

00594 N:4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO 2 E;



FACULTAD DE QUIMICA 4722 0112

ESTUDIO DE CRONOFARMACOCINETICA
DE CICLOSPORINA EN EL ESTADO
ESTACIONARIO EN PACIENTES CON
TRASPLANTE RENAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A :
Q.B.P. MA. DEL SOCORRO CECILIA REYNA RODRIGUEZ

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA :

Presidente: M. en C. Adriana Domínguez R.
Primer vocal: M. en C. Dinora Fabiola González.
Secretario: Dra. Rebecca Franco Bourland.
Primer suplente: M. en C. Inés Fuentes Noriega.
Segundo suplente: Q. F. B. Eva Hilda González.

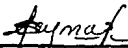
Sitio donde se desarrollo el tema:

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
IGNACIO CHAVEZ.

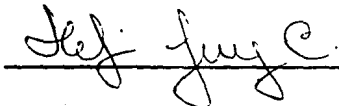
DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA - LABORATORIO DE QUIMICA.

SUSTENTANTE:

Q.B.P. MA. DEL SOCORRO CECILIA REYNA RODRIGUEZ.



ASESOR DEL TEMA: M. en C. HELGI JUNG COOK



AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Helgi Jung Cook por sus aportaciones en el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por su enseñanza, tiempo y amistad.

Al Dr. Pedro Reyes López y a la Q.F.B. Eva Hilda González por su gran apoyo y confianza.

Al Dr. Guillermo Mondragón por su colaboración incondicional.

Al personal del Laboratorio de Química del INCICH por su apoyo y cooperación.

DEDICATORIA

Con amor y cariño a mis padres: Alfonso Reyna L. (qpd)
Socorro Rodríguez R.

Al Q.E.P. Luis Franco Miranda, por la importancia
decisiva que ha tenido su presencia en mi vida.

Indice General.

	Página
I.- Introducción.	1
1.1. Ciclosporina (CsA).	3
1.1.1. Mecanismo de Acción.	5
1.1.2. Propiedades farmacocinéticas.	5
1.1.2.1. Absorción.	5
1.1.2.2. Cinética de disposición.	6
1.1.2.3. Depuración (Cl).	6
1.1.2.4. Distribución.	7
1.1.2.5. Tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$).	8
1.1.3. Toxicidad y complicaciones.	8
1.1.3.1. Toxicidad renal.	8
1.1.3.2. Toxicidad hepática.	9
1.1.3.3. Hipertensión.	9
1.1.4. Monitoreo terapéutico de la ciclosporina.	9
II.- Material y Métodos.	12
2.1. Método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre.	12
2.1.1. Descripción del método.	12
2.1.2. Reactivos.	14
2.1.3. Equipo.	14
2.1.4. Procedimiento del ensayo.	14
2.1.4.1. Fase de extracción.	14
2.1.4.2. Fase de reacción antígeno-anticuerpo.	15
2.1.5. Cálculo de la curva de calibración.	18
2.2. Estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina.	19
2.2.1. Selección de individuos.	19
2.2.2. Estudio farmacocinético de ciclosporina en el estado estacionario.	19
2.2.2.1. Protocolo.	19
2.2.2.2. Análisis farmacocinético de los datos.	20
2.2.2.3. Tratamiento estadístico de los datos.	20
III.- Resultados.	25
3.1. Validación del método analítico (Radioinmunoensayo) para la cuantificación de ciclosporina en sangre total.	25
3.2. Control de calidad interno.	25

3.2.1. Control de calidad inter-análisis.	25
3.2.1.1. Evaluación de la curva dosis-respuesta.	25
3.2.1.2. Muestras de control de calidad o muestras testigo.	26
3.3. Estudio de cronofarmacocinética <u>in vivo</u> de ciclosporina en pacientes con trasplante renal.	26
3.4. Parámetros farmacocinéticos de Ciclosporina obtenidos en el estado estacionario.	26
IV.- Discusión.	51
4.1. Método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre total.	51
4.1.1. Temperatura.	51
4.1.2. Hematócrito.	51
4.1.3. Proteínas intra eritrocíticas.	51
4.1.4. Infección.	51
4.1.5. Variación diurna.	52
4.1.6. Método analítico.	52
4.2. Estudio de Cronofarmacocinética en pacientes con trasplante renal.	54
4.2.1. Variabilidad inter-individual en las concentraciones sanguíneas de ciclosporina contra tiempo por vía oral.	55
4.2.2. Farmacocinética Clínica de Ciclosporina.	55
4.2.2.1. Administración oral diurna.	55
4.2.2.2. Administración oral nocturna.	56
4.2.3. Variabilidad circadiana en los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina en el estado estacionario.	57
V.- Conclusiones.	64
VI.- Apendice I	65
Apendice II.	66
VII.- Bibliografía.	67

Indice de Figuras.

Número de Figura	Página
1.- Eventos que constituyen la respuesta inmune	2
2.- Estructura de la ciclosporina A y 3 de los sitios de modificación de la molécula para obtener tres de los metabolitos	4
3.- Reacción analito-inmunoglobulina gamma-anti inmunoglobulina gamma	13
4.- Curva dosis-respuesta promedio de ciclosporina	28
5.- Gráfica de control de calidad Unión no específica	30
6.- Gráfica de control de calidad Unión máxima	30
7.- Gráfica de control de calidad Pendiente	31
8.- Gráfica de control de calidad Punto de inflexión	31
9.- Gráfica de control de calidad Nivel bajo	33
10.- Gráfica de control de calidad Nivel alto	33
11 a 30.- Curvas individuales de concentración de ciclosporina [ng/mL] contra tiempo (horas)	37 a 46
31.- Curva promedio de concentración de ciclosporina [ng/mL] contra tiempo (horas)	47

Índice de Tablas.

Tabla número	Página
I.- Agentes inmunosupresores -----	3
II.- Factores que alteran la concentración sanguínea de ciclosporina -----	10
III.- Determinación de ciclosporina por RIA (III y IV). Extracción -----	16
IV.- Reacción Antígeno-Anticuerpo -----	17
V.- Características de los pacientes que participaron en el estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina -----	21 - 23
VI.- Función renal de los pacientes que participaron en el estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina -----	24
VII.- Validación del método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre total -----	27
VIII.- Evaluación de la curva dosis - respuesta -----	29
IX.- Resultados del control de calidad de los ensayos de RIA para la determinación de CyA en sangre total -----	32
X.- Valores individuales de concentración de ciclosporina en sangre total contra tiempo -----	34 - 35
XI.- Valores promedio de concentración de ciclosporina en sangre total contra tiempo -----	36
XII.- Parámetros farmacocinéticos diurnos y nocturnos -----	48 - 49
XIII.- Parámetros farmacocinéticos promedio diurnos y nocturnos -----	50
XIV.- Prueba de t pareada para los diferentes parámetros farmacocinéticos bajo estudio -----	60 - 62
XV.- Comparación de la variabilidad circadiana en la farmacocinética de CsA; entre la reportada por Ohlman y col. y la obtenida en el estudio realizado en el INCICH. -----	63

I Introducción.

Desde el inicio de la era clínica del trasplante renal, en que se colocaron riñones de donador vivo o de donador cadáver a pacientes con insuficiencia renal crónica terminal, se han efectuado grandes esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de una inmunosupresión segura, específica, predecible y efectiva.

Inicialmente, el único medio de inmunosupresión era la utilización de radiación total del cuerpo. En el año de 1959, se inicia la inmunosupresión química, cuando se describe la inducción específica de tolerancia a las proteínas humanas en animales tratados con el metabolito 6 de mercaptopurina (1). Murray y cols. (2) reportaron un incremento en la sobrevida del alotrasplante renal cuando utilizaron el imidazol, derivado de la 6-mercaptopurina, conocido en la actualidad con el nombre de azatioprina.

La secuencia de eventos que constituyen la respuesta inmune puede dividirse en 5 niveles:

- 1) Presentación y procesamiento del antígeno.
- 2) Transferencia de la información y activación de las células efectoras.
- 3) Diferenciación y proliferación de linfocitos.
- 4) Síntesis y liberación de sustancias mediadoras (citocinas y anticuerpos).
- 5) Respuesta a mediadores, anticuerpos y células efectoras (Figura 1).

La respuesta inmune puede suprimirse al inhibir selectivamente cada uno de estos niveles por medio de agentes inmunosupresores. Algunos de ellos son fármacos no específicos, compuestos citotóxicos (ciclofosfamida y metrotexato), los cuales interfieren con la replicación del ADN y la producción de linfocitos y otras células en replicación (3). El OKT3 es el primer anticuerpo monoclonal terapéutico producido para uso en humanos. Es una inmunoglobulina IgG₂ que se une al antígeno de superficie de los linfocitos T. Una vez que el OKT3 se une a la región de las células T llamada CD3 (complejo de al menos 5 proteínas transmembranales conocidas con el nombre de complejo 3 de diferenciación celular), estas células son removidas de la circulación por el sistema retículo endotelial del hígado y del bazo (4). La introducción de la ciclosporina como un fármaco inmunosupresor en 1970 fue uno de los factores más importantes en el avance del trasplante de órganos durante la década anterior. En contraste con los corticosteroides y la azatioprina, la ciclosporina es más específica en su efecto inmunológico (Tabla 1).

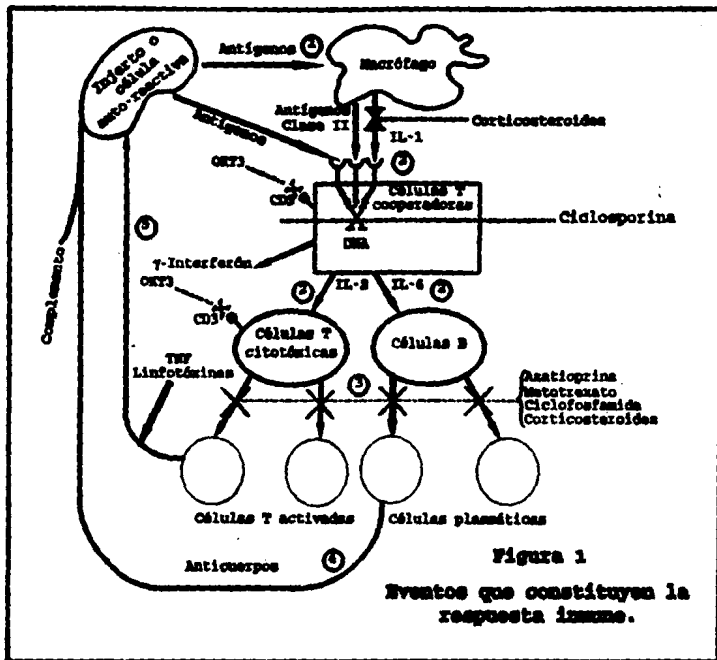


Figura 1
Eventos que constituyen la
respuesta inmune.

Tabla I.

Agentes inmunosupresores.		
Fármacos		Mecanismos de acción
Agentes citotóxicos	Azatioprina	Inhibición de la biosíntesis de purinas.
	Ciclofosfamida	Agente alquilante
	Metotrexato	Antagonista del ácido fólico
Corticosteroides	Metilprednisolona	Efectos múltiples sobre neutrófilos, macrófagos y células T.
	Prednisolona	
	Prednisona	
Supresores de los linfocitos T.	Ciclosporina A	Inhibición de la activación de las células T _H CD4 mediado por TcR.
	Anticuerpo monoclonal anti CD3	Disminución de las células CD3

La acción inmunosupresora de estos fármacos se obtiene a dosis en las cuales se alcanzan niveles tóxicos. Sin embargo, dosis más pequeñas pueden ser efectivas en un régimen de combinación de fármacos que mantienen la inmunosupresión con mínima toxicidad (3).

1.1 Ciclosporina (CsA).

La ciclosporina es un metabolito aislado de caldos de cultivo de las especies de hongos *Tolypocladium inflatum*. Después de que la ciclosporina es extraída del hongo, se purifica cromatográficamente y queda como un polvo cristalino blanco, que es insoluble en agua pero que se disuelve rápidamente en etanol y, en forma más lenta en lípidos (1). Es un péptido cíclico hidrofóbico, de 1202.6 Da, de peso molecular, compuesto de 11 aminoácidos de configuración S, de los L-aminoácidos, excepto para la D-alanina en posición 8 y la sarcosina en posición 3, los cuales tienen la configuración R. Siete de los aminoácidos son N-metilados. Diez de ellos son aminoácidos alifáticos: el ácido α -aminobutírico en posición 2; la sarcosina en posición 3; la N-metil-leucina en las posiciones 4, 6, 9 y 10; la valina en posición 5; la alanina en posición 7; la D-alanina en posición 8 y la N-metil-valina en posición 11 (Figura 2).

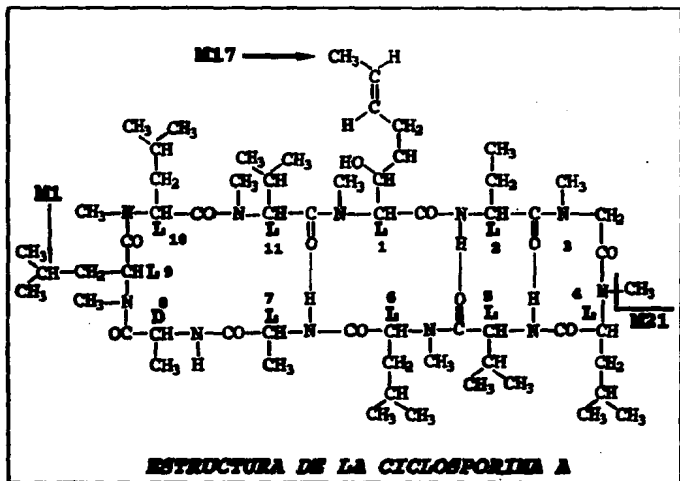


Figura 2

Estructura de la ciclosporina A y tres de los sitios de modificación de la molécula para obtener tres de los metabolitos.

Se encontró por primera vez dentro de la estructura de la ciclosporina, un aminoácido que no se había aislado o conocido en forma libre, el cual está en la posición 1 y está compuesto por 9 carbonos (5)

1.1.1 Mecanismo de acción

El efecto principal de la ciclosporina es bloquear la producción de interleucina 2 (IL-2) y otras linfocinas, sin afectar la expresión de los receptores para la IL-2. La inhibición de la síntesis de IL-2 es el resultado de una acción a nivel nuclear en el linfocito T, donde la transcripción del ARNm para la IL-2 es bloqueado (3). Dentro del linfocito, la CsA se une a su receptor proteico en el citoplasma, la ciclofilina, una isomerasa cis-trans peptidil-propil. El complejo CsA-ciclofilina inhibe a la calcineurina, una fosfatasa dependiente de la calmodulina y del calcio. La inhibición de la actividad de fosfatasa de la enzima, evita la traslocación a través de la membrana nuclear de la subunidad citoplasmática del factor nuclear activador de las células T (NF-AT), el cual es un factor de transcripción esencial para la transcripción del gen de la interleucina 2. La ciclosporina bloquea la producción de IL-2 y esto evita la producción secundaria de otras citocinas producidas por las células T, incluyendo el factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), la actividad procoagulante de los macrófagos, la producción de gamma-interferón (IFN- γ) y el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos. De esta manera, la amplificación inmune dependiente de la IL-2 puede disminuirse lo suficiente para obtener una reactividad inmune celular bajo un umbral crítico. La ciclosporina no produce mielosupresión a dosis inmunosupresivas y, debido a que no es linfotóxica, sus efectos inmunosupresores son reversibles al descontinuar la terapia (6, 7).

1.1.2 Propiedades farmacocinéticas.

En los últimos años la farmacocinética clínica de la CsA ha sido investigada por varios autores entre ellos, Ptachcanski y cols (8, 9, 10), Rodighiero y cols. (11) y Rowland y cols. (12, 13).

1.1.2.1 Absorción

La absorción de la CsA después de la administración oral es lenta, incompleta y muy variada. La concentración máxima en sangre o plasma usualmente se alcanza entre 1 y 8 horas después de la administración oral. Frecuentemente se encuentran doble picos en la curva de concentración sanguínea de CsA contra tiempo (8, 14, 15).

