



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
Depto. de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
HOSPITAL LUIS CALVO MACKENNA
Laboratorio Bioquímica-Central
Sección Fármacos

**DETERMINACION DE
ACIDO MICOFENOLICO
EN PACIENTES PEDIATRICOS
TRASPLANTADOS RENALES**

PROF. PATROCINANTE

QF María Nella Gai
Depto. de Ciencias y
Tecnología Farmacéuticas
Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas.

DIRECTOR DE TESIS

QF Susana Valdebenito
Jefa Laboratorio de
Bioquímica Central
Hospital Luis Calvo Mackenna.

QF Iván Saavedra
Jefe Laboratorio Farmacocinética
Facultad de Medicina
Universidad de Chile.

MEMORIA DE PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACEUTICO

MARCELO RODRIGO GATICA PULGAR
SANTIAGO, CHILE
2006

AGRADECIMIENTOS

Dedicatoria:

A mis padres, por su comprensión, respaldo y cariño. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mi polola Q.F. Lorena Becerra A. por su constante apoyo, consejos prácticos y compañía durante mi Tesis.

A .Q.F. Susana Valdevenito y. Q.F. Hilda Kunzagk, por su constante apoyo y guía durante la elaboración de esta Tesis, por permitir en su laboratorio las determinaciones por la técnica EMIT y ensayos empleados en la Tesis, y por su esmero en la revisión y corrección de ésta.

A Q.F. Carolina Salas por su compromiso, consejos prácticos y ayuda brindada inicialmente en el laboratorio y luego desde la distancia fuera de Chile en su estadía en el Instituto Mario Negri en Italia.

A Q.F. Clara Rodrigo, por su confianza y apoyo en mí proyecto de Tesis.

Al Dr. Q.F. don Iván Saavedra por sus consejos prácticos, colaboración, y guía en el desarrollo de esta Tesis, y por permitir en su laboratorio la determinación por HPLC para la comparación del método.

Finalmente, deseo expresar mis agradecimientos a la profesora Q.F. Nella Gay, por su compromiso, consejos prácticos y motivación infundada en el transcurso de mi Tesis. Además de la Q.F. Inés Ruiz y Q.F. Guillermo Diaz, quienes conforman la comisión de Tesis, por la diligente revisión y corrección de este manuscrito.

FINANCIAMIENTO

La ejecución de la presente Tesis fue posible al financiamiento autorizado por la Dirección del Hospital Luís Calvo Mackenna, como parte del proceso de puesta en marcha de la medición rutinaria de niveles de Ácido Micofenólico. En particular a la Dra. Dolores Tohá, quien a través de la confianza depositada en la sección fármacos del laboratorio de bioquímica se esmeró en autorizar el financiamiento durante su jefatura en dicha Dirección.

RESUMEN

El presente trabajo ha sido orientado al estudio y formulación de un protocolo para la determinación de los niveles plasmáticos de ácido micofenólico en pacientes pediátricos trasplantados renales. La cuantificación del ácido micofenólico fue hecha en el Servicio del Laboratorio Clínico del Hospital Luis Calvo Mackenna, a través de la técnica de EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), utilizando como referencia la determinación por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) realizada en el Laboratorio de Farmacocinética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El criterio adoptado en relación a las condiciones de toma de muestra para el fármaco se basó en la revisión bibliográfica de las características farmacocinéticas y formas de administración del fármaco y se estableció en consenso con todo el equipo de salud, que comprende al cuerpo Médico, Químico Farmacéutico y Enfermeras.

Este estudio constituye una herramienta para crear un Servicio de Farmacocinética Clínica, que proporcione ayuda e información a la comunidad del hospital, con el fin de obtener un uso racional de los niveles plasmáticos y mejorar la relación costo/beneficio de las mediciones de las concentraciones plasmáticas de medicamentos. Para que la determinación de niveles de ácido micofenólico en el laboratorio de Bioquímica Central del Hospital tuviera validez, se revisaron las fichas clínicas de los pacientes y se diseñaron fichas adecuadas para un servicio de Farmacocinética clínica que recogerán datos sobre el paciente, cumplimiento y adherencia de la terapia, hora de última toma de dosis, hora de toma de muestra, entre otros.

DETERMINATION OF MICOPHENOLATE IN PATIENT PEDIATRIC RENAL-TRANSPLANT

SUMMARY

The aim of this work has been the study and formulation of a protocol to measure mycophenolic acid plasma concentration in pediatric renal transplant recipients, in the Clinical Laboratory of the Hospital Luis Calvo Mackenna, through the EMIT technique (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique), and its comparison with the gold standard HPLC (High Performance Liquid Chromatography) in the Laboratory of Pharmacokinetics of the Faculty of Medicine of the University of Chile.

The approach adopted in relation to the conditions of sampling to assay mycophenolic acid was based on the bibliographical revision and was settled down in agreement with the whole health team: Physicians, Pharmacists and Nurses.

The present study constitutes a tool to create a Clinical Pharmacokinetic Service for counselling and giving information to the hospital staff in order to get a rational use and improve the cost/benefit ratio of drug plasma level determinations. In order to assure the validity of the determination of mycophenolic acid levels in the Biochemistry Center Laboratory of the Hospital, the clinical schedule of the patients were reviewed and a rationale schedule was design in order to obtain appropriate samples for monitoring. Such schedule will contain patient data, adherence to the therapy, time of last dose, time of taking the sample, among others.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivos específicos	7
3. PACIENTES, MATERIALES Y METODOS	8
3.1 Pacientes	8
3.2 Caracterización de los pacientes	9
3.2.1 Caracterización en fichas.	9
3.3 Materiales	12
3.4 Metodología	13
3.4.1 Sistema de toma de muestra.	13
3.4.2 Caracterización de la toma de muestra.	13
3.4.3 Indicación de la toma de muestra	14
3.4.4 Ejecución de la técnica EMIT	14
3.4.5 Estudio de la correlación EMIT/HPLC, para la validación del protocolo de MPA.	17
4. MEDICIÓN DE MPA POR EMIT Y HPLC	20
4.1 Medición de MPA por ENZIMOINMUNOENSAYO EMIT®2000	20
4.1.1 Preparación de la prueba.	22
4.1.1.1 Recolección de muestra y manipulación.	22
4.1.1.2 Drogas y reactivos.	22
4.2 Medición de MPA por HPLC	24
4.2.1 Preparación de la prueba.	24
4.2.1.1 Recolección de muestra y manipulación.	24
4.2.1.2 Drogas y reactivos.	25
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	26
6. RESULTADOS.	28
6.1 Protocolo y fichas	28
6.2 Análisis demográfico de estudio de correlación EMIT/HPLC	28
6.3 Análisis Comparativo EMIT-HPLC	31
6.3.1 Reproducibilidad	31
6.3.1.1 Reproducibilidad del HPLC.	32
6.3.1.2 Reproducibilidad del EMIT.	33
6.3.2 Validez de EMIT	34
7. DISCUSIÓN	38
8. CONCLUSIÓN	43
9. BIBLIOGRAFÍA	54

ANEXOS

1 FECHAS MONITOREO Y NIVELES DE MPA.	44
2 CONSENTIMIENTO INFORMADO	
ASENTIMIENTO PARA EL PACIENTE MAYOR DE 12 AÑOS	45
3 FICHA MONITOREO MPA.	49
4 SISTEMA DE TOMA DE MUESTRA PARA LA CORRECTA MONITORIZACIÓN DEL MICOFENOLATO.	50
5 REQUERIMIENTOS TÉCNICOS ADMINISTRATIVOS DEL EXAMEN	51
6 SOLICITUD MONITOREO NIVEL PLASMÁTICO DE DROGAS	52
7 FICHA DE MANTENIMIENTO, SOLUCIÓN DE PROBLEMAS Y MENSAJES DE ERROR.	53

ABREVIATURAS

ABC	: Área bajo la curva
ADN	: Adenosin dinucleótido
AZA	: Azatioprina
BLA	: Matriz acuosa con lactoglobulina bovina
BSA	: Matriz acuosa con seroalbúmina bovina
CsA	: Ciclosporina A
CV	: Coeficiente de variación
EDTA	: Etilen-diamino-tetra-acetato
EMIT	: Enzyme multiplied immunoassay technique
FK 506	: Tacrolimus
G6PDH	: Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GI	: Gastrointestinal
GMP	: Glucosa monofosfato
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IMP	: Inosin monofosfato
IMPDH	: Inosin monofosfato deshidrogenasa
IRC	: Insuficiencia renal crónica
M 0	: Nivel pre-dosis de concentración
M 2	: Acil glucurónido
MMF	: Micofenolato de mofetilo
MPA	: Ácido micofenólico
MPAG	: Ácido micofenólico glucuronizado
NAD	: Nicotinamida dinucleótido
NADH2	: Nicotinamida dinucleótido hidrogenado
NMR	: Resonancia magnética nuclear
T 0	: Toma de muestra basal, tiempo cero
TDM	: Monitoreo de drogas terapéuticas
TR	: Trasplante renal
WBC	: Número de Leucocitos por mm ³

1. INTRODUCCIÓN

El trasplante renal (TR) es reconocido en la última década como la modalidad terapéutica óptima en el paciente pediátrico con insuficiencia renal crónica (IRC)¹ ya que mejora su calidad de vida y hace posible su rehabilitación²⁻⁶. Además, son conocidos los efectos adversos de la falla renal en el desarrollo neurológico y en el crecimiento del niño⁷ los que no se previenen con la diálisis, mientras que un trasplante exitoso genera un estado fisiológico que permite su crecimiento y desarrollo⁸⁻¹³.

