycophenolate mofetil in healthy volunteers. *Rev Med Chil* 2011; 139: 902-908.
35. BORHÁDE V, NAIK H, HEGDE D. Design and evaluation of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) of tacrolimus. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9: 13-21.
36. LORENBERG R, AMIDON GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 3-12.
37. PURCAREU SO, IONESCU M, RANETI C, ANUTA V, MRCIOIU I, BELU I. Study of Nimesulide release from solid pharmaceutical formulations in Tween 80 solutions. *Curr Health Sci J* 2010; 40: 43-47.
38. HUTT V, WAITZINGER J, MACCHI F. Comparative bioavailability study of two different nimesulide-containing preparations available in the Italian market. *Clin Drug Invest* 2001; 21: 361-369.
39. JOHNSTON A. Equivalence and interchangeability of narrow therapeutic index drugs in organ transplantation. *Eur J Hosp Pharm Sci Pract* 2013; 20: 302-307.