La biodisponibilidad de la CsA aumenta en el periodo postoperatorio al trasplante renal. Se ha reportado que en pacientes con trasplante renal la biodisponibilidad se incrementa de 24.2% al momento del trasplante a 51.4% dos a cuatro semanas después del trasplante (16).

1.1.2.2 Cinética de disposición.

La CsA se distribuye extensamente desde la sangre a los tejidos, especialmente al tejido adiposo, siendo este, un proceso lento. El resultado es una curva continua de concentración de CsA contra tiempo después de un tiempo corto de 2 a 4 horas de infusión hasta que se alcanza el equilibrio en la distribución. Tales datos se describen adecuadamente por una suma de exponenciales:

$$C = \sum C_i e^{-\lambda_i t}$$

donde C es la concentración al tiempo t, y C_i , λ_i son los coeficientes y exponentes del término i. La mayoría de los investigadores cuantifican ciclosporina durante 12 ó 24 horas después de la administración y encuentran una ecuación bi-exponencial, con un tiempo de vida media de eliminación (β) de 6 a 8 horas (9). Algunos de ellos, continúan la cuantificación de ciclosporina por varios días y encuentran otra fase con un tiempo de vida media (β) que excede las 15 horas. Estas observaciones sugieren que el equilibrio en la distribución de ciclosporina entre la sangre y algunos tejidos, probablemente adiposo, ocurre al menos en 24 horas.

1.1.2.3 Depuración (Cl).

La depuración de un fármaco relaciona la velocidad de su eliminación con su concentración y determina tanto el tiempo de vida media de eliminación como la velocidad de infusión requerida para obtener una concentración determinada en el estado estacionario:

1) Infusión:

$$Cl = \frac{\text{Velocidad de infusión}}{[CsA]_{ss}}$$

2) Dosis única:

$$Cl = \frac{\text{Dosis}}{AUC_{0-\infty}}$$

A las 24 horas la mayor parte de la dosis de la CsA se ha eliminado del organismo y el área adicional más allá de las 24 horas tiene poca relevancia sobre el valor estimado de la depuración.

La ciclosporina se metaboliza extensamente en el hígado. La depuración sanguínea de ciclosporina es alrededor de 0.4 L/h/kg, lo cual, comparado al flujo sanguíneo del hígado de 1.3 L/h/kg, indica que la ciclosporina es un fármaco de moderada a baja extracción hepática. Por lo tanto la depuración es directamente proporcional a la fracción libre (fu).

$$Cl = fu Cl_u$$

Donde, Cl_u es la depuración del fármaco libre y en el estado estacionario, la concentración de ciclosporina libre esta determinada por Cl_u (12).

Así, la variabilidad inter e intra individual en el valor de la depuración puede estar asociada con los cambios en la unión a proteínas y por lo tanto con el contenido de lipoproteínas en plasma (17).

1.1.2.4 Distribución.

La ciclosporina se distribuye extensamente en todo el cuerpo. Las concentraciones más altas se encuentran en tejido adiposo e hígado. También se encuentra en órganos ricos en leucocitos como el timo, ganglios linfáticos y médula ósea; así como en órganos ricos en lípidos como el páncreas, riñones, glándulas adrenales, tiroides, glándulas salivales, pulmones y piel. Las concentraciones más bajas se encuentran en el cerebro (18).

A pesar de que las observaciones de las concentraciones sanguíneas de ciclosporina que van más allá de 24 horas, después de una infusión corta, tienen poco impacto sobre la depuración, éstas sí influyen en el valor estimado del volumen de distribución.

$$V_d = 1.44 Cl t_{1/2}$$

Tomando los datos de las primeras 24 horas de muestreo con un tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de 6 a 8 horas, el valor del V_d es alrededor de 6 L/kg; utilizando los datos obtenidos después de las 24 horas de muestreo, con un $t_{1/2}$ de 16 horas, el valor del V_d se acerca a 14 L/kg. La diferencia se debe, en parte, al hecho de que la distribución en los tejidos de lento equilibrio no se lleva a término a las 24 horas, y por otra parte, debido a que la eliminación se realiza simultáneamente. Una mejor estimación de la distribución de la ciclosporina que el V_d , puede obtenerse a partir del volumen de distribución en el estado estacionario ($V_{d,ss}$). El valor de $V_{d,ss}$ (4.3 L/kg) es más bajo y generalmente menos variable que V_d (12).

1.1.2.5 Tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$).

El $t_{1/2}$ de un fármaco es consecuencia de la depuración y del volumen de distribución. En el caso más simple de disposición, el modelo abierto de un compartimento, el $t_{1/2}$ está dado por:

$$t_{1/2} = \frac{0.693 Vd}{Cl_u}$$

y es la continua distribución del fármaco de la sangre a los tejidos lo que crea la naturaleza polifásica en la cinética de disposición observada en la ciclosporina.

Se han encontrado diferentes valores de $t_{1/2}$ para la ciclosporina que caracterizan varias fases de disposición. Los valores más usuales, cuando se encuentran 3 fases son: 1, 6 y 24 horas. La relevancia de tal información depende del uso a que se destine. La mayor parte de la eliminación ocurre durante la fase con un tiempo de vida media de eliminación de 6 horas y este es el valor que determina el tiempo de 24 horas (aproximadamente 4 $t_{1/2}$) para alcanzar el estado estacionario durante la infusión a velocidad constante, y la necesidad de administrar el fármaco cada 12 horas por vía oral para mantener concentraciones adecuadas (12).

1.1.3 Toxicidad y complicaciones.

Las complicaciones por administración de ciclosporina están en relación con la dosis y el nivel sanguíneo de CsA que se alcanza.

1.1.3.1 Toxicidad renal.

El efecto tóxico de la ciclosporina sobre la función renal puede dividirse en 2 categorías; efectos agudos y efectos crónicos. La nefrotoxicidad aguda se caracteriza por una falla renal temprana después del trasplante o por una serie de hallazgos en el riñón, entre los que se incluyen la hipercalcemia, acidosis tubular y elevación de la creatinina sérica, debido a una disminución de la filtración glomerular.

La nefrotoxicidad crónica puede dividirse a su vez en 3 grupos. En el primero, en el que se encuentran la mayoría de los pacientes, se observa una elevación en las cifras de creatinina en forma estable y sin que ocurran cambios en la filtración glomerular. En el segundo grupo existe un incremento lento y progresivo en los niveles de creatinina, el cual generalmente regresa a valores normales cuando se disminuye la dosis del fármaco y decrecen los niveles sanguíneos de la misma. Finalmente, en el tercer grupo el incremento de la creatinina es marcado y progresivo, a pesar de disminuir la dosis de ciclosporina (1).

1.1.3.2 Toxicidad hepática.

En la clínica, dicha toxicidad se manifiesta por una elevación de las transaminasas, bilirrubinas y fosfatasa alcalina (1).

1.1.3.3 Hipertensión.

La administración de ciclosporina produce disminución de la filtración glomerular, en gran parte por disminución del flujo sanguíneo renal, por vasoconstricción de las arteriolas pre y post glomerulares, lo que repercute desde el punto de vista clínico en grados variables de deterioro de la función renal e hipertensión arterial en la mayoría de los pacientes. Estos efectos son generalmente reversibles al suspender el medicamento, pero pueden contribuir al desarrollo de nefrotoxicidad crónica irreversible por lesiones arteriolas, que semejan nefrosclerosis con fibrosis intersticial y atrofia tubular.

Existe evidencia clínica y experimental, de que los efectos vasculares secundarios a la administración de ciclosporina pueden ser inhibidos o atenuados mediante la coadministración de bloqueadores de calcio, disminuyendo o evitando tanto la nefrotoxicidad del medicamento, como el efecto delétere del aumento de la presión sistémica sobre el injerto (19, 20).

1.1.4 Monitoreo terapéutico de la ciclosporina.

No se sabe a ciencia cierta cual es la forma óptima para evaluar el tratamiento con ciclosporina, ya sea la concentración mínima en el estado estacionario ($C_{mín.}$), la concentración máxima en el estado estacionario ($C_{máx.}$), la concentración promedio en el estado estacionario ($C_{av.}$) o la cuantificación del área bajo la curva durante un intervalo de dosificación. Los procedimientos más comunes se basan en cuantificar las concentraciones sanguíneas de ciclosporina, 12 o 24 horas después de la dosis, justo antes de la siguiente dosis. Sin embargo en algunos centros, las concentraciones sanguíneas de CsA se obtienen a un tiempo adicional, usualmente 6 horas después de la dosis. En el trasplante de órganos, el monitoreo de ciclosporina es especialmente importante durante el periodo temprano post-operatorio, cuando el riesgo de rechazo agudo del injerto es más alto y cuando la absorción es errática. Se recomienda el monitoreo de los niveles sanguíneos de ciclosporina al menos cada 2 días durante las primeras 2 semanas después del trasplante (21, 22, 23, 24, 25, 26).

Las causas clínicas más importantes en los cambios de concentración sanguínea de ciclosporina se resumen en la tabla II.

Tabla II.
Factores que alteran la concentración sanguínea
de ciclosporina (27).

Factor		Efecto		
Absorción	Diarrea		Disminuye	
	Enfermedad hepática (CsA oral)		Disminuye	
	Fibrosis cística (CsA oral)		Disminuye	
	Sales biliares		Aumenta	
	Metoclopramida		Aumenta	
	Alimentos		Aumenta	
Eliminación	Edad	Niños (Aumenta la depuración)	Disminuye	
	Enfermedad hepática (CsA I.V.)		Aumenta	
	Otros fármacos.	Eritromicina		Aumenta
		Fenitoína		Disminuye
		Fenobarbital		Disminuye
		Carbamacepina		Disminuye
		Ketoconazol		Aumenta
		Verapamil		Aumenta
		Diltiazem		Aumenta
	Cimetidina		No cambia	
Hemodiálisis		No cambia		
Daño renal		No cambia		

Se recomienda que para la individualización de la terapia, se realice un estudio farmacocinético antes de la cirugía del trasplante, con lo cual se pueden identificar problemas como pobre absorción y/o rápida o lenta depuración. Se pueden requerir estudios posteriores para determinar el efecto que produce el incremento en la biodisponibilidad de la ciclosporina o el incremento del hematócrito, lípidos del plasma y proteínas en la dosis ajustada para obtener una concentración mínima en el estado estacionario de ciclosporina.

La influencia circadiana sobre la farmacocinética de la ciclosporina puede ser significativa, es otra fuente de variabilidad intra e inter individual y es motivo del presente trabajo (27).

II Material y Métodos.

2.1 Método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre.

2.1.1 Descripción del método.

El procedimiento utiliza una inmunoglobulina gamma (IgG) de ratón y una anti-inmunoglobulina gamma obtenida en burro formando de esta manera un complejo Analito-Inmunoglobulina gamma-Anti Inmunoglobulina-gamma.

Este método se basa en las siguientes propiedades generales de las inmunoglobulinas:

a) Las inmunoglobulinas gamma (Anticuerpo monoclonal de ratón anti-CsA), son capaces de unir dos moléculas de antígeno (CsA - CsA, CsA - ¹²⁵ICSA y ¹²⁵ICSA - ¹²⁵ICSA).

b) La estructura química de las IgG de una especie animal es casi idéntica, a excepción de una pequeña región denominada "variable" que es donde reside la especificidad de la molécula.

c) Cuando se produce la respuesta inmune contra un antígeno determinado, los anticuerpos que se producen son heterogéneos, es decir, son una mezcla de IgG que reconocen diferentes sitios de la molécula del antígeno (Suero antirratón de burro).

d) Al agregar una anti-inmunoglobulina gamma se formarán complejos analito-inmunoglobulina gamma-anti-inmunoglobulina gamma que serán fácilmente precipitados por centrifugación, quedando en el fondo del tubo la fracción unida (2B). En la figura 1 se presenta el esquema general de la reacción analito-inmunoglobulina gamma - anti inmunoglobulina gamma.

El método de radioinmunoensayo CYCLO-Trac SP de INCStar (Immuno Nuclear Corporation Stillwater, MN, USA) en sangre utiliza un anticuerpo monoclonal específico que cuantifica únicamente la ciclosporina y demuestra no tener reactividad cruzada significativa con los metabolitos. El ensayo consiste en una etapa de incubación y usa una técnica de separación de anticuerpos de fase doble. Para simplificar el procedimiento, el primer anticuerpo (monoclonal de ratón específico para ciclosporina A), y el segundo (anticuerpo antirratón de burro) se mezclan previamente con un vehículo (suero normal de ratón) para producir un reactivo denominado Anti-CYCLO-Trac SP InmunoSep.

Para determinar los niveles de ciclosporina con este método, las muestras sanguíneas, control y estándar se extraen primeramente con metanol. Los extractos metanólicos se combinan con un trazador de ciclosporina marcada con yodo-125 y el Anti-CYCLO-Trac SP InmunoSep. Al cabo de una incubación durante una hora, se centrifugan, decantan y determinan las cuentas por minuto de los tubos. La radiactividad que perdura en el precipitado es inversamente proporcional a la concentración de ciclosporina encontrada en la muestra.

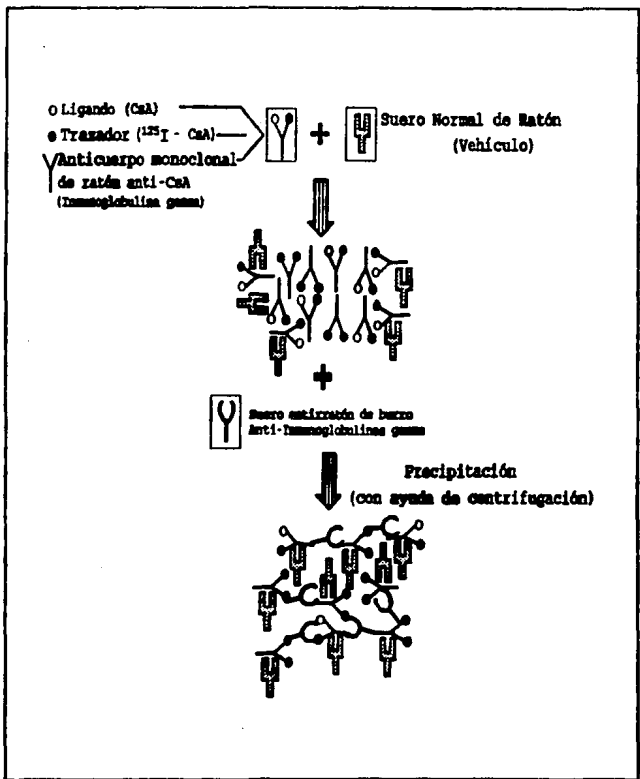


Figura 3
 Reacción analito-inmunoglobulina gamma-
 anti inmunoglobulina gamma.

2.1.2 Reactivos.

2.1.2.1 - Cyclo-Trac SP NSB InmunoSep.

Es la mezcla de suero antirratón de burro y suero normal de ratón diluido en solución salina - reguladora de fosfatos, con azida de sodio como conservador y un agente tensoactivo.

2.1.2.2 - Estándar 0 de CYCLO-Trac SP.

Es el suero libre de ciclosporina conteniendo un agente tensoactivo.

2.1.2.3 - Estándares (A - E) de CYCLO-Trac SP.

Se utilizan cinco estándares de ciclosporina, en concentraciones que van de 23 - 1343 ng/mL. Estos estándares se encuentran previamente diluidos en suero humano que contiene azida de sodio y un agente tensoactivo. Los valores exactos de concentración se asignan de acuerdo a cada lote y aparecen en las etiquetas de los frascos. El estándar de CYCLO-Trac SP de INCTAR fue calibrado previamente en función del estándar de referencia USP de ciclosporina.

2.1.2.4 - Anti-CYCLO-Trac SP InmunoSep.

Lo constituye el anticuerpo monoclonal anticiclosporina de ratón y la mezcla de suero de antirratón de burro y suero normal de ratón diluidos en solución salina - regulador de fosfatos, con azida de sodio y con un agente tensoactivo.

2.1.2.5 - ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.

Esta formado por un derivado de ciclosporina que se marca con yodo-125 y se diluye en solución reguladora de citrato-EDTA que contiene azida de sodio, suero humano y un agente tensoactivo.