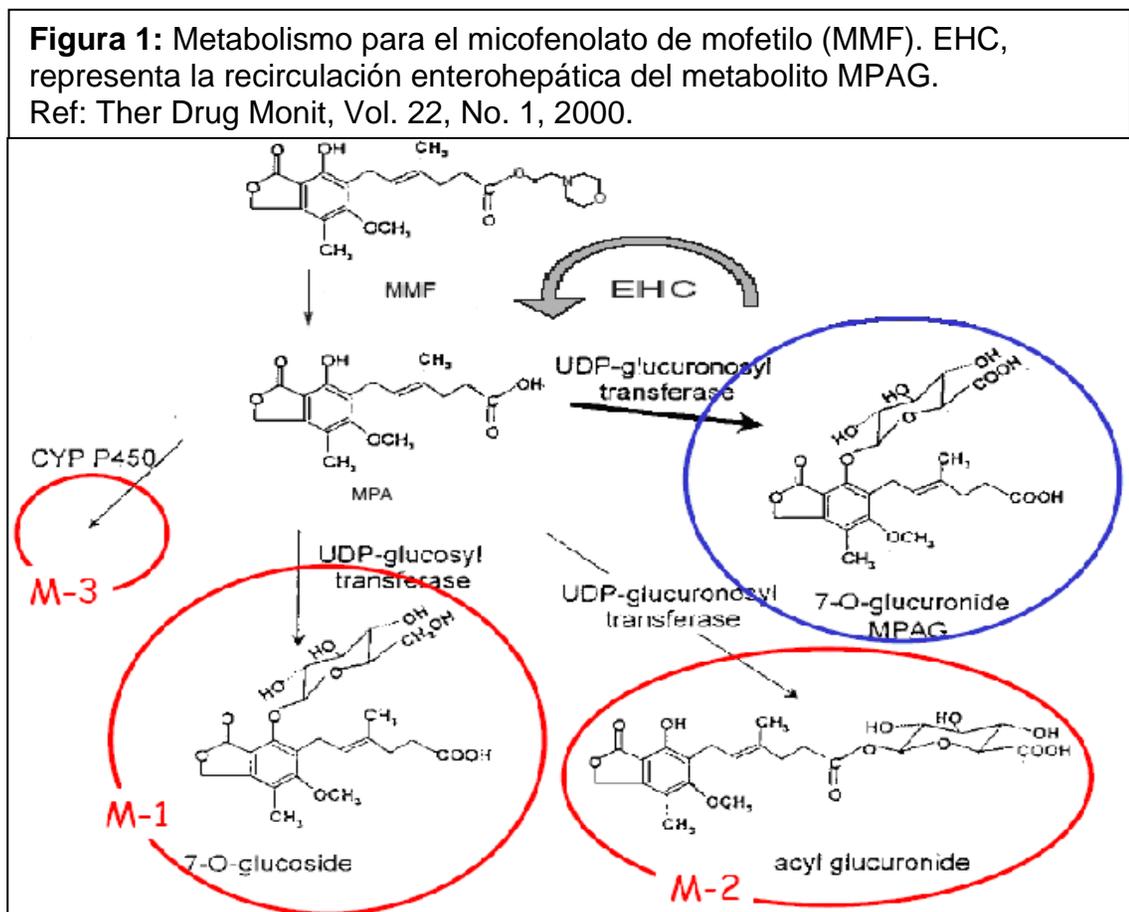
Desde que comenzaron los trasplantes renales en el mundo en la década de los 50, gracias a los avances tecnológicos y de los esquemas de inmunosupresión, ha mejorado significativamente la supervivencia, tanto del paciente como del injerto^{6, 14-17}.

En Chile, el primer trasplante de órganos de donante cadáver realizado fue de riñón y se llevó a cabo en 1967 en el Hospital J.J. Aguirre. La intervención estuvo a cargo de los hermanos Dr. Fernando y Roberto Vargas Delaunoy, ambos Urólogos. También participó el Dr. René Orozco como nefrólogo. La persona trasplantada sobrevivió un año y medio¹⁸.

Para prevenir un posible rechazo, se utilizan los fármacos inmunosupresores como Azatioprina (AZA), Micofenolato de Mofetilo (MMF), Ciclosporina (CsA) y Tacrolimus (FK 506), los cuales disminuyen la respuesta inmune del paciente¹⁹. Característica común de estos fármacos es su estrecho margen terapéutico y su gran variabilidad intra e interindividual²⁰⁻²², de ahí la importancia de la determinación de sus niveles plasmáticos. El esquema de inmunosupresión se modificó progresivamente desde el año 1989. En la primera etapa (1989 a 2000) incluyó CsA, esteroides y AZA²³, mientras que en el segundo período (2001 a 2003) estuvo integrado por CsA o FK 506, esteroides, MMF y anticuerpos anti-CD25²³.

La incidencia de trasplante aumentó cada año (3 a 20 nuevos casos por año) y también se elevó la cantidad de pacientes de escasa edad sometidos a la intervención²³. Sin embargo, es todavía una práctica limitada, principalmente por la escasez de órganos y además por el rechazo que puede destruir el tejido tras el trasplante²⁴.

El MMF (Fig.1) es el 2-morfolinoetiléster del ácido micofenólico (MPA), producto que se forma en especies *Penicillium* spp.^{26,-27}. Fue introducido como parte de la terapia de mantención en el trasplante renal en 1995. Su uso en modelos animales ha demostrado prolongar la supervivencia y se ha ampliado con éxito y eficacia en prevención de rechazo en pacientes que se les ha practicado el trasplante de este órgano, produciendo un gran impacto en la supervivencia tanto del paciente como del injerto a largo plazo²⁸⁻³⁰.



Se desarrolló como un profármaco para mejorar la biodisponibilidad del MPA³¹, su primer metabolito y agente inmunosupresor farmacológicamente activo. Su efecto lo ejerce a través de la inhibición selectiva, reversible y no competitiva de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), enzima importante en la síntesis de novo de nucleótidos de guanina, y concretamente en la conversión IMP a GMP. Como consecuencia se produce una depleción de los depósitos intracelulares de GMP, inhibición de la síntesis de ADN y, por tanto inhibición de la proliferación de linfocitos T y B^{32- 33}. Otras acciones descritas para el MPA son la de inhibir la glicosilación y la expresión de adhesión molecular³⁴.

El MPA es excretado primeramente por el riñón pudiendo acumularse en pacientes con la función renal defectuosa. Los valores de referencia de concentraciones plasmáticas del MPA para el rango terapéutico dependen del tratamiento concomitante; 1.0 - 3.5 ug/mL para la terapia asociada con CsA y 1.7 - 4.0 ug/mL en la terapia concomitante con FK 506 ³⁵.

Después de la administración oral de MMF, se absorbe de forma rápida y completa, hidrolizándose a MPA, generando el primer pico de su nivel plasmático entre los 30 minutos a las 2 horas post dosis que representa su absorción inicial. Se une notablemente a proteínas plasmáticas (97-98%), principalmente a la albúmina³⁶. El MPA es metabolizado por enzimas en hígado, riñones e intestino. Su metabolito mayoritario es el *glucurónido fenólico* o MPAG (Fig.1), que es farmacológicamente inactivo³⁷, está presente en el plasma en concentraciones 50-100 veces superiores a MPA y se excreta por la orina y bilis³⁹, donde es capaz de, gracias a la acción de microorganismos, reconvertirse nuevamente en MPA, que vuelve al plasma vía recirculación entero-hepática el que da como resultado un segundo pico después de 6-12 horas tras la administración oral de MMF³⁹⁻⁴⁰, este da cuenta de hasta un 30-40 % del ABC (Área bajo la Curva de Concentración Plasmática versus tiempo),

siendo una de las mayores responsables de la gran variabilidad farmacocinética inter e intra-paciente^{37, 41}.

Se elimina en un 93% por vía renal y en un 6% en heces³⁸. En adición al MPAG, últimamente se han identificado otros metabolitos ⁴²⁻⁴³ (Fig.1), uno de ellos es el Acil-glucurónido (M2) que es menos abundante que el MPAG, pero farmacológicamente activo. Se ha demostrado reacción cruzada con este metabolito en la técnica inmuno-enzimática de EMIT^{37, 42-43, 46-47}.

Los alimentos no alteran la magnitud de la absorción, reflejada como el ABC. Sin embargo, la presencia de alimentos, reduce la Cmax hasta un 40%⁴⁸.

El MMF, en general es bien tolerado, sin embargo su dosis terapéutica óptima ha sido asociada a una mayor incidencia de efectos adversos gastrointestinales como dolor abdominal, vómitos y diarrea⁴⁴⁻⁴⁵, y hematológicos e infecciosos como la mielosupresión (fundamentalmente anemia y leucopenia)⁴⁹ que a menudo llevan a la reducción de dosis o la suspensión transitoria, situaciones que se han asociado a mayor probabilidad de rechazo⁵⁰⁻⁵¹.

Estudios recientes han mostrado claramente su superioridad en relación a Azatioprina⁵², un antiproliferativo menos específico que el MMF. Además se ha demostrado su efecto en reducir la incidencia de rechazo agudo durante el primer año post-trasplante tanto en población adulta como infantil (40,8% con AZA vs 19,8% con MMF) ⁵³⁻⁵⁶, aunque no se encontraron diferencias en la supervivencia del injerto al año y a los 3 años de evolución⁵⁴⁻⁵⁶. Se ha reportado que en forma independiente a su efecto sobre el rechazo agudo, el MMF mejoraría la sobrevida del injerto en el mediano y largo plazo⁵⁷. Estos resultados, obtenidos al asociarlo con Tacrolimus, han permitido protocolos con suspensión precoz⁵⁸ e incluso sin esteroides⁵⁹, situación de interés especial en la población pediátrica, por la menor incidencia de dislipidemia, hipertensión arterial, menores cambios en la apariencia física y lo más importante en el niño la posibilidad de alcanzar un mayor crecimiento después del retiro de esteroides

^{58- 61}.