2.1.2.6 - Controles de CYCLO-Trac SP (niveles 1 y 2).

Al suero humano se le agrega una cantidad adecuada de ciclosporina para obtener una concentración en un rango específico; control 1 (76.2 - 130.0 ng/mL) y control 2 (271 - 443 ng/mL). Contienen azida de sodio y otros estabilizantes y no se necesita reconstitución.

2.1.3 Equipo.

Tubos de vidrio desechables de borosilicato.
Centrifuga termocontrolada.
Contador de centelleo sensible a los rayos gamma capaz de contar el yodo-125 (GammaCord II Ames).
Mezcladora vibratoria (Deluxe Mixer).
Pipetas de desplazamiento positivo de 400 μ L, 100 μ L y 50 μ L.
Metanol (grado HPLC).

2.1.4 - Procedimiento del ensayo.

2.1.4.1 - Fase de extracción (Tabla III).

- 1.- Marcar un tubo de ensayo de vidrio para cada estándar, control y muestra desconocida por duplicado.
- 2.- En cada tubo colocar 400 μ L de metanol.
- 3.- Añadir 100 μ L de los estándares, los controles y las muestras de sangre total.
- 4.- Tapar cada tubo y agitarlo en la mezcladora vibratoria durante 15 segundos.
- 5.- Centrifugar los tubos, a la velocidad de 3500 rpm a 20 - 25 °C durante 5 minutos. El sobrenadante, el cual contiene la ciclosporina extraída, se utiliza en la reacción antígeno - anticuerpo.

2.1.4.2 - Fase de reacción antígeno - anticuerpo (Tabla IV).

- 6.- Etiquetar tubos de ensayo de acuerdo al protocolo de la tabla IV.
- 7.- Permitir que los reactivos se equilibren a temperatura ambiente (20 - 25 °C) antes de utilizarlos en el ensayo.
- 8.- Añadir los reactivos de acuerdo al siguiente protocolo:
 - a.- Tubos de conteo total (1 y 2).
100 μ L de ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.
 - b.- Tubos de enlace no específicos (NSB), 3 y 4 .
50 μ L del extracto del estándar 0.
100 μ L de ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.
1.0 mL de CYCLO-Trac SP NSB InmunoSep.
 - c.- Estándar 0 de CYCLO-Trac SP (5 y 6) .
50 μ L del extracto del estándar 0 de CYCLO-Trac SP.
100 μ L de ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.
 - d.- Estándares A - E de CYCLO-Trac SP (7 - 16) .
50 μ L del extracto de los estándares A - E de CYCLO-Trac SP.
100 μ L de ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.
 - e.- Controles y muestras desconocidas (17 - 20) .
50 μ L de los extractos de controles y muestras.
100 μ L de ¹²⁵I CYCLO-Trac SP.
- 9.- Añadir inmediatamente 1.0 mL del reactivo Anti-CYCLO-Trac SP InmunoSep bien mezclado a todos los tubos, excepto los de conteo total y los de NSB.
- 10.- Agitar vigorosamente todos los tubos e incubarlos durante una hora a 20 - 25 °C.
- 11.- Centrifugar los tubos a 3500 rpm durante 20 minutos a 20 - 25 °C.
- 12.- Decantar inmediatamente el sobrenadante de todos los tubos, excepto los de conteo total, invirtiéndolos durante un máximo de 2 minutos. Se limpian los tubos con papel absorbente para retirar las gotas de sobrenadante que puedan haber quedado en los bordes antes de volver a poner los tubos en posición vertical.
- 13.- Se determinan las cuentas de cada tubo y las de los tubos de conteo total durante 1 minuto en un contador de centelleo sensible a los rayos gamma.

Determinación de ciclosporina por RIA.

Tabla III

2.1.4.1 Extracción:

No de. Tubo	Estándares							Controles	
	EST	0	A	B	C	D	E	1	2
	3,4	5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20
Intens. grado HPLC (nL)	400	400	400	400	400	400	400	400	400
Estándar. control o muestra (nL)	E-0 100	E-0 100	E-1 100	E-2 100	E-C 100	E-D 100	E-E 100	C-1 100	C-2 100

Tapa con parafina, agitar en vortex 15 segundos.
Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos a 20-25 °C.

Tabla IV

2.1.4.2 Reacción Antígeno-Anticuerpo:

No de. Tubo.	Cuentas Totales.	SPB	Estándares						Controles	
	1,2	3,4	0	A	B	C	D	E	1	2
			5,6	7,8	9,10	11,12	13,14	15,16	17,18	19,20
Extracto del estándar 0 (nl)		50	50							
Extracto de los estándares (nl)				50	50	50	50	50		
Extracto de los controles (nl)									50	50
Ciclospocinas marca J TM (nl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Mezcla de suero de activación de burro y suero normal de ratón (nl)		1								
Anti-cycto-Truc SP Immunoprep (nl)			1	1	1	1	1	1	1	1

Agitar vigorosamente e incubar 1 hora a 28-35 °C
 Centrifugar 20 minutos a 3000 rpm/28-35 °C
 Decantar

2.1.5 - Cálculo de la curva de calibración.

Para el desarrollo del método de radioinmunoensayo se prepara una curva de calibración en el rango de 23 a 1343 ng/mL para trazar la amplitud de enlace en función de las concentraciones. La curva se obtiene, graficando % de unión de los estándares en relación al % de unión del estándar cero (% B/Bo) en función del logaritmo de la concentración.

1.- Calcular las cuentas por minuto (cpm) promedio para cada estándar, control y muestra del paciente.

2.- Restar las cpm promedio de los tubos de unión inespecífica (NSB) de las cpm promedio de los estándares y muestras de pacientes, para obtener las cpm corregidas.

3.- Dividir las cpm corregidas de cada estándar, control y muestras de pacientes entre las cpm corregidas del estándar cero, y multiplicar por 100, para calcular el % de unión de los estándares y muestras de pacientes en relación al % de unión del estándar cero (% B/Bo).

$$\%B/Bo = \frac{(CPM \text{ del estándar o muestra del paciente} - CPM \text{ de NSB})}{(CPM \text{ del estándar cero} - CPM \text{ de NSB})} \times 100$$

4.- Graficar el % B/Bo de los estándares (eje de las ordenadas) en función de la concentración correspondiente (eje de las abscisas), utilizando papel semilogarítmico de 3 ciclos.

5.- Trazar la mejor línea de ajuste.

6.- Para obtener dicha línea se emplea un programa de ajuste de curva logística de 4 parámetros. La ecuación que representa este ajuste es la siguiente (29).

$$x = \left(\frac{a - d}{y - d} - 1 \right)^{1/b} \cdot c$$

donde

- y = % B/Bo
- a = Respuesta máxima
- b = Pendiente
- c = Punto de inflexión
- d = Respuesta mínima

En el apéndice 1 se presenta un ejemplo.

2.2 - Estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina.

2.2.1 - Selección de individuos.

En el estudio participaron 20 pacientes (9 hombres y 11 mujeres) a los cuales se les efectuó trasplante renal realizado entre diciembre de 1990 y septiembre de 1992, con doble y triple esquema de inmunosupresión, ciclosporina-prednisona y ciclosporina-prednisona-azatioprina (30, 31). Los pacientes tenían entre 18 y 63 años; un peso corporal entre 41 a 84 Kg y una estatura en el rango de 150 a 175 cm. Diez de los pacientes recibían tratamiento antihipertensivo con angiotrofín (Ag). Todos ellos presentaban función renal estable, evaluada mediante la determinación de Nitrógeno de urea sérica, creatinina sérica y depuración de creatinina. Las características físicas de los pacientes, así como la terapia concomitante se resumen en la tabla V y en la tabla VI se presentan los resultados de las pruebas de función renal realizadas a cada paciente.

Previo al estudio se les dio a conocer el objetivo del estudio y los pacientes firmaron una hoja de consentimiento (apéndice II).

2.2.2 - Estudio farmacocinético de ciclosporina en el estado estacionario.

Los pacientes seleccionados se encontraban hospitalizados en la unidad de Estudios Clínicos del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología Dr. Ignacio Chávez, y bajo tratamiento inmunosupresor con ciclosporina (cápsulas conteniendo 25, 50 o 100 mg de ciclosporina Sandimmune Ltd., Basel, Switzerland). La dosis de ciclosporina de cada paciente fue determinada previo el estudio de cronofarmacocinética y fue diseñada para mantener concentraciones mínimas en el estado estacionario de 50 - 200 ng/mL y para administrarse cada 12 horas. Las dosis no fueron cambiadas por al menos 5 días antes del estudio.

2.2.2.1 El protocolo a seguir fue el siguiente:

- 1.- Se les administró el desayuno a las 8 a.m..
- 2.- A cada paciente se le canalizó una vena con catéter, para la toma de muestra sanguíneas.
- 3.- Se tomó una muestra basal antes de administrar la dosis matutina de ciclosporina oral.
- 4.- Se administró al paciente la dosis matutina de ciclosporina y posteriormente se tomaron muestras sanguíneas de 2.5 mL en tubos conteniendo EDTA (3.6 mg) a los siguientes tiempos: 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 12 horas de administrada la ciclosporina.
- 5.- Doce horas después de la dosis matutina, se administró nuevamente la dosis de ciclosporina requerida por cada paciente.

6.- Se tomaron muestras sanguíneas de 2.5 mL a las 13, 14, 15, 16, 18, 20 y 24 horas después de la administración del medicamento. Todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Los niveles de ciclosporina de los diferentes tiempos de muestreo se determinaron por el método descrito en las secciones 2.1.4 y 2.1.5 .

2.2.2.2. Análisis farmacocinético de los datos.

Con los valores obtenidos se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración mínima en el estado estacionario ($C_{\text{mín.}}$), concentración máxima en el estado estacionario ($C_{\text{máx.}}$), y el tiempo para alcanzar la concentración máxima ($t_{\text{máx.}}$, directamente de la gráfica; área bajo la curva (ABC) por el método de los trapecios; área bajo la curva normalizada (ABC/Dosis); ABCM (área bajo la curva al primer momento); el tiempo medio de residencia (MRT) se determinó por el método de Yamacka (32); $V_{\text{d.}}$ (33) por medio de la fórmula $(\text{MRT} \cdot \text{Dosis}) / \text{ABC}$ y depuración después de la administración oral de ciclosporina (Cl/F) dividiendo la dosis entre el área bajo la curva.

2.2.2.3 - Tratamiento estadístico de los datos.

Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ciclosporina en el mismo paciente entre el día y la noche, se aplicó la prueba de t pareada, para los valores de $C_{\text{mín.}}$, $C_{\text{máx.}}$, $t_{\text{máx.}}$, ABC, ABC/Dosis, ABCM, MRT, $V_{\text{d.}}$ y Cl/F .

Tabla V

Características de los pacientes que participaron en el estudio de cronefarmacocinética de ciclosporina.

Clevo de Paciente	Edad	Sexo (Años)	Peso (kg)	Estatura (cm)	Fecha de trasplante
1 EMZ	30	Masculino	76.5	168	12-Feb-92
2 SNA	21	Masculino	57	175	16-Jan-92
3 NRA	29	Femenino	86	162	27-Apr-92
4 NRJ	28	Femenino	68	162	27-Apr-92
5 8NB	21	Masculino	57	175	16-Jan-92
6 MCH	39	Femenino	73	150	10-Jun-92
7 BOCH	19	Femenino	49.5	151	11-Mar-92
8 CR9	21	Femenino	68	157	29-Apr-92
9 JAC	28	Masculino	63.5	145	6-May-92
10 MLP	21	Masculino	63.5	160	23-Jul-92
11RMM	20	Masculino	67.5	158	16-Dec-90
12 GUD	63	Femenino	68	162	18-Mar-92
13 GAB	66	Femenino	63.5	157	26-Jun-92
14 CBR	18	Femenino	50	160	4-Mar-92
15 GMH	32	Femenino	48.5	156	29-Jul-92
16 EDM	34	Masculino	63	172	26-Feb-92
17 FMT	25	Femenino	66	163	15/9/92
18 LCL	21	Femenino	41.3	151	17-Jun-92
19 MTC	28	Masculino	70	166	31-Jul-91
20 RCA	50	Masculino	60	174	30-Sep-92

Tabla V
(Continuación)

Características de los pacientes que participaron en el estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina.

Esquema inmunosupresor			
Clave de Paciente	Dosis de Ciclosporina (mg/12 horas)	Prednisona (mg)	Azatioprina (mg)
1 EMZ	150	17.5	125
2 BNA	125	12.5	125
3 NRA	200	15	125
4 NRI	200	15	125
5 BNB	125	12.5	125
6 MCH	125	12.5	125
7 BOCH	175	12.5	100
8 CRB	125	12.5	
9 JAC	125	12.5	75
10 MLP	200	22.5	100
11RMM	100	12.5	100
12 GUD	100	10	100
13 GAB	125	20	125
14 CBR	75	10	100
15 GMH	150	22.5	100
16 EDM	50	12.5	125
17 FMT	50	10	
18 LCL	150	10	75
19 MTC	150	15	
20 RCA	150	20	150

Tabla V
(Continuación)

Características de los pacientes que participaron en el estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina.

Clave de Paciente	Terapia concomitante			
1 EMZ	Diltiazem 60 x 3			
2 SNA	Diltiazem 60 X 2			
3 NRA				
4 NRI				
6 SNB	Diltiazem 60 X 2			
6 MCH	Diltiazem 60 X 2	Metformina + clorpropamida 525 x 3		
7 BOCH				
8 CRS	Diltiazem 90 x 2			
9 JAC		Sulfato Ferroso		
10 MLP		Clorhidrato de ranitidina 150 x 2		
11RMI	Diltiazem 30 x 2	Lisinopril anhidro 5 x 1		
12 GUD	Diltiazem 60 x 3	Tarttrato de metoprolol 10 x 2	Lovastatina 20 x 1	
13 GAB		Verapamil 40 x 2	Sulindac 200 x 1	Melocarbamol + Paracetamol
14 CBR				
16 GMH		Clorhidrato de ranitidina 150 x 2	Hemostyl 0.005c	Norfloxacina
16 EDM	Diltiazem 120 x 2	Tarttrato de metoprolol 50 x 1		
17 FMT	Diltiazem 90 x 3			
18 LCL		Nistatina		
19 MTC	Diltiazem 120 x 2	Merambutol 30 x 1	Rifater	Fentoina sódica 100 x 3
20 RCA		Nistatina		

Tabla VI

Función renal de los pacientes que participaron en el estudio de cronofarmacocinética de ciclosporina.

Clave de Paciente	N de Urea [mg/dL.]	Creatinina [mg/dL.]	Depuración de Creatinina mL/min
1 EMZ	22	2.17	61
2 BNA	16	1.78	54
3 NRA	20	1.51	83
4 NFB	19	1.65	83
6 SIB	21	1.76	46
6 MCH	16	0.77	132
7 BOCH	18	0.98	90
8 CRB	10	0.82	78
9 JAC	14	1.27	42
10 MLP	19	1.41	46
11RMM	27	2.02	28
12 GUD	18	1.03	82
13 GAB	19	1.08	50
14 CBR	18	1.36	73
15 OMB	40	1.93	29
16 EDM	15	1	118
17 FMT	26	1.49	46
18 LCL	16	1.12	57
19 MTC	27	2.9	35
20 RCA	17	1.38	58

III Resultados

3.1 Validación del método analítico (Radioinmunoensayo) para la cuantificación de ciclosporina en sangre total.

Para evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad del método de radioinmunoensayo, se realizó una curva dosis-respuesta por triplicado en dos días diferentes. En la tabla VII se presentan los % de unión del estándar en relación al % de unión del estándar cero (% B/Bo) en función de la concentración de los estándares en el rango de 23-1343 ng/mL), así como la media (m), desviación estándar (D.S.) y coeficientes de variación (% C.V.) obtenidos.

3.2 Control de calidad interno.

Es aquel sistema que permite evaluar todo análisis realizado por un laboratorio e involucra el control que se hace a un radioinmunoanálisis (RIA) en particular (intra-análisis) o a un RIA en forma consecutiva (inter-análisis).

3.2.1 Control de calidad inter-análisis.

Es el conjunto de parámetros que nos permite esencialmente valorar la precisión de un radioinmunoanálisis, estimar su desviación e identificar los errores cometidos durante su procesamiento. En el control de calidad inter-análisis los parámetros de mayor utilidad son:

3.2.1.1 Evaluación de la curva dosis-respuesta.

Los parámetros de la curva dosis respuesta que deben evaluarse para tener mayor información acerca de la calidad del análisis son los siguientes:

- a.- Cuentas de la unión no específica (NSB) expresadas en % de las cuentas totales, cuyo valor no debe ser mayor al 5 %.
- b.- % Bo: unión máxima del anticuerpo con el trazador a dosis cero.
- c.- Pendiente.
- d.- Dosis al 50 % de unión de la curva dosis-respuesta (Punto de inflexión).

En la figura 4 se presenta la curva dosis-respuesta obtenida y en la tabla VIII, se presentan los resultados para el % de unión inespecífica (%NSB), el % de unión máxima (%Bo), la pendiente y el punto de inflexión, para 12 ensayos diferentes, con sus respectivos valores promedio (m), desviación estándar (D.S.) y coeficiente de variación (% C.V.). En general, se acepta como C.V. inter-análisis un valor entre 15 y 20 % para la mayoría de los radioinmunoanálisis. En las figuras 5 - 8 se presentan las gráficas de las fluctuaciones obtenidas para la NSB, Bo, pendiente y punto de inflexión, en 12 ensayos diferentes.

3.2.1.2 Muestras de control de calidad o muestras testigo.

Una muestra de control de calidad es cualquier espécimen de naturaleza semejante a las muestras a medir, cuya concentración ha sido pre-establecida y que se incluye tantas veces como sea necesario en un mismo análisis con el propósito de identificar errores sistemáticos o aleatorios. Para ello se utilizan 2 muestras de control de calidad con valores bajo y medio. En la tabla IX se presentan los resultados obtenidos y en las figuras 9 y 10 se muestran las cartas de control de calidad del radioinmunoanálisis de ciclosporina.

3.3 Estudio de cronofarmacocinética in vivo de ciclosporina en pacientes con trasplante renal.

En la tabla X se presentan los resultados individuales de concentración de ciclosporina en sangre a los diferentes tiempos de muestreo y en la tabla XI se observan los valores promedio (m), desviación estándar (D.S.) y coeficiente de variación (% C.V.) a cada uno de los tiempos analizados. En las figuras 11 - 30 se presentan las curvas individuales de concentración sanguínea contra tiempo después de la administración de ciclosporina durante el día y durante la noche, y en la figura 31 se presenta la curva promedio.

3.4 Parámetros farmacocinéticos de Ciclosporina obtenidos en el estado estacionario.

En la tabla XII se presentan los valores individuales de concentración mínima en el estado estacionario ($C_{min,ss}$), concentración máxima en el estado estacionario ($C_{max,ss}$), tiempo para alcanzar la concentración máxima ($t_{max,ss}$), área bajo la curva (ABC), área bajo la curva normalizada (ABC/Dosis), área bajo la curva al primer momento (ABCM), tiempo medio de residencia (MRT), volumen de distribución ($V_{d,ss}$) y depuración después de la administración oral de ciclosporina (Cl/F), obtenidos tanto para la administración oral diurna como para la administración oral nocturna del fármaco, de los 20 pacientes con trasplante renal que participaron en el estudio. En la tabla XIII se muestran los valores promedio (m), desviación estándar (D.S.) y coeficiente de variación (% C.V.) calculados para cada uno de los parámetros farmacocinéticos determinados tanto en la administración oral diurna como en la administración oral nocturna.

Tabla VII

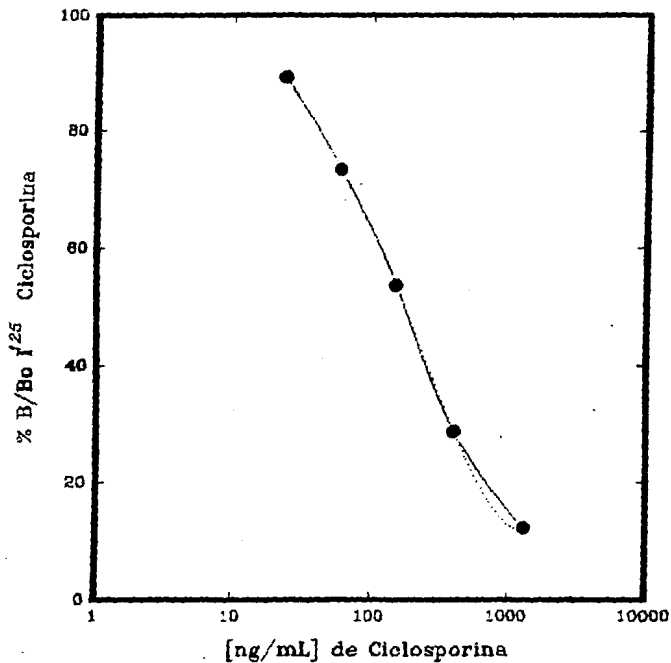
Validación del método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre total.

D	Concentración	%B/B ₀	%B/B ₀	%B/B ₀	Media	D.S.	%C.V.
	de ciclosporina						
1	[ng/ml]	1	2	3			
n	23	90.91	90.26	91.36	90.81	0.55	0.61
	69.8	74.05	74.43	73.68	74.05	0.39	0.51
	161	54.33	54.89	53.96	54.33	0.37	0.67
	496	29.13	29.7	29.55	29.13	0.59	1.97
	1343	12.72	12.83	12.82	12.72	0.11	0.83

D	Concentración	%B/B ₀	%B/B ₀	%B/B ₀	Media	D.S.	%C.V.
	de ciclosporina						
1	[ng/ml]	1	2	3			
n	23	88.92	86.91	86.06	87.96	1.01	1.15
	69.8	72.43	71.88	74.31	72.87	1.27	1.75
	161	53.91	54.18	52.18	53.11	1.00	1.88
2	496	29.8	29.95	27.65	29.46	0.67	2.37
	1343	11.94	11.51	11.8	11.65	0.16	1.25

Media	Día 1	Media	Día 2	Media	D.S.	%C.V.
90.81		87.96		89.39	2.01	2.25
74.05		72.87		73.46	0.93	1.14
54.33		53.11		53.72	0.80	1.80
29.13		29.40		29.78	0.51	1.79
12.72		11.65		12.19	0.78	6.21

Curva dosis - respuesta promedio
de Ciclosporina.



% NSB : 3.99

% Bo : 60.38

m : 1.08

Punto de inflexión : 201.27

Figura 4

Tabla VIII

**Evaluación de la curva
Dosis-Respuesta**

Parámetros de la curva Dosis-Respuesta				
Número de ensayo	Unión no específica	Unión máxima	Pendiente	Punto de inflexión
1	3.92	60.29	1.14	212.59
2	4.80	62.11	1.08	194.45
3	3.75	63.55	0.99	200.11
4	3.87	62.89	1.16	184.12
5	4.36	63.25	1.13	189.49
6	4.02	58.47	1.16	226.10
7	3.73	60.50	1.00	203.49
8	3.85	55.77	0.95	188.98
9	4.15	60.80	1.19	188.53
10	3.86	56.34	0.99	244.99
11	3.95	60.97	1.13	191.73
12	3.89	58.58	1.02	190.89
Media .	3.99	60.38	1.08	201.27
D.S.	0.24	2.42	0.08	18.24
%C.V.	6.00	4.01	7.74	9.08

**Gráfica de control de calidad
Unión no específica**

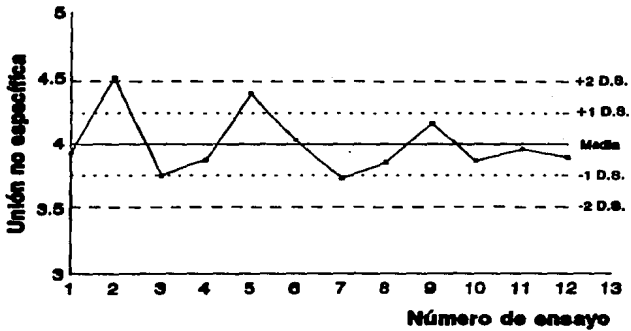


Figura 5

**Gráfica de control de calidad
Unión máxima.**

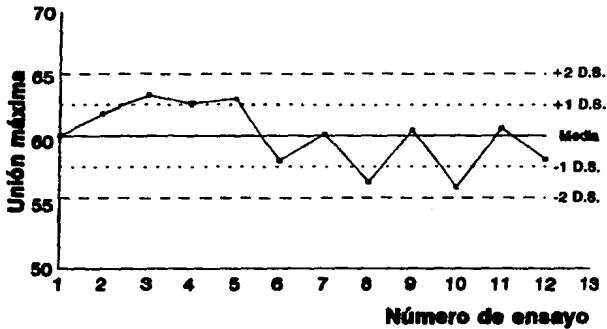


Figura 6

**Gráfica de control de calidad
Pendiente**

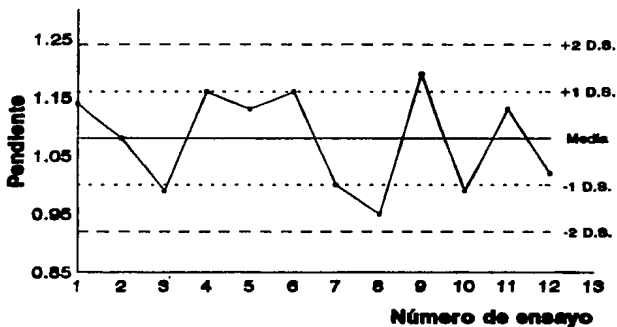


Figura 7

**Gráfica de control de calidad
Punto de inflexión**

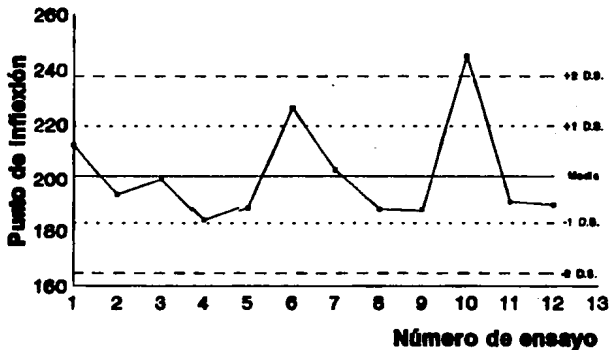


Figura 8

Tabla IX

**Resultados del control de calidad de los
ensayos de RIA para la determinación
de CsA en sangre total**

Datos de control de calidad		
Número de ensayo	Control 1	Control 2
	Nivel bajo [ng/ml.]	Nivel alto [ng/ml.]
1	104.91	353.00
2	109.19	327.04
3	108.90	345.39
4	112.18	362.88
5	98.88	355.51
6	108.72	308.39
7	99.95	320.31
8	115.84	389.52
9	116.48	403.77
10	122.93	378.42
11	99.66	339.04
12	109.27	341.85
Valor asignado	107.00	367.00
Rango	(76.2 - 130)	(271 - 443)
Media	108.89	360.27
D.S.	7.37	29.84
%C.V.	6.78	7.90

**Gráfica de control de calidad.
Control 1 (nivel bajo)**

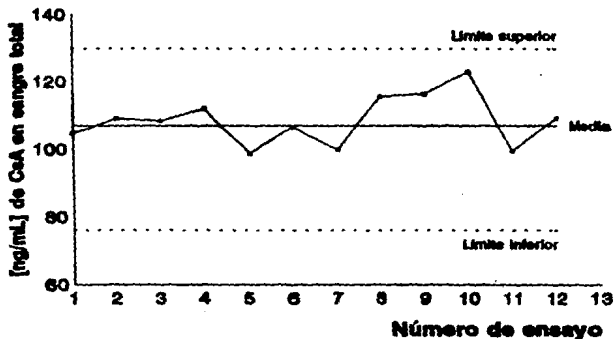


Figura 9

**Gráfica de control de calidad
Control 2 (nivel alto)**

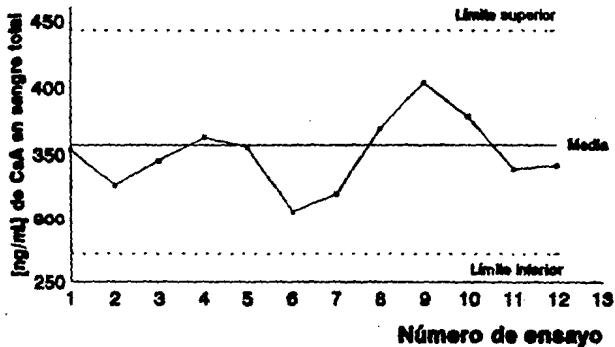


Figura 10

Tabla X

Valores individuales de concentración de ciclosporina en sangre contra tiempo

Tiempo Horas	Concentración (ng/ml.)									
	Paciente									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	225.59	210.51			204.73	415.00	420.50	234.92	408.85	201.715
1	232.25	325.32	382.25	669.00	419.00	375.19	416.77	180.38	442.61	563.97
2	261.16					627.97	370.34	363.09	481.99	534.01
3	262.94	295.15	378.43	580.72	251.75	1382.12	1227.02	1151.30	842.47	1750.91
4	205.10	195.17			332.18	1130.00	1718.4	555.58	1112.95	1022.15
6	728.54	834.97	784.45	753.33	1351.22	550.01	730.83	313.05	894.82	619.48
8	450.02	391.58	783.38	1182.83	710.84	442.25	402.5	278.71	553.70	412.21
12	239.04	210.51	367.35	587.75	234.10	201.4	314.38	186.37	310.49	363.84
13	227.36	854.81	395.09	627.25	2208.00	204.81	329.01	193.23	336.70	244.77
14	488.03	914.25	400.08	675.20	1648.118	268.91	652.89	215.27	890.70	202.538
16	623.89	664.4	800.84	1000.58	1200.32	475.00	1457.8	352.00	1340.91	223.49
18	378.83	427.24	1072.83	1032.54	408.04	881.24	908.84	421.38	1126.7	238.37
18	402	340.35	1241.77	1200.09	488.22	780.88	792.13	273.02	740.70	588.83
20	615.7	260.59	600.31	799.29	257.03	407.32	610.6	238.42	470.14	382.71
24	334.7	220.73	425.65	500.16	200.58	312.83	347.23	223.07	390.87	235.33

Tabla X
continuación

Valores individuales de concentración de ciclosporina en sangre contra tiempo

Tiempo Hora	Concentración (ng/ml.)									
	Paciente									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
0	222.36	276.01	888.47	151.55	143.74	99.81	92.48	244.13	247.64	187.59
1	169.96	203.45	1248.93	834.43	174.91	99.78	68.53	224.73	199.175	157.04
2	195.48	150.81	2498.34	348.34	187.84	91.14	85.48	580.88	449.42	270.74
3	213.62	207.36	3767.22	254.88	530.1	171.18	245.2	1626.53	514.71	1153.85
4	224.12	223.04	3142.57	212.5	319.27	255.58	381.16	1204.27	523.22	1345.81
6	584.04	427.2	827.51	138.15	480.12	151.53	209.74	443.73	533.27	420.71
8	327.8	256.58	948.03	170.13	365.32	81.28	111.82	188.98	345.188	326.28
12	198.94	243.78	839.9	140.83	148.65	55.8	87.65	189.85	287.85	202.18
13	334.33	440.57	1033.129	342.07	541.7	78.8	79.88	158.85	287.71	914.88
14	659.41	950.21	2944.84	638.38	1298.38	55.29	71.22	458.2	381.14	993.42
16	705.18	1844.78	6088.42	493.53	703.53	88.48	77.73	828.22	884.55	577.8
18	758.98	549.78	10214.2	349	484.55	244.26	64.82	652.49	1367.23	478.94
19	372.38	372.28	3833.2	232.39	289.99	150.55	62.06	840.21	538.93	350.49
20	261.05	280.88	1875.02	191.11	188.84	140.84	57.74	441.85	333.88	270.74
24	203.09	170.78	1277.5	158.9	120.55	82.318	208.88	171.88	245.52	217.88

Tabla XI

Valores promedio de concentración de ciclosporina en sangre contra tiempo.