Se requiere una individualización de la dosis para obtener resultados clínicos aceptables; sin embargo al igual que otras drogas inmunosupresoras, el monitoreo puede ser difícil debido a la gran variabilidad farmacocinética inter e intra-pacientes, fundamentalmente debido a la variabilidad de la absorción del MMF³⁷ lo que hace sustentable que, al igual que lo ocurrido con Ciclosporina y Tacrolimus, el Monitoreo Terapéutico de Droga (TDM) -que es la medición de un parámetro hecho en un laboratorio y que interpretada apropiadamente, influirá en las decisiones médicas futuras⁶²- sería una herramienta de gran utilidad para optimizar su uso. Existe asociación entre variables farmacocinéticas de MPA como (ABC₀₋₁₂) con la incidencia de rechazo⁶³⁻⁶⁵, como asimismo datos de asociación de la fracción libre de MPA y la proporción de efectos adversos⁶⁶⁻⁶⁸, sin embargo, el número de muestras y el tiempo requerido para obtener el ABC lo hacen impracticable en clínica. Se ha buscado un *punto único* del perfil farmacocinético con correlación farmacológica y clínica para ser usado en el TDM. La determinación pre-dosis ó M0 sería una de las con mejor correlación y aplicación práctica^{64, 70-74}.

El TDM del ácido micofenólico es aún tema de debate⁶³ y a la falta de información proveniente de estudios aleatorios se suma la dificultad técnica en el montaje de una técnica confiable de monitoreo y a la vez factible en la rutina hospitalaria.

En ocasiones pueden existir diferentes métodos de medida, siendo uno de ellos el que mejor determina la magnitud de la variable en estudio. A éste se le conoce como estándar de referencia (*gold standard*) y en principio sería el método a emplear preferentemente. La referencia para medir los niveles plasmáticos de inmunosupresores es la cromatografía líquida de alta resolución o en inglés *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) ⁶⁴⁻⁶⁹, sin embargo, su elevado costo, el mayor tiempo requerido en la obtención de los resultados y su complejidad la hacen ser poco practicable tanto en el ambiente hospitalario como en control ambulatorio.

La técnica automatizada *Enzime Multiplied Immunoassay Technique* (EMIT) ha sido usada para la determinación de niveles de ácido micofenólico, existiendo variados reportes de su excelente correlación con el HPLC ^{68, 75- 81}. Recientemente, Weber⁸¹ en un grupo de pacientes trasplantados renales pediátricos ha mostrado que los valores farmacocinéticos obtenidos por EMIT son comparables a los obtenidos con HPLC, existiendo correlación en ambos casos con variables de interés clínico, sin embargo, no reporta en este estudio con 50 pacientes los resultados de la comparación directa de EMIT contra HPLC.

Siendo que el MMF se empezó a utilizar dentro del esquema inmunosupresor en la terapia del trasplante desde el año 2001, no se medían sus niveles plasmáticos. Por lo tanto el presente trabajo está orientado a montar la técnica por EMIT para cuantificar MPA en plasma, la elaboración de un protocolo de toma de muestra del MPA formulado en el hospital Pediátrico Luis Calvo Mackenna y a su comparación en forma directa, ciega e independiente de los valores de niveles plasmáticos de MPA mediante EMIT y HPLC en un grupo de niños trasplantados renales. Pretendiendo de esta forma, ser una técnica de rutina y una herramienta para el estudio de la determinación, de los niveles plasmáticos de MPA mediante la técnica EMIT, además de ser el primer laboratorio con un resultado confiable desde la toma de muestra.

Dicho estudio se realizará mediante la colaboración de los Servicios de Nefrología y del Laboratorio de Bioquímica-Central de dicho Hospital, y servirá para la generación de información prospectiva que permita conocer, en nuestra población, los valores plasmáticos terapéuticos, evitando el rechazo y los eventos no deseados.

2. OBJETIVO GENERAL

Montar la técnica analítica EMIT, para la determinación de niveles plasmáticos de MPA en pacientes pediátricos trasplantados renales en el Hospital Luís Calvo Mackenna.

2.1. Objetivos específicos

1. Organizar un sistema de toma de muestra para la correcta monitorización del ácido Micofenólico.
2. Implementar como examen de rutina a través de la técnica analítica EMIT, la cuantificación de los niveles plasmáticos de MPA total.
3. Hacer un estudio de correlación de EMIT con respecto a HPLC, para la validación del protocolo de ácido Micofenólico.

3. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Pacientes

Como criterio de inclusión se enroló sólo a los pacientes nuevos sometidos a un 1er trasplante renal y que inicien terapia con anticuerpos anti Receptor de IL-2 (Basiliximab®) como terapia de inducción, con terapia inmunosupresora de mantención con MMF (Cellcept®) con al menos 1 mes de anticipación, luego desde el día 0 post trasplante, dosis inicial 800 mg/m²/d los primeros 30 días, 600 mg/m²/d hasta el tercer mes y desde entonces 450mg/m²/d, la dosis podrá ser modificada en relación a la tolerancia GI y el recuento de linfocitos, e independiente del inmunosupresor acompañante, ya sea con FK 506 o de CsA y del uso de esteroides. El FK-506 y la CsA, se iniciará cuando el valor de creatinina alcance valores \leq 2mg/dl. El protocolo incluye disminución progresiva de esteroides desde el tercer día post trasplante y retiro al séptimo día. Obteniéndose un total de 49 pacientes caucásicos (25 varones, 24 mujeres; rango de edades entre 1 a 17 años de edad), a los que se les denominó pacientes del PROTOCOLO MICOFENOLATO.

El monitoreo de los niveles plasmáticos de MMF se hizo semanalmente durante el primer mes, quincenalmente el segundo mes y de acuerdo a las fechas de controles habituales durante el primer año post trasplante según el protocolo de seguimiento de pacientes trasplantados (Anexo 1). Durante el control correspondiente, se obtuvo una muestra sanguínea de 3 mL tomada 12 horas posteriores a la dosis e inmediatamente antes de la dosis siguiente, con el que se obtendría el nivel pre-dosis de concentración o M0 a determinar y que se estableció en consenso con todo el equipo de salud. Se solicitó consentimiento informado a los padres o cuidadores antes de obtener la muestra y se contó con la Aprobación del Comité de Ética del Hospital. Se registraron variables clínicas (edad, tiempo de trasplante, etiología de la insuficiencia renal, exámenes de laboratorio entre otros).

Las muestras fueron tomadas en forma aséptica por venopunción, colocadas en tubos con EDTA como anticoagulante^{63, 68, 82} y enviadas al laboratorio de Bioquímica con unidades refrigerantes para mantener la temperatura entre 2°C-8°C⁷⁷.

A los pacientes enrolados se les solicitó consentimiento informado de los padres o cuidadores, y asentimiento informado a los pacientes sobre los 12 años de edad, antes de obtener la muestra de sangre (Anexo 2). Se contó con la aprobación del protocolo del estudio por parte del Comité de Ética del Hospital.

3.2 Caracterización de los pacientes.

3.2.1 Caracterización en fichas.

Se realizó un estudio prospectivo, de corte transversal, donde se caracterizó a los pacientes para tener un mejor seguimiento y control del monitoreo de sus niveles plasmáticos de MPA.

Para ello, se ideó una ficha de monitoreo MPA (anexo 3) que se clasificó en tres grupos de pacientes de acuerdo al fármaco inmunosupresor que acompaña al MMF en la terapia y según el tiempo post trasplante. Estas fichas son las siguientes:

- **FICHA MONITOREO MPA. Pacientes nuevos con FK-506 o CsA:** Pacientes tratados con MMF y FK 506 o CsA, con fecha cercana al trasplante (primer mes post trasplante o menor a este tiempo) y que se monitorean los niveles plasmáticos de MPA cada semana el primer mes y quincenalmente el segundo mes (Anexo 1. FECHAS MONITOREO Y NIVELES MPA).

- **FICHA MONITOREO MPA. Pacientes antiguos con FK-506:** Pacientes tratados con MMF y FK 506, con fecha posterior al mes post-trasplante y que se monitorean los niveles plasmáticos de MPA cada un mes (Anexo 1. FECHAS MONITOREO Y NIVELES MPA).
- **FICHA MONITOREO MPA. Pacientes antiguos con CsA:** Pacientes tratados con MMF y CsA, con fecha posterior al mes post-trasplante y que se monitorean los niveles plasmáticos de MPA cada un mes (Anexo 1. FECHAS MONITOREO Y NIVELES MPA).

Además de los niveles plasmáticos de MPA como parte del examen de rutina como se muestra en la figura del Anexo 1, se consultaron las fichas de cada uno de estos pacientes y se registraron los datos en la ficha del grupo correspondiente, donde se recopilaron variables clínicas según el tipo de variable, siendo las siguientes:

- **Variables Cualitativas nominales.** Son aquellas variables en que sus valores no se pueden asociar naturalmente a un número, y además estos valores no se pueden ordenar. Las variables contempladas en este subgrupo son las siguientes:
 - **Causas de Insuficiencia Renal Crónica Terminal.** Principales enfermedades que llevaron a la Insuficiencia Renal Crónica.

➤ **Variables Cuantitativas continuas**. Son aquellas variables en que sus valores son numéricos, sin embargo no son números enteros, es decir, si entre dos valores, es posible encontrar infinitos valores intermedios. En el caso de estas variables se recopiló información que manejaban los médicos. Las variables clínicas correspondientes a este subconjunto son las siguientes:

- **Tiempo post-trasplante**. Tiempo transcurrido desde el trasplante.
- **Edad**. Edad de los pacientes.
- **Dosis**. Dosis de MMF.
- **Niveles plasmáticos de MPA**. Resultados de los niveles de MPA expresados en $\mu\text{g/mL}$, y por cada técnica.
- **Creatinina (mg/dL)**. Siendo las variables tomadas como:
 - **Menor a 2 mg/dL**. El que le indica al médico que el injerto se encuentra en perfecto funcionamiento.
 - **Mayor a 2 mg/dL**. Donde los médicos suponen que el injerto u órgano tiende a producir rechazo.