Tiempo Horas	Media	D.E.	%C.V.
0	244.93	110.29	45.05
1	314.51	179.8	57.17
2	346.57	204.28	58.96
3	674.87	528.74	78.34
4	648.38	453.62	76.13
6	577.06	283.12	50.79
8	413.1	261.51	63.3
12	238.75	118.14	49.49
13	467.71	478.96	102.41
14	627.84	417.18	66.44
15	731.58	403.35	56.13
16	663.24	441.45	66.56
18	521.63	331.48	63.55
20	361.84	186.65	52.75
24	266.56	121.52	47.97

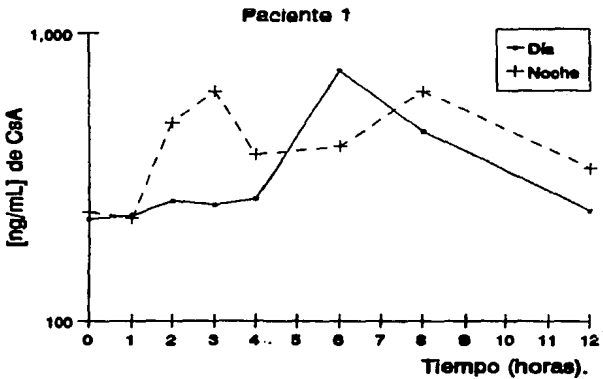


Figura 11

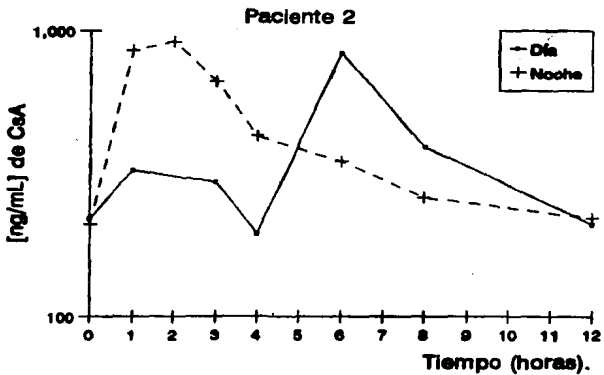


Figura 12

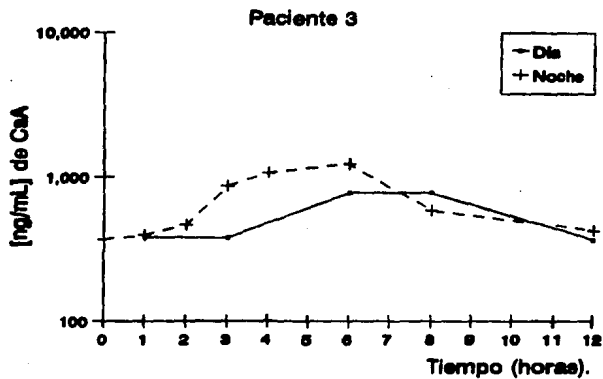


Figura 13

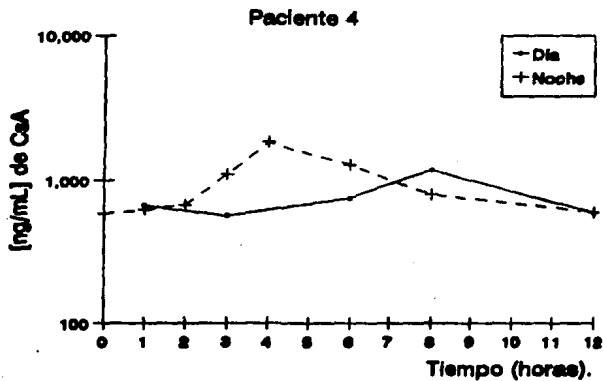


Figura 14

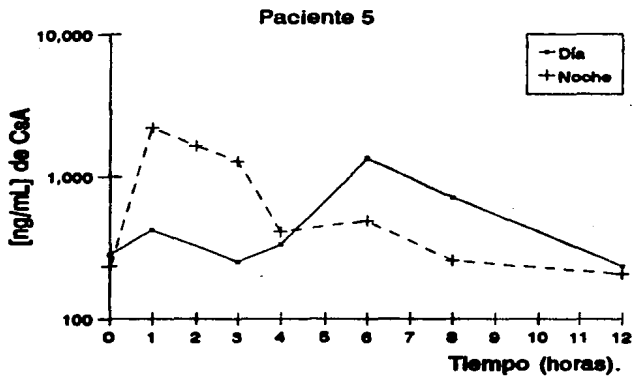


Figura 15

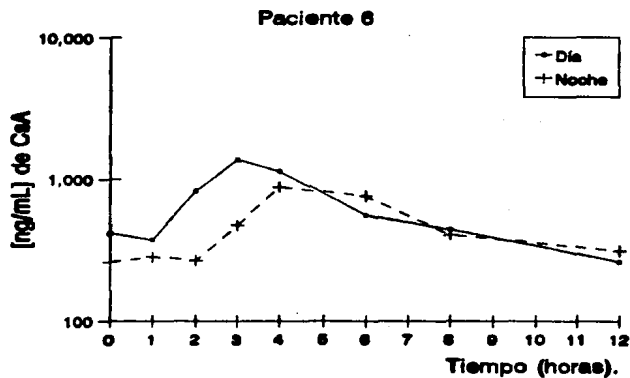


Figura 16

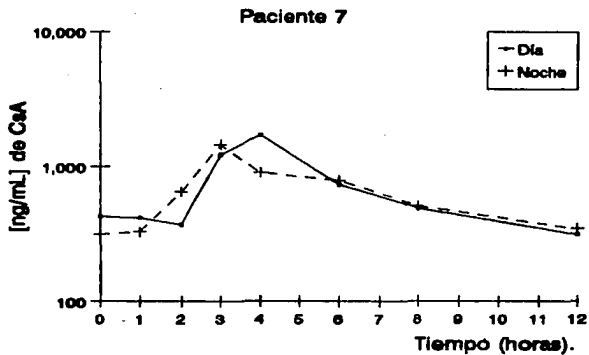


Figura 17

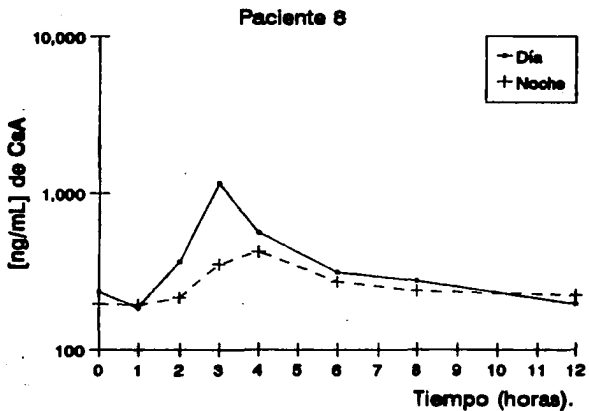


Figura 18

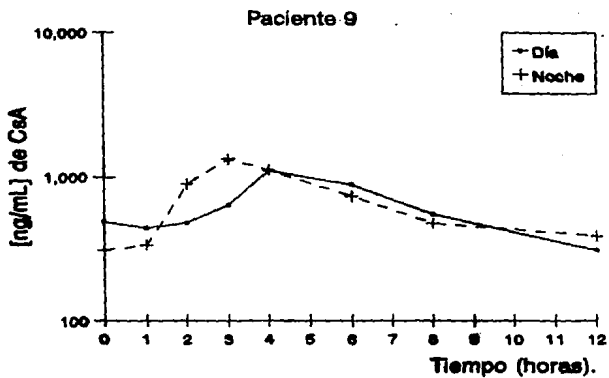


Figura 19

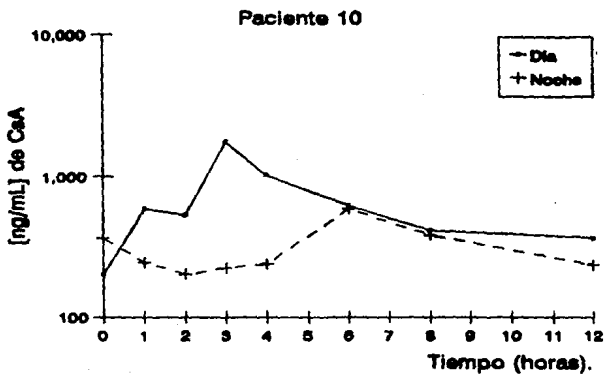


Figura 20

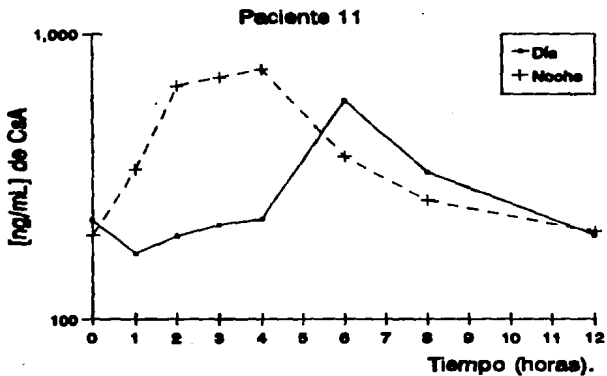


Figura 21

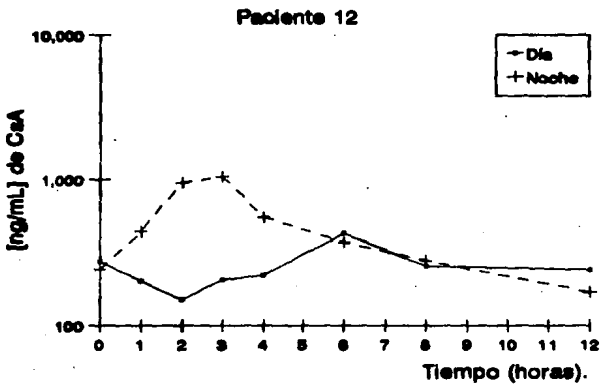


Figura 22

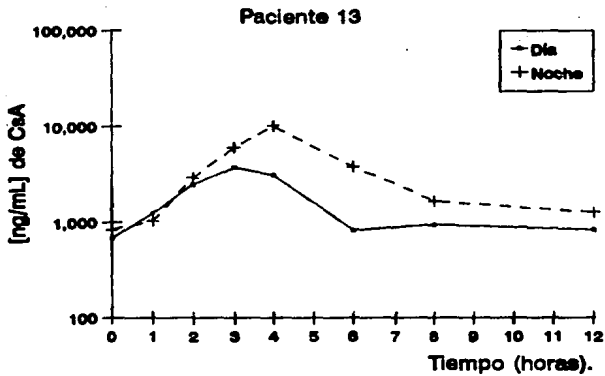


Figura 23

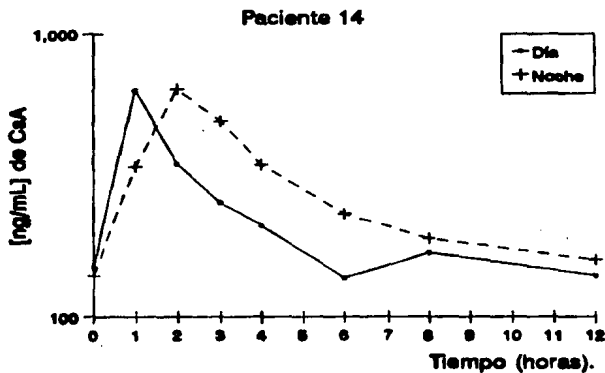


Figura 24

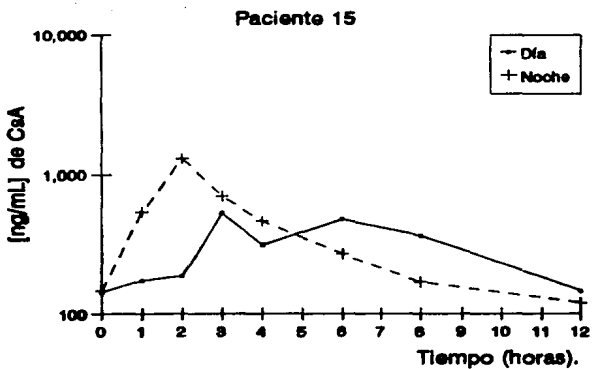


Figura 25

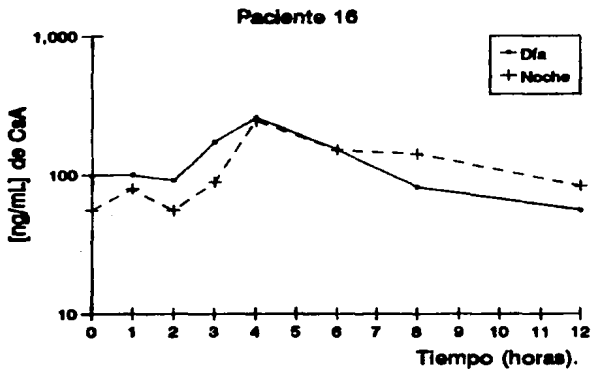


Figura 26

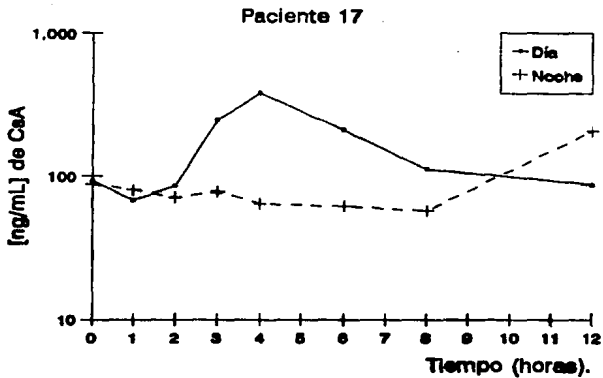


Figura 27

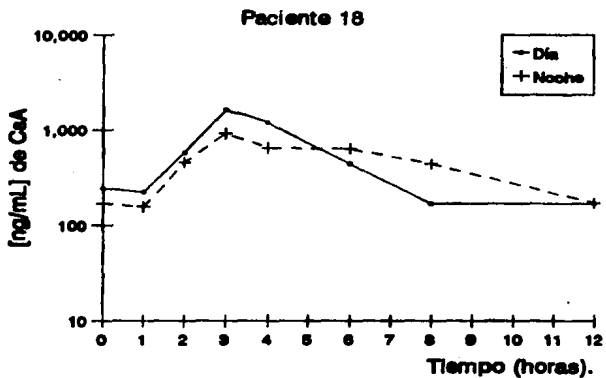


Figura 28

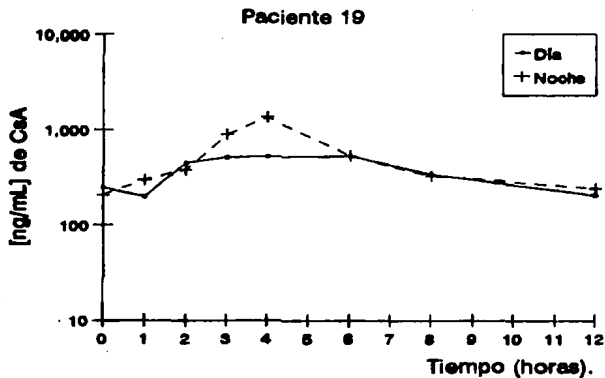


Figura 29

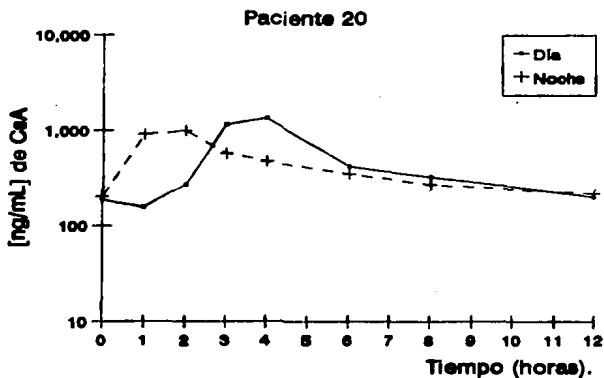


Figura 30

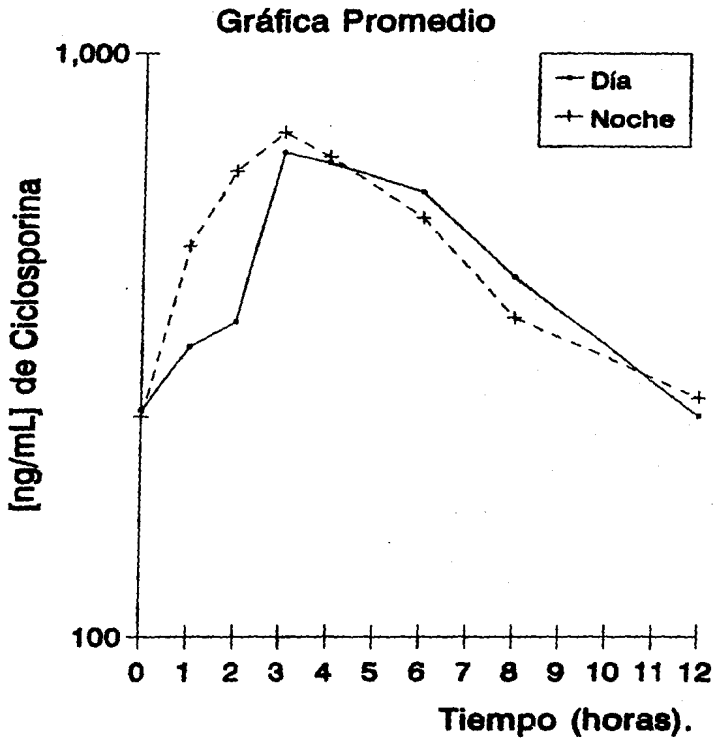


Figura 31

Tabla XI

Parámetros farmacocinéticos diurnos y nocturnos

Farmacocinéticos	Pacientes									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C mín a.m. (ng/mL)	225.59	219.51	382.25	669.96	294.73	415.98	426.59	234.92	488.85	201.72
C mín p.m. (ng/mL)	239.04	210.51	367.35	587.75	234.18	261.40	316.38	196.37	310.49	363.64
C máx a.m. (ng/mL)	729.54	834.97	794.45	1182.83	1351.22	1382.12	1716.40	1151.38	1112.95	1756.91
C máx p.m. (ng/mL)	623.89	914.25	1241.77	1832.54	2208.06	891.24	1457.90	421.38	1340.91	588.83
t máx a.m. (Hrs)	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	3.00	4.00	3.00	4.00	3.00
t máx p.m. (Hrs)	3.00	2.00	6.00	4.00	1.00	4.00	3.00	4.00	3.00	6.00
ABC a.m. (ng/mL * Hrs)	4542.50	4596.92	6565.42	9033.31	6950.43	7464.56	8387.51	4501.86	7552.91	7721.84
ABC p.m. (ng/mL * Hrs)	5344.27	5191.31	8628.70	11811.38	9030.33	5850.92	7787.86	3199.49	8116.44	4006.82
ABC/Doza a.m. (ng/mL * Hrs)	30.28	38.79	32.83	45.17	55.80	59.72	47.93	38.01	80.42	38.81
ABC/Doza p.m. (ng/mL * Hrs)	35.83	40.81	43.14	58.06	64.24	48.81	44.39	26.80	64.93	28.03
ABC/R a.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	28385.65	27458.97	42795.65	59059.28	42845.28	38578.38	43377.11	22817.90	41492.28	39119.78
ABC/R p.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	32988.47	22963.83	49856.03	85247.89	26792.78	33962.81	41542.71	18574.69	42857.80	24849.48
MRT a.m. (Hrs)	8.25	5.97	6.52	6.64	8.14	4.90	5.17	5.07	5.49	5.07
MRT p.m. (Hrs)	6.17	4.50	6.75	6.82	3.69	6.90	6.35	5.81	5.26	6.16
Vd (L) a.m.	206.35	182.28	196.57	144.75	110.35	82.05	107.09	140.74	98.92	131.22
Vd (L) p.m.	173.15	110.40	133.32	96.79	55.81	123.98	120.49	228.82	80.94	307.10
Vd _{ss} a.m. (L/kg)	2.73	2.85	3.01	2.19	1.94	1.12	2.18	2.43	1.70	2.45
Vd _{ss} p.m. (L/kg)	2.29	1.94	2.02	1.47	0.99	1.70	2.43	3.81	1.51	5.74
CVF a.m. (mL/hab/kg)	7.29	7.95	7.89	5.59	5.28	3.82	7.03	7.98	5.18	8.97
CVF p.m. (mL/hab/kg)	6.20	7.16	5.85	4.35	4.55	4.68	7.69	11.23	4.90	15.55
Doza (mg)	150.00	125.00	200.00	200.00	125.00	125.00	175.00	125.00	125.00	200.00

Tabla XII
continuación

Parámetros farmacocinéticos diurnos y nocturnos

Parámetros Farmacocinéticos	Pacientes									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
C mín a.m. (ng/mL)	222.26	276.01	686.47	151.55	143.74	66.81	82.48	244.13	247.84	187.59
C mín p.m. (ng/mL)	186.24	243.78	838.80	140.83	148.85	55.80	87.45	188.85	207.86	202.19
C máx a.m. (ng/mL)	584.04	427.20	3787.22	634.43	530.10	255.59	381.16	1828.53	533.27	1345.81
C máx p.m. (ng/mL)	750.88	1044.78	10214.20	638.38	1286.38	244.28	208.88	823.22	1367.23	983.42
t máx a.m. (Hrs)	8.00	8.00	3.00	1.00	3.00	4.00	4.00	3.00	8.00	4.00
t máx p.m. (Hrs)	4.00	3.00	4.00	2.00	2.00	4.00	12.00	3.00	4.00	2.00
ABC a.m. (ng/mL * Hrs)	3571.18	3145.88	18742.48	2700.73	3783.53	1553.00	1947.03	6084.11	4886.97	5918.88
ABC p.m. (ng/mL * Hrs)	4857.86	5308.46	41983.80	3438.88	4802.18	1504.80	1080.59	5551.82	8278.17	5251.18
ABC/Dosis a.m. (ng/mL * Hrs)	33.71	31.46	149.83	36.01	25.22	29.08	39.84	40.63	30.80	38.47
ABC/Dosis p.m. (ng/mL * Hrs)	48.58	53.08	328.50	46.88	30.68	30.10	21.81	37.01	41.96	35.01
ABCM a.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	22143.84	18880.40	88193.13	13483.88	22069.83	7432.86	10561.41	28843.18	25458.21	28987.03
ABCM p.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	23882.52	24661.88	203360.86	18408.34	18240.38	9082.51	7838.83	30184.71	32230.98	23427.82
MRT a.m. (Hrs)	6.20	6.23	4.78	4.63	5.83	5.12	5.42	4.42	5.55	5.08
MRT p.m. (Hrs)	4.82	4.53	4.85	4.79	3.96	8.04	7.35	5.43	5.13	4.46
Vd (L) a.m.	173.83	186.05	31.74	128.47	231.25	178.03	138.30	108.82	181.24	128.31
Vd (L) p.m.	101.20	86.38	15.08	104.78	128.18	200.55	338.94	146.84	122.62	127.44
Vd ee a.m. (L/kg)	2.57	3.41	0.38	2.57	4.67	2.78	2.11	2.83	2.59	1.80
Vd ee p.m. (L/kg)	1.50	1.47	0.18	2.10	2.78	3.18	5.15	3.56	1.75	1.58
CVF a.m. (mL/min*kg)	6.81	8.13	1.33	9.28	14.21	9.10	6.48	9.83	7.78	5.28
CVF p.m. (mL/min*kg)	5.08	5.41	0.87	7.30	11.68	8.79	11.88	10.90	5.89	5.85
Dosis (mg)	100.00	100.00	125.00	75.00	150.00	50.00	50.00	150.00	150.00	150.00

Tabla XIII

**Parámetros Farmacocinéticos
promedio diurno y nocturno.**

Parámetros Farmacocinéticos	Medio	D.S.	%C.V.
C mín a.m. (ng/mL)	274.43	144.82	52.77
C mín p.m. (ng/mL)	238.75	118.14	49.49
C máx a.m. (ng/mL)	964.19	475.52	49.32
C máx p.m. (ng/mL)	998.27	517.43	51.89
t máx a.m. (Hrs)	4.53	1.71	37.82
t máx p.m. (Hrs)	3.79	2.97	62.66
ABC a.m. (ng/mL * Hrs)	5280.71	2228.19	42.12
ABC p.m. (ng/mL * Hrs)	5563.84	2527.84	45.62
ABC/Dosis a.m. (ng/mL * Hrs)	39.5	10.12	25.82
ABC/Dosis p.m. (ng/mL * Hrs)	41.43	12.88	31.34
ABCM a.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	23494.41	13180.73	44.62
ABCM p.m. (ng/mL * Hrs * Hrs)	28761.21	13836.28	48.46
MRT a.m.(Hrs)	6.88	0.65	11.81
MRT p.m.(Hrs)	5.28	0.89	16.74
Vd (L) a.m	149.49	41.81	27.97
Vd (L) p.m	146.67	74.43	50.74
Vd ee a.m. (L/kg)	2.52	0.8	31.75
Vd ee p.m. (L/kg)	2.48	1.3	52.42
Cl/F a.m. (mL/min*kg)	7.68	2.28	30.21
Cl/F p.m. (mL/min*kg)	7.61	3.16	41.54

IV.- Discusión.

4.1. Método analítico para cuantificar ciclosporina en sangre total.