3.3 Materiales

Los materiales ocupados en este estudio son los equipos que se detallan a continuación:

- Centrífuga Sorvall Legend RT.
- Refrigerador Fensa modelo FNF 7300 (Ficha técnica en Anexo 5) con control de temperatura y conectado al sistema eléctrico de emergencia del hospital
- Equipo EMIT marca VIVA®, compuesto por un rotor para muestras 74 posiciones de muestras (1 blanco, 9 calibradores, 51 muestras , 5 muestras pediátricas, 3 emergencias, 4 controles y 1 para solución de lavado), mecanismo de pipeteo automático de muestras, un rotor de reactivos, un mecanismo de pipeteo automáticos de reactivos, un rotor de reacción (con 48 cubetas de reacción), una unidad de lavado, una impresora, un monitor con teclado y una unidad para diskettes compatible con formato DOS.
- Equipo HPLC marca Elite La Cherom (Merck-Hitachi) compuesto por un detector UV- visible L-2420, bomba L-2130, muestreador automático L-2200, organizador y programa computacional del proveedor según las instrucciones del fabricante, como se describe en el manual del usuario del equipo.
- Tubos tapa lila de 3 mL con EDTA como anticoagulante.
- Buretas.
- Pipetas.
- Guantes de látex.
- Vórtex.

3.4 Metodología

La metodología consistió en ir desarrollando los objetivos específicos los que se detallan a continuación:

3.4.1 Sistema de toma de muestra.

La Q.F. y jefa del laboratorio, Sra. Susana Valdebenito, formuló un Sistema de toma de muestra para la correcta monitorización del Micofenolato (Anexo 4). Para la organización de las condiciones de toma de muestra del MMF, se basó en la revisión bibliográfica y se estableció en consenso con todo el equipo de salud, que comprende al cuerpo Médico, Químico Farmacéutico y Enfermeras. Obteniéndose un sistema de toma de muestra para la monitorización del MMF, el que se muestra en punto 4.

Para los efectos de la toma de muestra, en el laboratorio Central de Bioquímica se formuló una ficha de Requerimientos Técnicos Administrativos del Examen (Anexo 4), la que se formuló en el período que comprendió el desarrollo de la tesis según recopilación bibliográfica. Posteriormente se envió a los distintos servicios del hospital y otros externos al hospital. Ésta especifica los datos técnicos de la muestra que llega al laboratorio, a donde las muestras de sangre se envían inmediatamente después de la toma de muestra con unidades refrigerantes para mantener la temperatura entre 2°C-8°C⁶².

3.4.2 Caracterización de la toma de muestra.

Se formuló una ficha de requerimientos técnicos y administrativos del examen de MPA (Anexo 5), para protocolizar la toma de muestra de los niveles de concentraciones plasmáticas de Ácido Micofenólico (MPA).

3.4.3 Indicación de la toma de muestra.

Toma de muestra basal (t0)

Paciente no debe consumir jugo de pomelo o naranja.

Respetar:

- Volumen de muestra: 3 mL
- Tubo tapa lila con EDTA.
- Respetar la cadena de frío
- Se tabulan y guardan en freezer o se procesan en el momento.

Traer formulario Orden de **SOLICITUD DE MONITOREO NIVEL PLASMÁTICO DE FÁRMACOS** (Anexo 6).

3.4.4 Ejecución de la técnica EMIT.

Se realizaron capacitaciones por parte de Tecnigen S.A., representante en Chile de la firma DADE BEHRING, proveedor del equipo VIVA®.

Posterior a las capacitaciones se puso en marcha el análisis de los niveles plasmáticos de MPA total como un examen de rutina por la técnica analítica EMIT, se realizó en el equipo VIVA®, con reactivos y kit de ensayo para la determinación, control y calibración EMIT® 2000 respectiva del MPA en muestra de plasma.

La medición de los niveles de MPA se hizo siguiendo las especificaciones e instrucciones del fabricante a través de la calibración, mediciones con la prueba EMIT® 2000 para ácido Micofenólico, medición de los controles y mantenciones periódicas.

Una vez que las muestras eran llevadas al laboratorio, se seguían los siguientes pasos:

1. Personal del área de centrifugado es la encargada de recepcionar las muestras de sangre en tubos de tapa lila junto con la orden de solicitud de monitoreo de niveles plasmáticos de fármacos (Anexo 6).
2. Constatada la correcta recepción de la orden con su tubo correspondiente y que no tuviera indicios de coagulación, se centrifugaba la muestra en dos tubos de centrifuga que eran rotulados con los datos de la orden, a modo de separar el plasma.
3. Una vez rotulados los tubos, la auxiliar entregaba la orden de solicitud del Anexo 6 al personal de digitación.
4. El personal de digitación ingresa los datos del paciente al sistema computacional interno, asignándole un número de identificación a la orden que quedaba escrito en la parte superior derecha.
5. Después que la orden cuenta con el N° de identificación, se vuelve a entregar al personal de centrifugación, para que rotule los dos tubos de eppendorf con sobrenadantes de las muestras centrifugadas, uno para la determinación de MPA por EMIT y otra por HPLC.
6. Posteriormente se entregan los tubos con plasma perfectamente rotulados al Químico Farmacéutico de turno de la sección fármacos.
7. El Químico Farmacéutico de turno se encarga de ordenar en forma correlativa las órdenes de los exámenes, y enumera los tubos con el orden ya dado.
8. Luego de darle el orden correspondiente a las solicitudes de niveles de MPA, se guardan las muestras rotuladas en el freezer y las órdenes se archivan en la carpeta asignada para este examen.

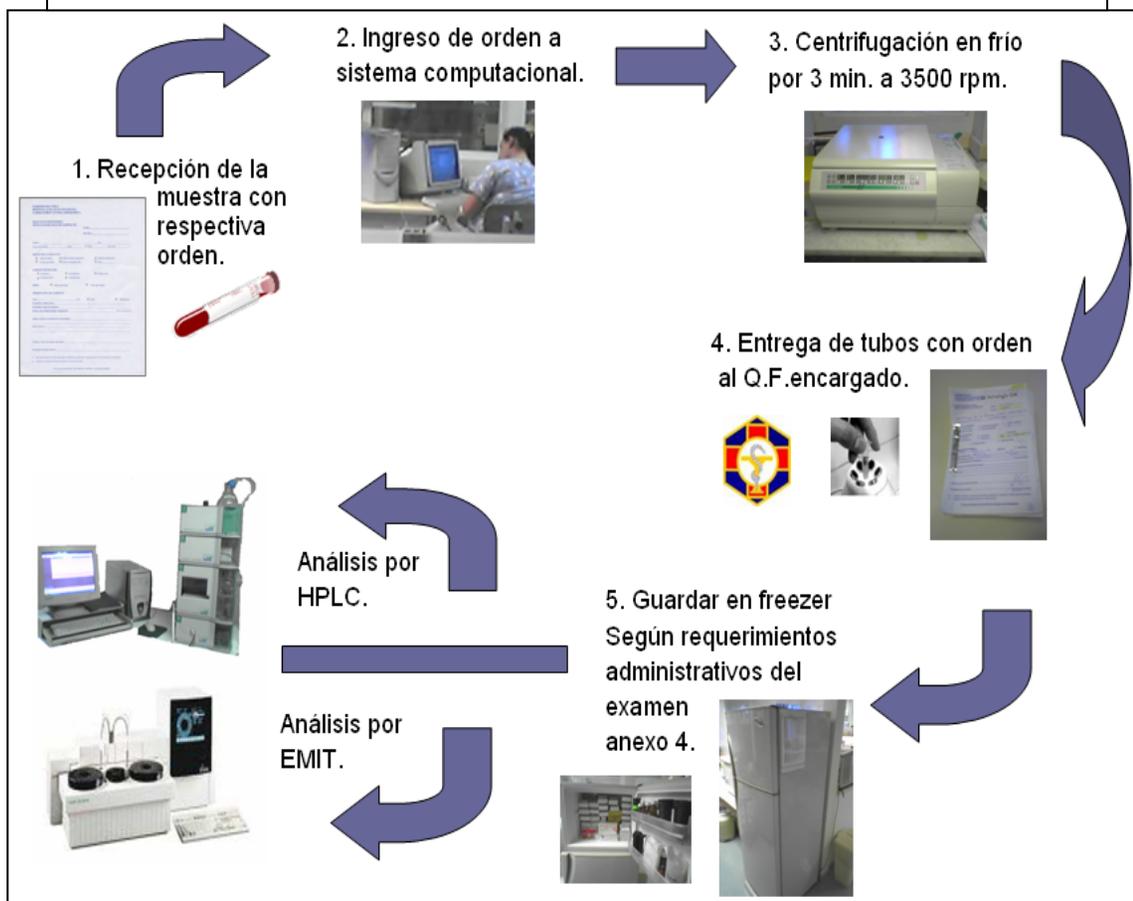
9. Una vez que se crea un pool de muestras en el freezer, las cuales están rotuladas, ordenadas y caracterizadas para el análisis; se centrifugan por 10 minutos y se lleva a cabo la medición de los niveles plasmáticos de MPA expresados con la unidad ug/mL.
10. Registro de resultados en la parte posterior de la orden del examen con lápiz pasta.
11. Se registran los resultados en el sistema interno para cada orden por parte del personal de digitación o también por parte del Químico Farmacéutico que realizó el análisis.
12. Se imprimen los resultados y se constata que estos resultados concuerden con el resultado escrito a mano. En el caso que no fuera así, nuevamente se vuelve a digitar el resultado.
13. Tras confirmar que el resultado se encuentra bien y verificar que el resultado está de acuerdo a los datos contenido en la orden de solicitud de monitoreo de niveles plasmáticos de fármacos, el Químico Farmacéutico firma el resultado impreso.
14. Ya firmado el resultado se archiva nuevamente la orden en la carpeta del MPA, y el resultado se envía al servicio que solicitó el examen.