Una herramienta esencial para el monitoreo terapéutico de fármacos es el establecimiento de métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos, los cuales deberán ser lineales, sensibles, repetibles y específicos (27, 34, 35). Se ha demostrado que los métodos para cuantificar ciclosporina presentan muchos problemas, ya que el patrón de distribución de la ciclosporina en sangre es de aproximadamente 50 % en eritrocitos, 10% en leucocitos y 40 % en plasma (18, 36). En el plasma, aproximadamente el 98 % se une a las proteínas, principalmente a lipoproteínas. En sujetos sanos, la concentración de ciclosporina en sangre es aproximadamente el doble de la cuantificada en plasma; debido a ello, es difícil implementar métodos para cuantificar este fármaco en fluidos biológicos, ya que existen un gran número de factores que pueden influir en la distribución de ciclosporina y en consecuencia en la concentración en plasma.

Entre los factores que afectan la cuantificación de este fármaco se encuentran:

4.1.1. Temperatura

La distribución del fármaco en sangre es dependiente de la temperatura: cuando la temperatura aumenta, la ciclosporina difunde desde el eritrocito al plasma, de manera que a 37° C las concentraciones en plasma son aproximadamente dos veces más altas que a 20° C (9, 11, 15, 18, 24, 25).

4.1.2. Hematócrito

Se ha encontrado una correlación inversa entre las variaciones del hematócrito y las concentraciones de ciclosporina en plasma (9, 11, 15, 18, 24, 25).

4.1.3. Proteínas intraeritrocíticas

La ciclosporina se une a las proteínas internas del eritrocito. La unión es rápida y reversible. Se ha reportado que los eritrocitos llegan a saturarse a una concentración mayor de 5 mg/L, en consecuencia por encima de este valor el incremento en las concentraciones plasmáticas es no lineal (9, 11, 15, 18, 22, 24, 25).

4.1.4. Infección

Las infecciones, las cuales son una complicación frecuente del trasplante, producen un incremento en el número de leucocitos y, probablemente, un incremento en la unión de ciclosporina a leucocitos produciendo, consecuentemente, una alteración de la distribución del fármaco en sangre. También hay un intercambio/transferencia entre las diferentes clases de lipoproteínas y la transferencia desde albúmina a lipoproteínas (11).

4.1.5. Variación Diurna

Las concentraciones y la depuración total de la ciclosporina presentan variaciones diurnas. Por lo tanto las muestras de sangre para cuantificar ciclosporina deben de tomarse a una hora específica del día, antes de la administración de la siguiente dosis (37, 38, 39, 40, 41).

4.1.6. Método analítico

Con base en lo anterior se observa que los resultados de la cuantificación de ciclosporina dependen de la técnica analítica, de la matriz de la muestra empleada y de las condiciones clínicas del paciente. Por lo que se ha recomendado utilizar sangre total para el análisis de ciclosporina (25, 34).

La ciclosporina puede ser cuantificada por métodos específicos en los cuales se determina el fármaco inalterado y por métodos no específicos, que cuantifican conjuntamente los metabolitos y la ciclosporina sin metabolizar. Como los metabolitos aislados muestran baja potencia inmunosupresora, es preferible contar con un método específico. Además, los métodos específicos para cuantificar ciclosporina correlacionan mejor con los episodios de nefrotoxicidad.

Actualmente se están empleando dos métodos para cuantificar los niveles de ciclosporina en los pacientes: cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y radioinmunoensayo (RIA) (35).

La ciclosporina es difícil de analizar por CLAR debido a que es lipofílica, pierde cromóforos y pierde grupos funcionales por derivatización. Su absorbancia máxima se presenta a 214 nm en la cual otros compuestos biológicos pueden interferir, por lo tanto se requiere una extensa preparación de la muestra para remover todas las sustancias interferentes (15).

El método de radioinmunoensayo, en su primera generación, utiliza anticuerpos policlonales que presentan niveles elevados de reactividad cruzada con los metabolitos circulantes. Los radioinmunoensayos de segunda generación se basan en la producción de anticuerpos monoclonales. Para encontrar un anticuerpo que se uniera a la ciclosporina nativa, pero no a los metabolitos, Quesniaux y cols. (42), tamizaron 180 anticuerpos monoclonales para la ciclosporina. El anticuerpo que mostró menos reactividad cruzada se integró en un estuche para RIA (Sandimmun Kit, Sandoz Ltd, Basle, Switzerland) (42). Se reportó que el anticuerpo presenta reactividad cruzada del 3%, 4% y 3% con los metabolitos 1, 10 y 21 respectivamente. Con este radioinmunoensayo se obtienen concentraciones del 7% al 16% más altas que por análisis de CLAR, sin embargo, la correlación entre los dos métodos es excelente ($r > 0.97$) (15).

En el presente trabajo se eligió el método de radioinmunoensayo CYCLO-Trac SP, Immuno Nuclear Corporation, Stillwater, MN, USA (INCStar) para la cuantificación de este fármaco en sangre total. Este método utiliza un anticuerpo monoclonal específico y un trazador yodado que cuantifica únicamente la ciclosporina y no presenta reactividad cruzada con los metabolitos. La corporación INCStar reporta que su estándar se ha recalibrado contra el estándar F de la USP, por lo tanto, el valor asignado para el estándar disminuye aproximadamente un 15 %, minimizando las diferencias entre el método de CLAR y RIA- monoclonal específico (27).

El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del estuche. Al evaluar la variabilidad intra e inter ensayo (Tabla VII) se obtuvieron coeficientes de variación de 0.51 a 2.37 % para la repetibilidad y de 1.14 a 6.21 % para la reproducibilidad.

En la figura 4 se presenta la curva dosis-respuesta promedio. El límite de cuantificación fue de 23 ng/mL. Para supervisar en forma completa el rendimiento congruente de cada ensayo, se verificaron los parámetros de por ciento de unión no específica (% NSB), por ciento de unión máxima (% Bo), pendiente (m) y punto de inflexión. En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos a lo largo de 12 ensayos. En las figuras 5 - 8 se presentan las variaciones inter-análisis de los distintos parámetros empleados para la validación de la curva dosis-respuesta. En todos los parámetros, las dispersiones no fueron mayores a ± 2 desviaciones estándar, lo que permite concluir que el método es adecuado, pues de acuerdo con los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), una curva dosis-respuesta se considera validada cuando la dispersión de los parámetros: %NSB, %Bo, m y punto de inflexión no presentan una fluctuación mayor de ± 2 desviaciones estándar en cuando menos 10 ensayos independientes (43).

Con el fin de asegurar la validez de los análisis, se analizaron muestras control en cada uno de los ensayos realizados. Como se puede observar en las cartas de control de calidad en las figuras 9 y 10 para el nivel 1 y 2 y en los datos de la tabla IX, se concluye que el método es adecuado para efectuar el estudio de cronofarmacocinética.