3.4.5 Estudio de correlación EMIT/HPLC, para la validación del protocolo de MPA.

De un total de 49 pacientes del PROTOCOLO MICOFENOLATO que cumplieron con los criterios de inclusión, se tomó un grupo de 25 pacientes al azar, a los que se le determinó la misma muestra el MPA por las técnicas EMIT y HPLC, según el requerimiento del análisis de concordancia, del principio de Independencia de los valores analizados⁸⁶⁻⁸⁷.

Los pasos a seguir en este estudio se resumen en la Fig. 2.

Fig. 2. Etapas de la obtención de la muestra de plasma para hacer la comparación de las técnicas fueron las mismas que en el punto 3.4.4 del estudio de correlación



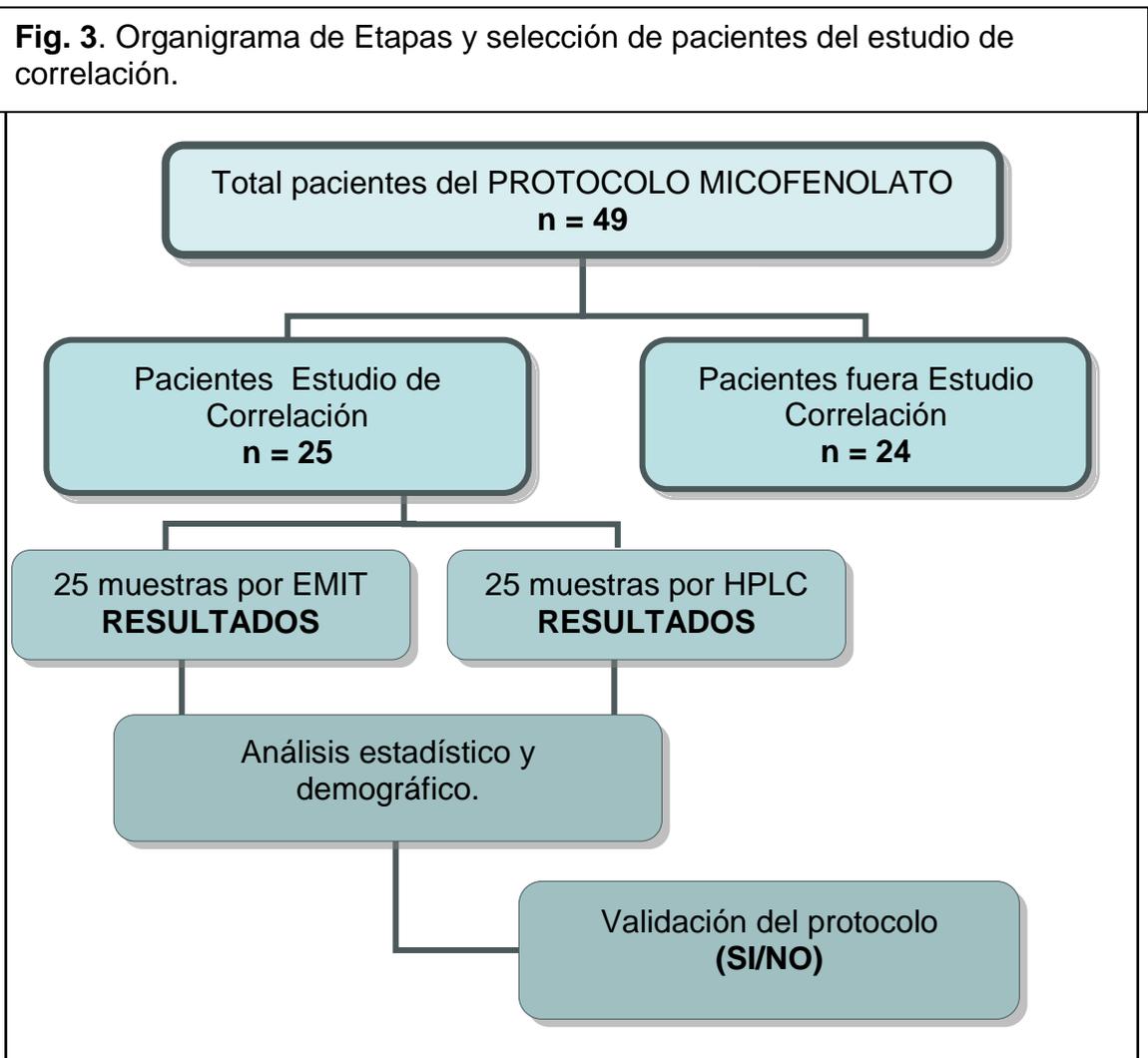
Las muestras para ser analizadas fueron descongeladas a temperatura ambiente, mezcladas en vórtex por 30 segundos, centrifugadas a 1500 rpm por 15 minutos y se utilizó una alícuota para cada técnica, las que por cada técnica se realizaron en días diferentes. En forma paralela y en duplicado de cada muestra se midieron las concentraciones por el método HPLC en el Laboratorio de Farmacocinética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile que es el método de referencia para la medición exacta, y por la técnica EMIT en la sección fármacos del laboratorio de bioquímica del Hospital Luís Calvo Mackenna.

Las fechas de las 25 muestras de este estudio comprendían desde el 25 de Mayo hasta el 14 de Noviembre de 2005, obteniéndose los resultados para posteriormente ser analizados.

Una vez obtenido los resultados de los niveles plasmáticos de MPA de cada paciente, se hicieron análisis demográficos y estadísticos de los 25 pacientes en este estudio. Esto con la ayuda del Dr. Ignacio Salgado, quien también estaba haciendo su tesis en la correlación de las técnicas y era quien disponía de las fichas para obtener los datos de los 25 pacientes.

Para la comparación de los resultados entregados por ambas técnicas se utilizó la gráfica y el *coeficiente de concordancia* de Bland-Altman^{83, 86- 88}. Se consideró significativo un $p < 0.05$ con intervalo de confianza de 95%.

La Fig. 3, que se muestra a continuación esquematiza las distintas etapas de selección de las muestras de los pacientes del PROTOCOLO MICOFENOLATO.



4. MEDICIÓN DE MPA POR EMIT Y HPLC.

4.1 Medición de MPA por ENZIMOINMUNOENSAYO EMIT®2000.

La prueba Emit®2000 (Dade-Behring) para ácido micofenólico utiliza una técnica de inmunoensayo enzimático homogéneo para el análisis del MPA en plasma, ella se realizó en un analizador VIVA® según las instrucciones del fabricante. Esta técnica se basa en la unión competitiva por los sitios de unión de los anticuerpos de MPA presente en la muestra del paciente y el MPA marcado con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) del reactivo 2 enzimático presente en el ensayo. La enzima activa (no unida) convierte el dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado (NAD⁺) del reactivo 1 de anticuerpo/sustrato en NADH₂, lo que produce un cambio en la cinética de absorbancia que se puede medir espectrofotométricamente en el equipo autoanalizador VIVA®. La actividad enzimática disminuye con la unión al anticuerpo, lo que permite medir la concentración de MPA de la muestra en términos de la actividad enzimática. La G6PDH endógena del suero (G6PDH presente en el plasma de los pacientes) no interfiere porque la coenzima NAD⁺ solamente actúa con la enzima bacteriana (*Leuconostoc mesenteroides*) utilizada en la prueba. El método es lineal hasta la concentración de 15 µg/mL y la mínima cantidad detectada es de 0,1 µg/mL.

Con respecto a la manipulación de la muestra, esta no necesita pre-tratamiento para su análisis, solo se necesita descongelar el plasma en el caso que se encuentre congelada se vuelve a centrifugar por 10 minutos.

El volumen mínimo de muestra necesario por el analizador en las cubetas de procesamiento, es de 100 µL de plasma, ya sea de la muestra, de los controles o de los calibradores. De los cuales el autoanalizador introduce 3 µL desde cada cubeta para la reacción enzimática.

Con los calibradores proporcionados por el fabricante (0; 0,5; 2; 5; 10 y 15 µg/mL) se construye una curva de calibración.

Cada vez que se realiza la medición de niveles plasmáticos de MPA se evalúa en conjunto con la medición de controles del kit del ensayo, en donde se controla a través de los parámetros establecidos por el fabricante que es un 20% del valor del control (20% sobre y bajo el valor del respectivo control) y se anota en una carpeta de registro de controles de fármacos para hacer el control inter-día de la técnica (Tabla N°3).

El rango dinámico de la prueba es de 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ basándose en la sensibilidad analítica de la prueba y en el nivel más alto del calibrador.

La sensibilidad de la prueba Emit® 2000 para ácido micofenólico es de 0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Ésta es la concentración más baja de MPA que se puede diferenciar de 0 $\mu\text{L}/\text{mL}$ con una confianza del 95% en plasma humano.

Además se creó una ficha de mantenimiento, solución de problemas y mensajes de error (Anexo 7), en donde se verifica el perfecto funcionamiento del equipo VIVA®.

4.1.1 Preparación de la prueba.

4.1.1.1 Recolección de muestra y manipulación

Se tomaron muestras de sangre pre-dosis, obteniendo niveles M0.

Se tomaron 3 mL de sangre en tubos tapa lila con EDTA como anticoagulante.

Las muestras no deben ser recolectadas durante la administración intravenosa (IV) de CellCept®, ni durante los 10 minutos tras finalizar la administración de este fármaco. Durante este tiempo puede seguir habiendo MMF en la muestra.

La muestra de MPA es estable en el plasma entre 2-8°C durante un máximo de 7 días. Se puede almacenar a -20 °C durante al menos 11 meses^{15, 62}. Las muestras de plasma no deben ser expuestas a más de tres ciclos de congelación (especificaciones dadas en tabla de requerimientos administrativos del examen, Anexo 5).

Todas las muestras se deben manipular como si fueran potencialmente infecciosas.

4.1.1.2 Drogas y reactivos.

El equipo VIVA® cuenta con los siguientes reactivos y kit de ensayo para la determinación, control y calibración respectiva del MPA en muestra de plasma.

A. Prueba Emit® 2000 para ácido micofenólico

a) Anticuerpo/sustrato reactivo 1 (28 mL)

Reactivo anticuerpo monoclonal de ratón frente al ácido micofenólico (MPA)* en una matriz acuosa con seroalbúmina bovina (BSA), glucosa-6-fosfato, dinucleótido de nicotinamida y adenina, agentes preservantes; < 0.1% azida sódica.

b) Reactivo enzima 2 (14 mL)

Ácido micofenólico conjugado con Glucosa-6-fosfato deshidrogenada bacteriano* en una matriz acuosa con lactoglobulina bovina (BLA), agentes preservantes; < 0.1% azida sódica.

B. Calibradores Emit® 2000 de ácido micofenólico (5 x 2 mL)**

0, 0.5, 2, 5, 10, 15 µg/mL de ácido micofenólico (MPA) en una matriz acuosa con seroalbúmina bovina (BSA), agentes preservantes; ≤ 0.1% azida sódica (véase en anexo 8, las concentraciones nominales de MPA).

C. Controles Emit® 2000 de ácido micofenólico* (3 x 2 mL)**

Ácido Micofenólico (MPA) en una matriz acuosa de seroalbúmina bovina (BSA), agentes preservantes; ≤ 0.1% azida sódica (véase en anexo 7, las concentraciones nominales de MPA).

* El título del anticuerpo y la actividad conjugada de la enzima pueden variar de un lote a otro.

** Necesarios para la calibración del kit de prueba Emit® 2000 para ácido micofenólico. Se venden por separado.

*** Disponibles para usarse con el kit de de prueba Emit® 2000 para ácido micofenólico. Se venden por separado.

Los calibradores y los controles Emit® 2000 para ácido micofenólico son preparados en una matriz acuosa con seroalbúmina bovina siguiendo procedimientos gravimétricos estándar. La pureza e identificación química del polvo de MPA que se usa en la preparación de la solución madre se verifica mediante Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y determinación del punto de fusión.

4.2 Medición de MPA por HPLC UV.

La determinación de MPA por HPLC, se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Svensson Jan-Olof⁸⁵, en un equipo HPLC marca Elite La Cherom (Merck-Hitachi) compuesto por un detector UV- visible L-2420, bomba L-2130, muestreador automático L-2200, organizador y programa computacional del proveedor según las instrucciones del fabricante, como se describe en el manual del usuario del equipo.

4.2.1 Preparación de la prueba.

4.2.1.1 Recolección de muestra y manipulación

Se siguieron las mismas indicaciones que en el punto 4.1.1.1.

Las muestras a analizar en el Laboratorio de Farmacocinética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se trasladaron desde el hospital Luis Calvo Mackenna con un intervalo de tiempo de 20 minutos aproximadamente bajo cadena de frío en un contenedor cooler con hielo en su interior para mantener la cadena de frío. Se enumeraron las muestras, luego se separó la droga y se cuantificó en el plasma mediante el método de Jan Olof Svensson y colaboradores⁸⁵, modificado y validado en el Laboratorio de dicho establecimiento. Este método usa estándar externo y consistió en descongelar el plasma con el analito y luego tomar 100 μL de él y depositarlos en un tubo cónico. Posteriormente se adicionó 200 μL de ácido fosfórico 0.1 M disueltos en acetonitrilo, la mezcla se agitó en vórtex durante un minuto y se centrifugó por 5 minutos a 500 rpm. El sobrenadante se vació a otro tubo y de ahí se tomaron 20 μL para inyectarlos al Cromatógrafo para la separación de la droga, en columnas de fase reversa C 18-LichroCART 125-4, Merck, usando una fase móvil formada por una solución de ácido fosfórico 0.04 mM, pH 2.1 y acetonitrilo (70:30). El flujo de la fase móvil se mantuvo a una velocidad de 1,5 mL/min, la presión se mantuvo a 3000 psi y el pico de máxima detección se logra en la región del UV a 215 nm⁸⁵.

4.2.1.2 Drogas y reactivos.

Los reactivos y solventes se obtuvieron de Merck Química Chilena Sociedad Ltda., el ácido micofenólico, sustancia patrón USP, fue proporcionada por Laboratorio de Farmacocinética de la Universidad de Chile, con la cual se prepararon soluciones estándares de 1mg/mL en metanol, las cuales se diluyeron para los ensayos.

Solución precipitante de proteínas: Ácido fosfórico 0.1 M disuelto en acetonitrilo.

Fase móvil formada por un solución de ácido fosfórico 0.04 mM, pH 2.1 y acetonitrilo (70:30).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Cuando se dispone de un método alternativo al método de referencia y más práctico de utilizar, interesa determinar la concordancia entre ambos sistemas.

Si la variable medida es numérica continua y se efectúan dos observaciones por sujeto, generalmente en la literatura clínica existe una cierta tendencia a emplear el coeficiente de correlación lineal (r) como índice entre los dos métodos para evaluar la concordancia entre variables continuas, no siendo éste, en general, un procedimiento correcto, ya que el problema es que el concepto de coeficiente de correlación lineal no es igual que concordancia, ya que por ejemplo, si un aparato para medir una magnitud produce sistemáticamente el triple de otro aparato que supuestamente mide la misma magnitud, ambas mediciones están perfectamente correlacionadas ($r=1$) pero no son concordantes en lo absoluto. Además el coeficiente de correlación depende del rango de valores observados en la muestra, ya que si se incluyen valores extremos el coeficiente de correlación aumenta.

Otro concepto erróneo es el de que si el coeficiente de correlación entre dos medidas es significativamente diferente de cero la fiabilidad es buena. El coeficiente de correlación lineal puede ser muy pequeño y resultar significativamente diferente de cero si el tamaño de la muestra es suficientemente grande.

En el análisis estadístico se utilizaron medidas de resumen como promedios y desviación estándar (ds) para la descripción de variables cuantitativas continuas y categóricas de la población estudiada. Para la comparación de los resultados entregados por ambas técnicas se utilizó la gráfica y el *coeficiente de concordancia* de Bland-Altman^{83, 86-89}. Se consideró significativo un $p < 0.05$ con intervalo de confianza de 95%. Este método consiste en graficar la media entre los resultados por cada técnica para cada muestra versus la diferencia entre estos resultados para la misma muestra.

Se analizaron los resultados de sólo una muestra por paciente dado el requerimiento de ***Independencia*** de los valores analizados⁸⁶⁻⁸⁸. Para el análisis se ocupó el programa STATA 8.0.

En relación al análisis de correlación, si bien se reportará, al igual que en otras publicaciones, es importante recordar que dos variables que tengan correlación no necesariamente tendrán *Concordancia*, es decir valores muy cercanos, cuya diferencia debería ser cercana a cero, situación deseable cuando se comparan 2 técnicas que miden la misma variable. El análisis de *Concordancia* es el correspondiente a esta situación.

6. RESULTADOS.

6.1 Protocolo y fichas:

Se desarrolló un protocolo para la obtención de las muestras para la medición del ácido micofenólico, tras una minuciosa revisión bibliográfica y con reuniones con el cuerpo médico, lo que llevó a la formulación de los sistemas de toma de muestra para la correcta monitorización del micofenolato (Anexo 4).

Se formuló una ficha de los requerimientos administrativos del examen (Anexo 5), el cual se informó a los distintos servicios que necesitaban monitorizar este inmunosupresor.

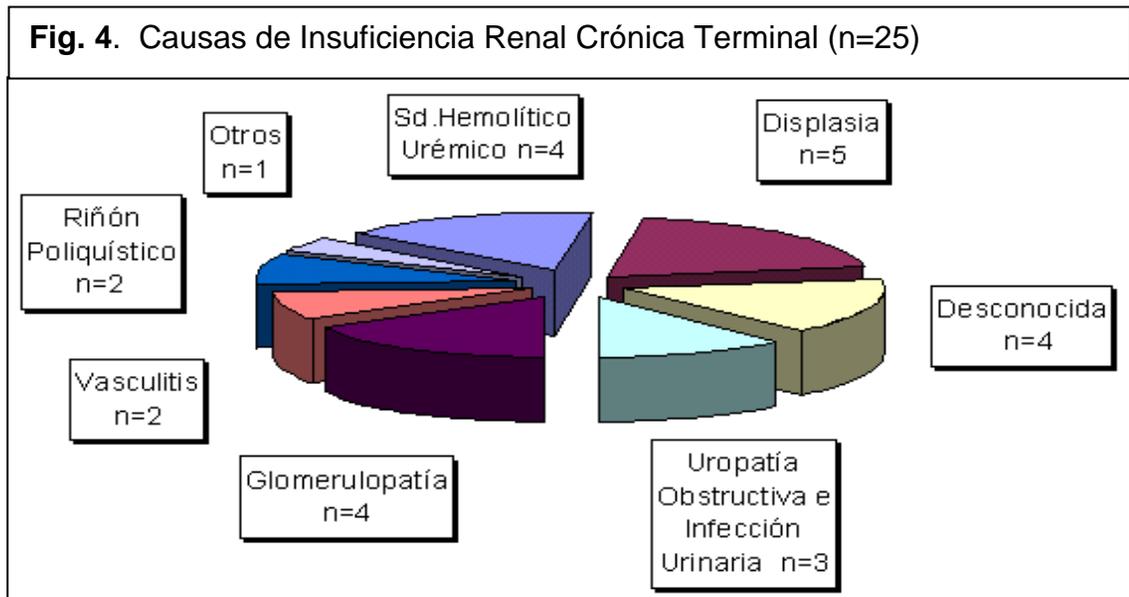
Además se crearon las fichas de mantenimiento, solución de problemas y de mensajes de error (Anexo 7) del equipo VIVA® para mantener en perfecto funcionamiento el instrumento, como las fichas de monitoreo de MPA (Anexo 3), para llevar un mejor control de los pacientes en el estudio de acuerdo a la terapia concomitante y el tiempo transcurrido desde el trasplante.