4.2. Estudio de Cronofarmacocinética en pacientes con trasplante renal.

Existen reportes en la literatura indicando que el uso clínico de la ciclosporina se complica por la gran variabilidad intra e inter individual en su farmacocinética (8, 9, 14). La absorción de ciclosporina después de una administración oral es lenta, incompleta y muy variable, ya que es dependiente de la función hepática, flujo biliar y estado gastrointestinal (9, 44, 45). El metabolismo está determinado genéticamente y la tasa de metabolismo varía grandemente entre los individuos. Más aún la velocidad del metabolismo está relacionada con la edad y puede estar afectada por la medicación concomitante (9, 19, 20). Por lo tanto, la variabilidad intraindividual en la cinética de la ciclosporina se debe a la variabilidad en la absorción, mientras que la causa más importante de la variabilidad interindividual es la capacidad para metabolizar el fármaco. La ciclosporina se metaboliza extensamente en el hígado por varias isoenzimas del citocromo P-450 y se excreta principalmente en la bilis. Con base en la influencia del citocromo P-450 IIIA, se han encontrado 2 tipos de interacción entre la ciclosporina y otros fármacos:

(1) fármacos que inducen la actividad metabólica del citocromo P-450 IIIA disminuyen los niveles sanguíneos de ciclosporina con riesgo de provocar rechazo y

(2) fármacos que inhiben la actividad metabólica del citocromo P-450 IIIA incrementan los niveles sanguíneos de ciclosporina con riesgo de nefrotoxicidad (18, 46).

Con base en lo anterior se recomienda el monitoreo de las concentraciones de ciclosporina en pacientes con trasplante renal bajo tratamiento con este fármaco.

Algunos estudios sugieren que hay variación circadiana en la cinética de la CsA. Por un lado, el estudio de Bowers Ld. y cols. (37) donde demuestran que las concentraciones mínimas en el estado estacionario ($C_{mín.}$) en la noche son más bajas que las $C_{mín.}$ en la mañana. Por otro lado, Venkataramanan y cols. (41) encontraron un incremento en la depuración de CsA en la noche en dos pacientes con trasplante de hígado.

Considerando lo anteriormente mencionado y debido a la variabilidad interindividual que presenta este fármaco, se realizó el presente trabajo en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICh), en veinte pacientes con trasplante renal. Previo al estudio de cronofarmacocinética se

determino la dosis de ciclosporina de cada paciente, la cual se diseñó para mantener concentraciones mínimas en el estado estacionario de 50 - 200 ng/mL, por lo cual las dosis fluctuaron entre 0.79 y 3.34 mg/kg cada doce horas. Las dosis de ciclosporina no fueron modificadas cuando menos desde los 5 días previos al estudio. Todos los pacientes se mantuvieron clínicamente estables. Después de transcurrido este tiempo, se tomaron muestras sanguíneas previas a la administración del medicamento con el fin de determinar los niveles mínimos de ciclosporina en el estado estacionario ($C_{mín.}$) y los demás tiempos de muestreo se seleccionaron de manera tal que se pudiera caracterizar el área bajo la curva (ABC) durante el intervalo de administración diurna y nocturna y de esta manera establecer las posibles diferencias en los parámetros farmacocinéticos después de la administración diurna y nocturna.

4.2.1 Variabilidad inter-individual en las concentraciones sanguíneas de ciclosporina contra tiempo por vía oral.

De los resultados obtenidos, en la tabla X se puede observar la gran variabilidad interindividual en las concentraciones sanguíneas de ciclosporina obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo en los pacientes con trasplante renal. En la tabla XI en la que se presentan los valores promedio (\bar{m}), desviación estándar (D.S.) y coeficiente de variación (%C.V.) para las diferentes concentraciones. No se incluyeron los resultados del paciente 13, debido a los altos niveles sanguíneos de CsA presentados. Los coeficientes de variación más pequeños que se obtuvieron fueron los correspondientes a los tiempos 0, 12 y 24 horas, es decir a las $C_{mín.}$.

En las figuras 11 - 30 en las que se muestran las curvas individuales de concentración de ciclosporina contra tiempo, se refleja gráficamente la variabilidad inter-individual obtenida en este estudio.

4.2.2 Farmacocinética Clínica de Ciclosporina.

4.2.2.1. Administración oral diurna.

Después de la administración matutina de ciclosporina a 20 pacientes con trasplante renal, se obtuvieron los siguientes resultados: concentración mínima promedio en el estado estacionario ($C_{mín.}$) de 274.43 ng/mL, (rango de 92.48 a 686.47 ng/mL), concentración máxima promedio en el estado estacionario ($C_{máx.}$) de 964.19 ng/mL (rango de 255.59 a 3667.22), el valor promedio del tiempo para alcanzar la concentración máxima ($t_{máx.}$),

fue de 4.53 horas (rango de 1 a 8 horas), el área bajo la curva (ABC _{0-12 horas}), con un valor medio de 5290.71 ng/mL*Hr (rango de 1553 a 18742.49 ng/mL*Hr) y el valor promedio del área bajo la curva normalizada por la dosis (ABC _{0-12 horas} / Dosis), fue de 39.50 ng/mL*Hr (rango de 25.22 a 149.93 ng/mL*Hr), el tiempo medio de residencia (MRT), fue de 5.56 hrs (rango de 4.42 a 6.54 hrs), el cual presentó el coeficiente de variación más pequeño (11.61%). El valor del volumen de distribución (Vd), fue de 2.52 L/kg (rango de 0.38 a 4.97 L/kg) y la depuración oral total de ciclosporina (Cl/F) promedio de 7.58 mL/min*kg (rango de 1.3 a 14.21 mL/min*kg). Al comparar los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el presente estudio con los reportados en la literatura, se encontró que el volumen de distribución obtenido por Speck y cols. (35) es de 3.0 ± 0.8 L/kg, y el valor obtenido en el presente trabajo es de 2.50 ± 1.05 L/kg por lo que se observa que los datos obtenidos no difieren en gran medida con los reportados en la literatura.

Al evaluar los niveles sanguíneos de ciclosporina en función de la dosis no se encontró una relación directa entre ambos parámetros, así, los niveles de los pacientes 2, 5, 6, 8, 9 y 13, a los cuales se les administró 125 mg, se encontraban entre 219 y 686 ng/mL, mientras que en los pacientes con dosis más altas, de 200 mg (3, 4 y 10) sus niveles oscilaron entre 201 y 669 ng/mL. Estas diferencias pueden explicarse por la variabilidad inter-individual en la depuración de este fármaco, diferencias en hematócrito, perfil lipoproteico y al peso corporal.

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) reportada después de la administración de una dosis única, es de 6.3 horas en voluntarios sanos a 20.4 horas en pacientes con severa enfermedad hepática (9). Considerando que únicamente se tomaron muestras sanguíneas durante el intervalo de dosificación diurno y nocturno en el estado estacionario, no fue posible calcular la constante de eliminación (k_e) y por lo tanto, el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), sin embargo, se calculó el tiempo medio de residencia (MRT) que es un parámetro modelo independiente, definido como el tiempo medio necesario para que las moléculas del fármaco intacto transiten a través del cuerpo. En teoría, el tiempo medio ocurre al 50 % en una población distribuida normalmente y al 63.2 % para la curva distribuida log-normalmente (32). Los valores obtenidos para el MRT varían entre 4 y 6 horas, con media de 5.43 horas.

4.2.2.2 Administración oral nocturna.

Después de la administración nocturna de ciclosporina a los 20 pacientes con trasplante renal se obtuvieron los siguientes resultados: para $C_{mín}$, un valor promedio de 238.75 ng/mL (rango de 55.6 a 839.9); para $C_{máx}$, el valor medio fue de 998.27 ng/mL (rango de 206.88 a 10214.2 ng/mL); el $t_{máx}$, con un valor promedio

de 3.79 horas (rango de 1 a 12 hrs.). En el caso del (ABC₁₂), el valor medio fue de 5553.64 ng/mL*hr (rango de 1080.59 a 41063.60 ng/mL*hr) y para el ABC₁₂/Dosis, el valor promedio fue de 41.43 ng/mL*hr (rango de 20.03 a 328.5 ng/mL*hr). El valor del MRT fue de 5.29 horas (rango de 3.59 a 7.35 horas) y el Vd con un valor promedio de 2.48 L/Kg (rango de 0.18 a 5.74 L/kg) y para la depuración oral de ciclosporina se obtuvo un valor medio de 7.61 mL/min*kg (rango 0.87 a 15.55 mL/min*kg).

El Vd promedio en el estado estacionario obtenido tanto para la dosis matutina (149.49 L), como para la dosis nocturna (146.67 L), corrobora que el fármaco se fija a tejidos profundos y a tejido adiposo (47).

4.2.3 Variabilidad circadiana en los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina en el estado estacionario.

La secuencia de eventos que ocurren en la misma forma en un período de 24 horas se llama ritmo diurno endógeno. El término ritmo circadiano se utiliza a menudo como sinónimo, sin embargo hay una diferencia entre ritmo diurno y ritmo circadiano; el primero es controlado por mecanismos endógenos, mientras que el último es sincronizado por factores exógenos. Ya que la mayor parte de las funciones del cuerpo humano, tal como gasto cardíaco, velocidad de secreción de varios fluidos, motilidad gastrointestinal, flujo sanguíneo renal y hepático, muestran ritmo circadiano, se espera que para muchos fármacos, uno o más de los parámetros farmacocinéticos puedan estar influenciados por dichos ritmos biológicos (48).

Existe en la literatura información acerca de que la farmacocinética de algunos fármacos (anfetaminas, dexametasona, etanol, hexobarbital, hidrocortisona, hierro, lidocaína, litio, prednisolona) esta sujeta al ritmo circadiano. Esta información es importante ya que repercute en la manera de administrar el fármaco.

Este trabajo se dedicó a establecer la importancia de la variabilidad circadiana para la ciclosporina, considerando que es un fármaco muy utilizado en la práctica hospitalaria, que la información existente de la variabilidad circadiana es escasa y a la necesidad de sustentar un regimen de dosificación adecuado para los pacientes.

En la tabla XII, en la que se resumen los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos, tanto después de la administración matutina como nocturna, se puede apreciar la gran variabilidad inter-individual en ambas horas del día. En la misma tabla se puede apreciar que los valores de concentración mínima

en el estado estacionario. C_{\min} .. antes de la administración nocturna son más bajos, lo cual podría deberse a diferencias en el metabolismo o terapia concomitante. El valor de C_{\max} .. es ligeramente más alto después de la administración nocturna, el t_{\max} se alcanza más rápidamente después de la administración nocturna y el área bajo la curva es un poco mayor en la noche. Sin embargo al hacer la corrección por dosis, las áreas bajo la curva son muy semejantes; lo mismo ocurre con el tiempo medio de residencia y el V_{dee} ; en la misma tabla se observa la semejanza de los valores de depuración obtenidos.

Con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina en el estado estacionario durante la administración diurna y nocturna, se realizó la prueba de t pareada. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes parámetros: C_{\max} ., t_{\max} ., ABC_{0-12} ., ABC_{0-12}/Dosis ., MRT ., V_{dee} y Cl/F a un nivel de significancia de 0.05, sin embargo para el valor de C_{\min} .. la diferencia fué estadísticamente significativa a un nivel de $P < 0.05$.

Venkataramanan y cols. (41) estudiaron la variación diurna en la cinética de la ciclosporina en 2 pacientes con trasplante de hígado y reportan una depuración mayor en la noche que en el día, atribuyendo sus resultados a variaciones circadianas en una o más de las enzimas hepáticas que metabolizan el fármaco (42) y/o a posibles cambios diurnos en la distribución plasmática de las lipoproteínas.

Bowers y cols. (37) evaluaron el efecto del ritmo circadiano en 24 pares de concentraciones mínimas de ciclosporina en el estado estacionario (C_{\min} .) en el día y en la noche. Los autores reportan que 18 de los 24 pares de concentraciones de ciclosporina fueron más bajas para la dosis matutina que para la dosis nocturna; lo cual fue asociado a que la dosis proporcionada por la mañana, se absorbe (44) y metaboliza más rápido durante el día que durante la noche proporcionando valores más pequeños de concentración mínima antes de la dosis nocturna.

Canafax y cols. (38), durante un seguimiento de rutina en pacientes con trasplante de páncreas observaron que en 18 (75%) de 24 pares de concentraciones mínimas en el estado estacionario (C_{\min} .) a.m./p.m., las C_{\min} .. fueron más bajas después de una dosis de ciclosporina matutina comparada con las C_{\min} .. después de la dosis nocturna. Atribuyen sus resultados a un incremento en la absorción y/o a una disminución del metabolismo, durante la noche.

Sabaté y cols. (40) evaluaron la variaciones diurnas, comparando pares de $C_{mín.}$ de ciclosporina y de sus metabolitos en pacientes con trasplante renal divididos en 2 grupos: hospitalizados (11 pacientes) y ambulatorios (11 pacientes). Dieciseis (72%) de 22 pacientes mostraron valores más altos antes de la dosis matutina que antes de la dosis nocturna. Cuando los pacientes fueron divididos en 2 grupos; 10 (91%) de 11 pacientes ambulatorios mostraron el mismo comportamiento en las $C_{mín.}$, mientras que únicamente 6 (54%) de 11 de los pacientes hospitalizados mostraron el mismo resultado, lo cual atribuyeron a variaciones circadianas entre los periodos de descanso y los periodos activos, más que a la actividad de las enzimas hepáticas encargadas del metabolismo del fármaco.

Ohlman y cols. (39) encontraron que 22 de los 28 valores obtenidos de $C_{mín.}$ nocturnas fueron más bajos que los valores de $C_{mín.}$ matutinos.

El presente estudio confirma estos hallazgos, al observar que en 11 de los 20 pacientes los valores de $C_{mín.}$ fueron más altos antes de la dosis matutina que antes de la dosis nocturna, en 2 de 20 pacientes las $C_{mín.}$ fueron más bajas antes de la dosis matutina que antes de la dosis nocturna y en 7 pacientes no hubo diferencias. Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el área bajo la curva (ABC) y la depuración después de la administración oral (Cl/F) de ciclosporina, es de interés mencionar que los pacientes que presentan un valor de depuración menor durante la noche, presentan valores de $C_{mín.}$ mayores antes de la dosis matutina.

En la tabla XVI se presentan los valores obtenidos por Ohlman y cols. (39) en comparación con los obtenidos en el presente estudio, en la que se puede observar que en general, los valores son más altos que los reportados, ello puede deberse a que algunos de los pacientes recibían la ciclosporina conjuntamente con diltiazem y/o verapamil, ya que los agentes bloqueadores de canales del calcio (diltiazem y verapamil) son empleados para el tratamiento de la hipertensión en los pacientes con trasplante renal y uno de sus efectos es aumentar significativamente los niveles sanguíneos de ciclosporina (20).

Como se puede observar en la tabla V, a 10 de los pacientes se les administró la ciclosporina conjuntamente con diltiazem y uno de ellos recibió ciclosporina y verapamil. Por lo que los valores más altos en los niveles de concentración mínima de ciclosporina en el estado estacionario, $C_{mín.}$ y en ABC/Dosis pueden ser atribuidos a la terapia concomitante.