6.2 Análisis demográfico de estudio de correlación EMIT/HPLC:

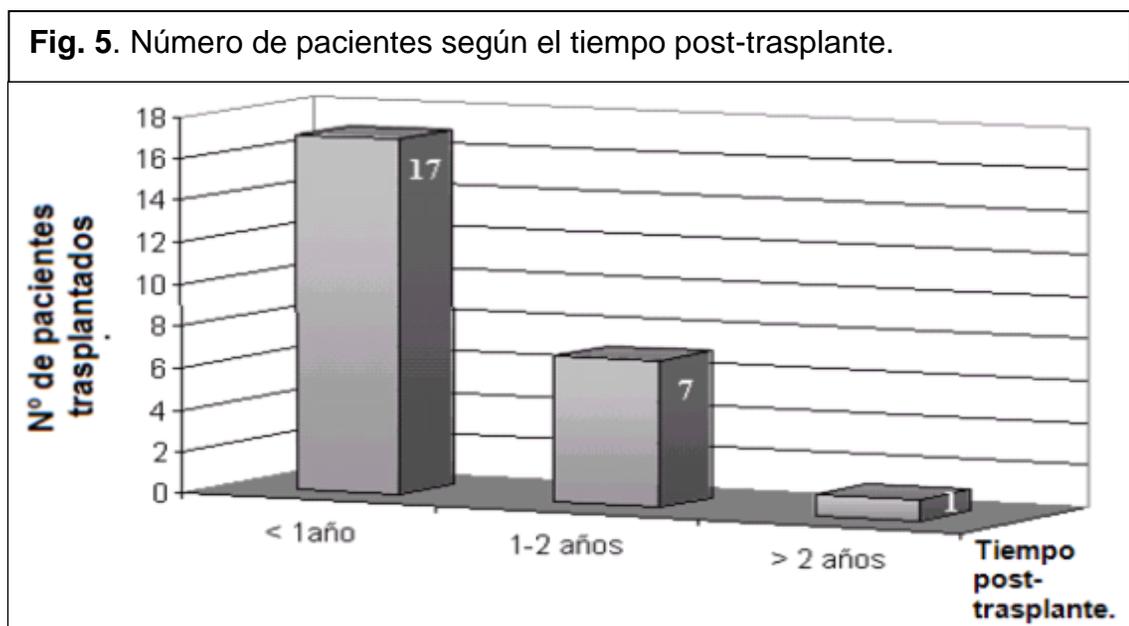
Este análisis se hizo en base a los datos recolectados de las fichas médicas y de las fichas de monitoreo de MPA (Anexo 3), de los 25 pacientes de las muestras involucradas en el estudio de correlación de ambas técnicas.

La terapia inmunosupresora que acompañó al MMF fue FK 506 (Prograf®) en 23 pacientes y CsA (Neoral®) en 2 pacientes. Junto con la terapia inmunosupresora sólo 11 pacientes recibieron esteroides como co-terapia.

Las principales causas de Insuficiencia Renal Crónica que llevaron al trasplante renal se muestran en la Fig.4.



La Fig.5 muestra la cantidad de pacientes según el tiempo post-trasplante, donde se ve que del total de pacientes el 68% del grupo de este estudio, tenía menos de un año post-trasplante. Período en el que se corre mayor riesgo de rechazo al injerto⁹⁰⁻⁹¹.



La edad promedio de los pacientes fue 10,3 años (rango 3,5-17), comprendiendo un total de 14 pacientes mujeres y 11 pacientes varones.

A continuación se muestra la tabla N°1, en la que se utilizaron medidas de resumen como promedios y los rangos tanto de dosis como de los resultados por cada técnica analítica con respecto al tiempo post-trasplante. Estos resultados fueron muy parecidos entre ambas técnicas, además las dosis y los niveles de MPA para los pacientes sobre el año post-trasplante son menores.

Tiempo de post-trasplante	≤ 1 año n=17	>1 año n=8
Dosis promedio MMF mg/m2 (rango de dosis)	573 (323-881)	464 (303-660)
M0 promedio por HPLC µg/ml (rango de resultados)	2,58 (0,4-11,5)	2,35 (0,9-5,3)
M0 promedio por EMIT µg/ml (rango de resultados)	2,72 (0,32-8,76)	2,3 (0,75-6,29)

Tabla N° 1. Dosis de MMF y niveles plasmáticos promedio de acuerdo al tiempo de trasplante.

La creatinina plasmática fue inferior a 1,26 en el 75% del grupo y la depuración de creatinina (Fórmula de Schwartz a continuación) fue superior a 60 ml/min/1,73m² en el 90%, considerando normal un valor cercano o superior a 90 ml/min/1,73 m². Pero en nuestro caso de los 25 pacientes, tienen una función relativamente conservada dado por un clearance mayor de 60 (o sea alterado pero poco) y una creatinina de 1,26 (también alterada pero poco).

$$\text{Fórmula de Schwartz : } \frac{\text{Talla (cm)}}{\text{Creatinina (mg/dL) x factor}}$$

Factor:	Recien nacidos: 0.35
	Lactantes y niños: 0.55
	Adolescente mujer: 0.6
	Adolescente hombre: 0.7

6.3 Análisis Comparativo EMIT-HPLC

6.3.1 Reproducibilidad

Es de desear que el proceso sea fiable: la repetición de las medidas de la misma magnitud producen resultados iguales o al menos similares. Se habla entonces de fiabilidad de las mediciones, estabilidad o concordancia. Una medición es fiable si la variabilidad en mediciones sucesivas se mantiene dentro de cierto margen estipulado, tanto para EMIT como para HPLC y que se detallan a continuación.

6.3.1.1 Reproducibilidad del HPLC:

La recuperación del MPA desde el plasma fue de $97,5 \pm 3,5$; $99,0 \pm 4,1$ y $99,8 \pm 2,3\%$ para las concentraciones 1,0; 4,0 y 10,0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por su parte, el coeficiente de variación promedio intradía e interdía fue de la determinación de la droga de 2,1% entre concentraciones de 0,5 a 10 $\mu\text{g/mL}$. El MPA tuvo un tiempo de retención de 10,3 minutos. Se obtuvo una sensibilidad de 300ng/mL en plasma y una curva de calibración lineal en un rango de 0,5 a 10 $\mu\text{g/mL}$ de MPA ($r=0,998$).

En tanto la reproducibilidad resultó satisfactoria⁷⁵, siendo el coeficiente de variación (CV) promedio intradía e interdía de la determinación del MPA de 2.1% en promedio, tal como se aprecia en la tabla N° 2.

Conc. ($\mu\text{g/mL}$) Sol. Estándares	C.V. (%)
0,5	2,7
1	5,69
2	1,66
4	2,68
6	2,29
8	2,41
10	0,81

Tabla N° 2. Variabilidad intradía e interdíaHPLC.

El Panel de Consenso Internacional indica entre un 5 a un 10 % permitido para la precisión interdía⁶⁸ y el Control Internacional 2005 indica un 13.1% de precisión para las concentraciones bajas (0-3 $\mu\text{g/mL}$) y un 11% para las concentraciones altas (sobre 6 $\mu\text{g/mL}$) de MPA respectivamente⁸⁴.

6.3.1.2 Reproducibilidad del EMIT:

La reproducibilidad de EMIT se midió a través de la determinación de los controles entregados por el fabricante, lo que permitió establecer un coeficiente de variación (CV) promedio interdía de la determinación de la droga (n = 27 muestras de controles) de 7.51%⁷⁵ (4.51%, 9.09% y 8.92% en los niveles bajo, medio y alto respectivamente), como se observa en la Tabla N° 3.

Controles Interdía MPA VIVA®			
	Low (0,8-1,20) 1 ug/mL	Medium (6,0-9,0) 7,5 ug/mL	High (9,6-14,4) 12 ug/mL
Fecha			
25-May-06		7,29	
30-May-06	0,97	6,66	9,96
26-Jun-06	0,96	8,26	
01-Ago-06			13,09
04-Ago-06	1,02		
09-Ago-06		8,21	
11-Ago-06	1,05	7,5	11,5
18-Ago-06	1,07	8,46	13,19
22-Ago-06		8,64	
29-Ago-06		9,03	12,92
05-Sep-06	1,03	7,4	11,56
16-Sep-06	1,08		
28-Sep-06		7,81	
11-Oct-06	0,98		12,55
26-Oct-06			13,11
14-Nov-06			11,66
Promedio	1,02	7,93	12,17
C.V. (%)	4.51	9.09	8.92
ds	0,046	0,721	1,086
n	8	10	9