Tabla XIV
Prueba de t pareada para los diferentes
parámetros farmacocinéticos bajo estudio

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
Cafén es		
	Diurno	Nocturno
Media	274.43	239.75
Variancia	20971.98	13968.18
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.87	
Variancia total	14892.94	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	2.17	
P(T<t) una cola	0.02	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.04	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
ABC		
	Diurno	Nocturno
Media	6290.71	5563.64
Variancia	4964836.12	6389998.49
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.80	
Variancia total	4601482.06	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	-0.76	
P(T<t) una cola	0.23	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.46	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
ABC/Dosis		
	Diurno	Nocturno
Media	39.60	41.43
Variancia	102.42	188.62
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.57	
Variancia total	74.64	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	-0.77	
P(T<t) una cola	0.23	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.46	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
ABCN		
	Diurno	Nocturno
Media	29494.41	28761.21
Variancia	173204771.61	194191996.45
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.89	
Variancia total	164015662.43	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	0.51	
P(T<t) una cola	0.31	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.62	
t Crítica dos colas	2.10	

Tabla XIV
continuación
Prueba de t pareada para los diferentes
parámetros farmacocinéticos bajo estudio

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
MRT		
	Diurno	Nocturno
Media	5.65	5.29
Variancia	0.42	0.79
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	-0.19	
Variancia total	-0.11	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	0.96	
P(T<t) una cola	0.18	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.35	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
C máx es		
	Diurno	Nocturno
Media	964.19	966.27
Variancia	226122.78	267730.23
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.33	
Variancia total	61676.92	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	-0.26	
P(T<t) una cola	0.40	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.80	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
t máx		
	Diurno	Nocturno
Media	4.63	3.79
Variancia	2.93	5.62
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	-0.01	
Variancia total	-0.05	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	1.09	
P(T<t) una cola	0.14	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.29	
t Crítica dos colas	2.10	

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
Vdes		
	Diurno	Nocturno
Media	2.52	2.48
Variancia	0.64	1.69
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.11	
Variancia total	0.11	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	0.13	
P(T<t) una cola	0.45	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.90	
t Crítica dos colas	2.10	

Tabla XIV
continuación
Pruebas de t pareada para los diferentes
parámetros farmacocinéticos bajo estudio

Prueba de t pareada para la media de dos muestras		
CHF		
	Diurno	Nocturno
Media	7.68	7.61
Variancia	6.24	10.00
Observaciones	19.00	19.00
Correlación de Pearson	0.63	
Variancia total	3.86	
Hipótesis de diferencia de medias	0.00	
Grados de libertad	18.00	
t calculada	-0.06	
P(T<t) una cola	0.48	
t Crítica una cola	1.73	
P(T<t) dos colas	0.96	
t Crítica dos colas	2.10	

Tabla XV

Comparación de la variabilidad circadiana en la farmacocinética de CsA, entre la reportada por Ohman y cols. y el presente estudio realizado en el INCICH.

Parámetros farmacocinéticos	Ohman		INCICH	
	Diurno	Nocturno	Diurno	Nocturno
Cmín se [ng/mL]	185 (101)	223 (113)	274.43 (114.82)	238.75 (118.14)
Cmáx se [ng/mL]	814 (423)	858 (513)	964.19 (475.52)	898.27 (517.43)
t _{max} (Hrs)	2.85 (1.35)	3.48 (2.18)	4.53 (1.71)	3.79 (2.37)
AUC/Dozis (ng/mL · Hrs)	22.1 (9.41)	22.8 (9.87)	38.50 (10.12)	41.43 (12.88)

V. Conclusiones.

- 5.1. El método de radioinmunoensayo, para cuantificar ciclosporina A en sangre, fué repetible y reproducible en el rango de 23 a 1343 ng/mL, por lo cual se consideró adecuado para realizar el estudio de cronofarmacocinética.
- 5.2. La ciclosporina A se distribuye en tejidos profundos y adiposo, con un tiempo medio de residencia de 5.43 horas. La depuración de este fármaco fue de 7.60 mL/min/Kg.
- 5.3. Existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de C_{min} en el estado estacionario después de la administración diurna y nocturna, sin embargo, considerando la gran variabilidad interindividual, no sería recomendable disminuir la dosis nocturna, ya que algunos pacientes no presentaron variación en los niveles diurnos y/o nocturnos y otros más tenían niveles más bajos en la noche. El proponer el cambio de una dosis nocturna más baja, ocasionaría que aquellos pacientes que no se vean influenciados por el ritmo circadiano presenten cambios considerables en sus niveles en el estado estacionario.
- 5.4. Se recomienda el monitoreo de niveles sanguíneos por la mañana y por la noche, con el fin de individualizar la terapia y en caso necesario hacer el ajuste de dosis correspondiente.

Apéndice 1

Cálculo de la curva de calibración

Tubo	CPM	CPM	CPM	%	$y = \%Bq/a$	$x = \text{Concentración [ng/ml]}$	Parámetros de la curva de calibración
	Duplicado	Promedio	Corregido	Enlaceado		$x = \left(\frac{y-d}{f-d} - 1\right)^{1/n} = c$	
cpm T1	51045	50891.5					
cpm T2	50738						
NBB 1	1221	1327.5		2.81			
NBB 2	1434						
STD 0-1	25323	25432	24194.5	49.97			
STD 0-2	25641						
STD A-1	22781	22905.5	21478		88.10	20.00	a = 98.888
STD A-2	22830						b = 1.0262
STD B-1	18950	19823.5	18296		75.90	61.00	c = 215.06
STD B-2	19307						d = -0.7569
STD C-1	14943	14910.5	13583		56.35	154.00	
STD C-2	14978						
STD D-1	9506	9589.5	8242		34.19	379.00	
STD D-2	9833						
STD E-1	4883	4858	3530.5		14.85	1099.00	
STD E-2	4623						
CT 1-1	16226	16122	14794.5		61.38	124.87	control 1
CT 1-2	16019						
CT 2-1	9784	9589.5	8242		34.19	379.41	control 2
CT 2-2	9375						



INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
"IGNACIO CHAVEZ"

A U T O R I Z A C I O N G E N E R A L

El que suscribe* solicita ser atendido en el I.N.C. y, al efecto, acepta sujetarse a las disposiciones del Reglamento Interior de la Institución. De igual modo autoriza a sus médicos para que hagan en él los estudios e implantar los tratamientos que en su caso juzgen necesarios.

Esta autorización es también aplicable a las intervenciones quirúrgicas igualmente a los estudios anatomopatológicos que, eventualmente, pudieren requerirse para precisar el diagnóstico de su caso.

NOMBRE Y FIRMA DEL ENFERMO
O DE LA PERSONA LEGALMENTE
RESPONSABLE

FECHA

TESTIGO

A U T O R I Z A C I O N E S E S P E C I A L E S

REINGRESOS,
ESTUDIOS ESPECIALES,
INTERVENCIONES QUIRURGICAS

FECHA

NOMBRE Y FIRMA DEL ENFERMO
O DE LA PERSONA LEGALMENTE
RESPONSABLE*

* Cuando el enfermo sea menor de edad, firmará alguno de los padres o, en su defecto, el tutor o la persona que tenga al niño bajo su cuidado.

VII
Bibliografía.

- 1.- Delpin S E , Speare R J O. Trasplante de órganos. Salvat Mexicana de Ediciones, S.A. de C.V. 1987: capítulo 12, 181-198.
- 2.- Murray J E, Merrill, J P, Harrison J H. Prolonged survival of human kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. New Engl J Med 1963; 268:1315
- 3.- Thomson A W, Woo J and Cooper M. Mode of Action of Immunosuppressive Drugs with Particular Reference to The Molecular Basic of Macrolide-Induced Immunosuppression. The Molecular Biology Immunosuppression Edited by A.W. Thomson Published 1992 by Jonh Wiley and Sons Ltd: 153-179.
- 4.- Shaefer M, Williams L. Nursing Implications of Immunosuppression in Transplantation. Nursing Clinics of North America. 1991 Vol. 26, No. 2: 297-307.
- 5.- Kahan B D. Cyclosporine: The Agent and Its Actions. Transplantation Proceedings 1985; Vol. XVII, No. 4, Suppl 1 (August): 5-18.
- 6.- Schreiber S L and Crabtree G R. The mechanism of action of Cyclosporin A and FK 506. Immunology Today 1992; Vol 13, No. 4: 136-142.
- 7.- Wong R L, Winslow C H M and Cooper K D. The mechanisms of action of cyclosporin A in the treatment of psoriasis. Immunology Today 1993; Vol 14, No. 2: 69-74.
- 8.- Ptanchcinski R J, Venkataramanan R, Rosenthal J T, Burckart G J, Taylor R J, Hakala T R. Cyclosporine kinetics in renal transplantation. Clin Pharmacol Ther 1985; 38: 296-300.
- 9.- Ptachcinski R J, Venkataramanan R and Burckart G J. Clinical Pharmacokinetics of Cyclosporin. Clinical Pharmacokinetics 1986; 11: 107-132.
- 10.- Ptachcinski R J, Venkataramanan R, Burckart G J, Gray J A, Van Thiel D H, Sanghvi A, and Rosenthal J T. Cyclosporine Kinetics in Healthy Volunteers. J Clin Pharmacol 1987; 27: 243-248.
- 11.- Rodighiero V. Therapeutic drug monitoring of cyclosporin. Practical applications and limitations. Clin Pharmacokinetic 1986; 16: 27-37.

12.- Rowland M. Critique of Cyclosporine Pharmacokinetic Measurements. Transplantation Proceedings 1986; Vol XVIII, No. 6, Suppl 5 (December): 257-262.

13.- Rowland M, Johnson R W G, Solomon L R, Legg B and Gupta S K. Pharmacokinetics of cyclosporin: influence of rate of constant intravenous infusion in renal transplant patients. Br J Clin Pharmacol 1987; 24: 519-526.

14.- Lindholm A, Henricsson S, Lind M, and Dahlquist R. Intraindividual variability in the Relative Systemic Availability of Cyclosporin After Oral Dosing. Eur J Clin Pharmacol 1988; 34: 461-464.

15.- Lindholm A. Therapeutic monitoring of cyclosporine - an update. Eur J Clin Pharmacol 1991; 41: 273-283.

16.- Kahan B D, Kramer W G, Wideman C, Flechner SM, Lorber M I, van Buren C T. Demographic factors affecting the pharmacokinetics of cyclosporine estimated by radioimmunoassay. Transplantation 1986; 41: 459-464.

17.- Lemaire M and Tillement J P. Role of lipoproteins and erythrocytes in cyclosporin A in the blood. J Pharm Pharmacol 1982; 34: 715-718.

18.- Lindholm A. Factors Influencing the Pharmacokinetics of Cyclosporine in Man. Therapeutic Drug Monitoring 1991; 13: 465-477.

19.- Kohlhaw K, Wonigeit K, Frei U, Oldhafer K, Neumann K, and Pichlmayr R. Effect of the Calcium Channel Blocker Diltiazem on Cyclosporin A Blood levels and Dose Requirements. Transplantation proceedings 1988; Vol XX, No.2, Suppl 2 (April): 572 - 574.

20.- Wagner K, Philipp Th, Heinemeyer G, Brockmüller F, Roots I, and Neumayer H-H. Interaction of Cyclosporine and Calcium antagonists. Transplantation Proceedings 1989; Vol 21, No 1 (February): 1453-1456.

21.- Gravel J and Kahan B D. Area Under the Curve Monitoring of Cyclosporine Therapy: The Early Post transplant Period. Therapeutic Drug Monitoring 1991; 13: 89-95.

22.- Gravel J. Optimisation of Immunosuppressive Therapy Using Pharmacokinetic Principles. Clin Pharmacokinetic 1992; 23(5): 380-390.

23.- Kahan B D. Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. Transplantation 1985; 40(5): 457-476.

24.- Kahan B D, Grevel J. Optimizacion of cyclosporine therapy in renal transplantation by a pharmacokinetic strategy. Transplantation 1988; 46(5): 631-644.

25.- Keown P A. Clinical Application of Therapeutic Drug Monitoring. Optimizing Cyclosporine Therapy: Dose, Levels and Monitoring. Transplantation proceedings 1988; Vol XX, No. 2, Suppl 2 (April): 382-389.

26.- Lindholm A., Kahan B D. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. Clinical Pharmacology and Therapeutics 1993; 54(2): 205-218.

27.- Shaw L M. Advances in Cyclosporine Pharmacology Measurement, and Therapeutic Monitoring. Clin Chem 1989; 35(7): 1299-1308.

28.- Ekin R. The "Precision Profile": Its Use in RIA Assessment and Desing. Institute of Nuclear Medicine Middlesex Hospital Medical School University of London 1981; Vol 4, No. 2: 33-34.

29.- Kuo J, Fox E, Mitchell D and Tuerke T. Transforms and Curve Fitting Reference. Sigma Plot Scientific Graph System. April 1992; 11.8 - 11.9 y 12.1 - 12.14.

30.- Flechner S M, Van Buren C T, Jarowenko M, Kerman R and Kahan B D. The Fate of Patients Converted from Cyclosporine to Azathioprine to Improve Renal Function. Transplantation Proceedings 1985; Vol XVII, No. 1 (February): 1227-1230.

31.- Fries D, Kechrid C, Charpentier B, Hammouche M, and Moulin B. A Prospective Study of a Triple Association: Cyclosporine, Corticosteroids, and Azathioprine in Immunologically High-Risk Renal Transplantation. Transplantation Proceedings 1985; Vol XVII, No. 1 (February): 1231-1234.

32.- Yamaoka K, Nakagawa T and Uno T.. Statistical moments in pharmacokinetics. J Pharmacokin Biopharm 1978; 6: 547 - 558.

33.- Perrier D. and M. Mayersohn. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution for any mode of administration. J Pharm Sci 1982; 71: 372-373.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

34.- Johnston A, Marsden J T and Holt D W. The Continuing Need for Quality Assessment of Cyclosporine Measurement. Clin Chem 1989; 35(7): 1309-1312.

35.- Speck R F, Frey F J and Frey B M. Cyclosporine Kinetics in Renal Transplant Patients as Assessed by High-Performance Liquid Chromatography and Radioimmunoassay Using Monoclonal and Polyclonal Antibodies. Transplantation 1989; 47 (5): 802-806.

36.- Yatscoff R W, Honcharik N, Lukowski M, Thliveris J, Chackowsky P, and Faraci C. Distribution of Cyclosporina G (NVA^s Cyclosporin) in Blood and Plasma. Clin Chem 1993; 39(2): 213-217.

37.- Bowers L D, Canafax D M, Singh J, Seifedlin R, Simmons R L, Najarian J S. Studies of cyclosporine blood levels: analysis, clinical utility, pharmacokinetics, metabolites, and chronopharmacology. Transplantation Proceedings 1986; 18 (suppl 5): 137-143.

38.- Canafax D M, Cipolle R J, Hrushesky W J M, Rabatin J T, Min D I, Graves N M, Sutherland D E R and Bowers L D. The Chronopharmacokinetics of Cyclosporine and Its Metabolites in Recipients of Pancreas Allografts. Transplantation Proceedings 1988; Vol XX, No.2, Suppl 2 (April): 471-477.

39.- Ohlman S, Lindholm A, Hägglund H, Säwe J and Kahan B D. On the intraindividual variability and chronobiology of cyclosporine pharmacokinetics in renal transplantation. Eur J Clin Pharmacol 1993; 44: 265-269.

40.- Sabaté I, Grifó J M, Castelao A M, Arranz B, Gonzalez C, Gullén E, Díaz C, Hugué J, Gracia S. Diurnal Variation of cyclosporine and metabolites in renal transplant patients. Transplantation Proceedings (1990); 22: 1700-17001.

41.- Venkataramanan R, Yang S, Burckart G J, Ptachcinski R J, Van Thiel D H, Starzl T E. Diurnal variation in cyclosporine kinetics. Ther Drug Monit 1986; 8: 380-381.

42.- Quesniaux V, Schreier T R, Maurer G, Regenmortel V. Potential of monoclonal antibodies to improve therapeutic monitoring of cyclosporine. Clin Chem 1987; 33: 32-37.

43.- Tovar B N, Pérez Palacios G y Ulloa-Aguirre A. Análisis de Datos y Control de Calidad en el Radioinmunoanálisis de Hormonas Esteroides. Departamento de Biología de la Reproducción INNSZ Mexico (1982).

44.- Drewe J. Beglinger Ch. and Kissel T. The absorption site of cyclosporin in the human gastrointestinal tract. Br J Clin Pharmac 1992; 33: 39-43.

45.- Lemmer B and Nold G. Circadian changes in estimated hepatic blood flow in healthy subjects. Br J Clin Pharmac 1991; 32: 627-629.

46.- Kronbach T, Fischer V, and Meyer U. A. Cyclosporine metabolism in human liver: Identification of a cytochrome P-450 III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. Clin Pharmacol Ther 1988; 43: 630-635.

47.- Alkinson K. Boland J and Britton K. Transplantation Proceedings 1983; 15 (suppl 1): 2430

48.- Ritschel W A. Chronopharmacokinetics. Pharmacy International May 1984; 5: 116-122.