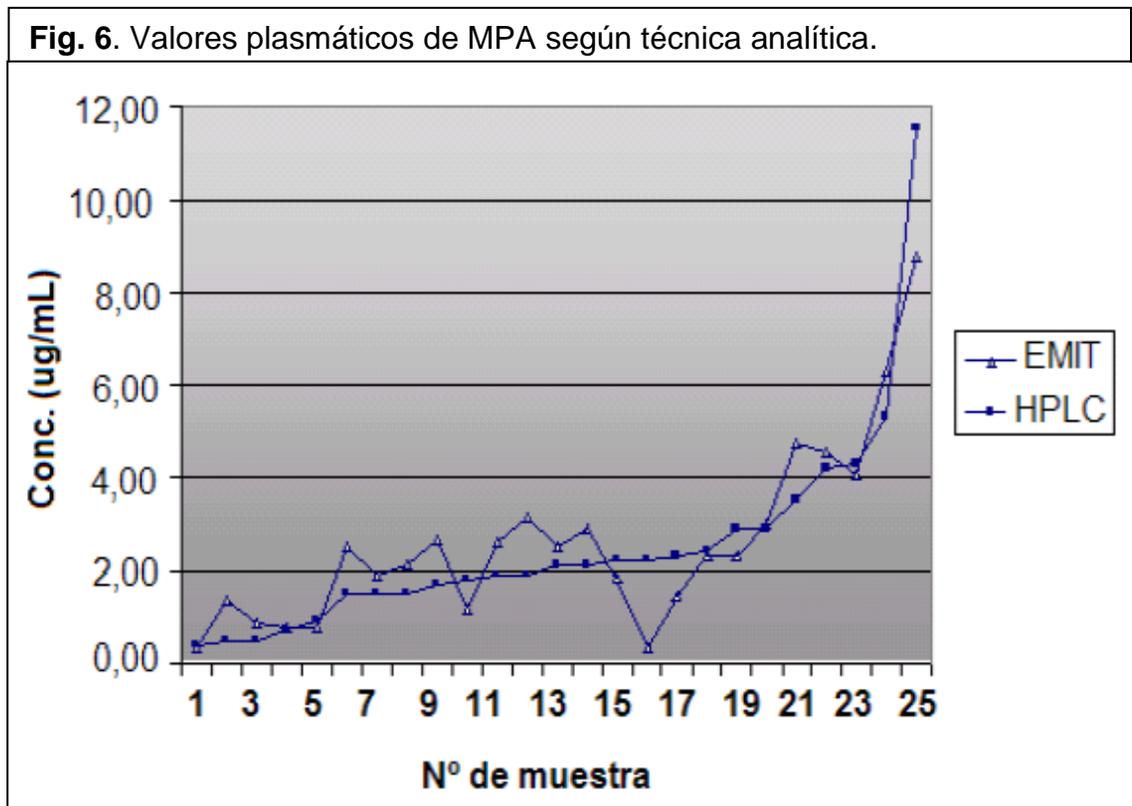
Tabla N° 3. Reproducibilidad inter-día de EMIT.

El CV obtenido es satisfactorio, ya que el Panel de Consenso Internacional indica entre un 5 a un 10 % permitido para la precisión interdía⁶⁸ y el Control Internacional 2005 indica un 7.1% de precisión para las concentraciones bajas (0-3 ug/mL) y un 12.1% para las concentraciones altas (sobre 6 ug/mL) de MPA respectivamente⁸⁴.

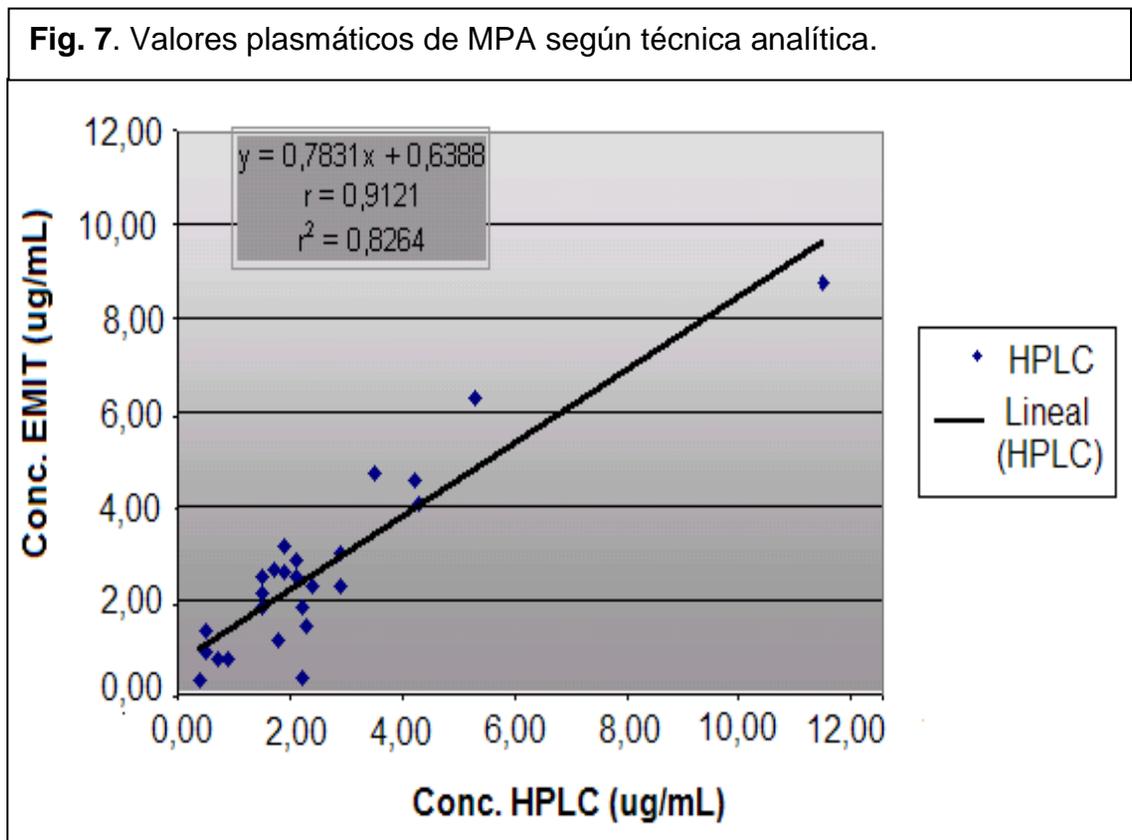
No se midió variación intra-día, reliability o impresión. Sólo se hizo parcialmente al medir variación interdía, por restricciones presupuestarias.

6.3.2 Validez de EMIT

La comparación de los resultados mediante la técnica de EMIT y HPLC se observa en la Figura N°6.



La correlación entre ambas técnicas tiene un coeficiente de correlación lineal (r) de 0,91 y un coeficiente de determinación (r²) de 0,82, que es el que determina el porcentaje de error. (Fig.Nº 7).



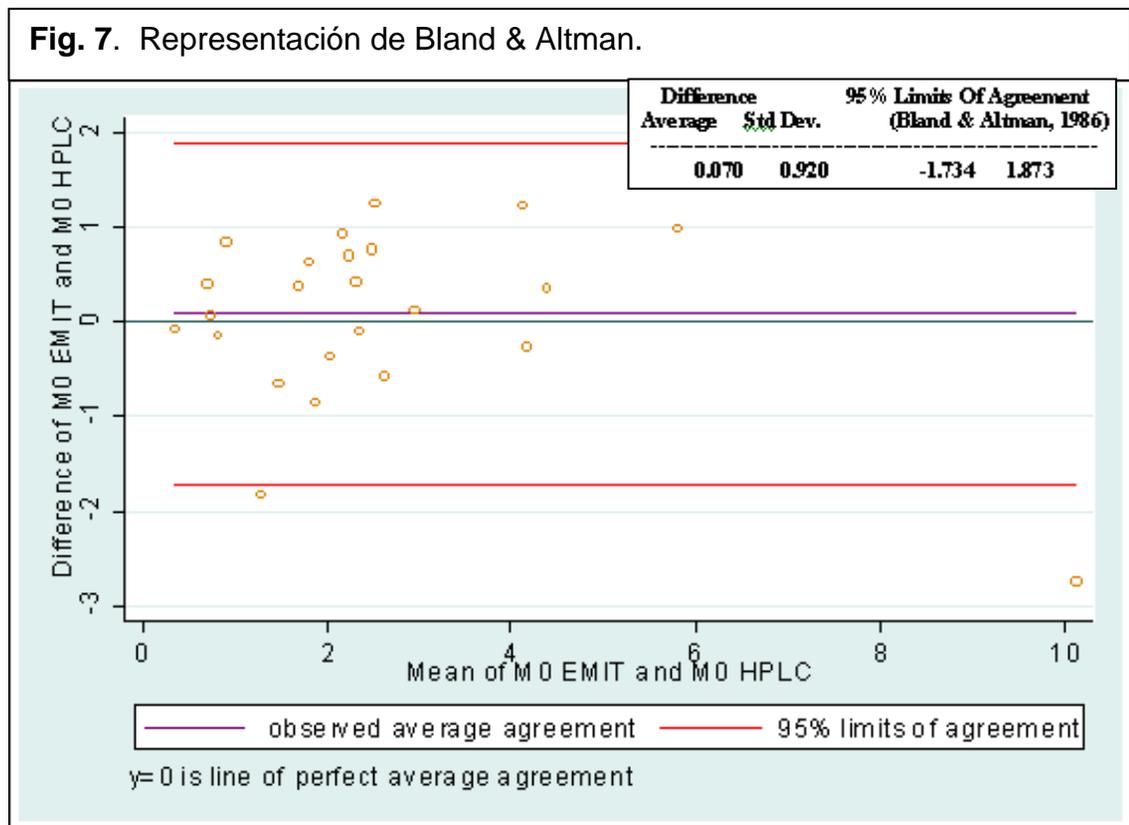
Se analizaron los resultados de sólo una muestra por paciente dado el requerimiento, para el análisis de concordancia, del principio de **Independencia** de los valores analizados ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

El análisis de concordancia se hizo determinando y analizando las diferencias entre ambos métodos (Tabla N°4) utilizando la gráfica y el *coeficiente de concordancia* de Bland & Altman ^(83, 86-89), el que mostró un coeficiente de concordancia de 0,9 con un valor $p < 0,0001$, el que es satisfactorio para la validación de la técnica EMIT.

N° Muestra	N° tubo	Paciente	Resultado (ug/mL)		Diferencia	Media
			HPLC	EMIT		
159720	6	J C L	0,4	0,32	0,08	0,36
150234	5	Y D B	0,5	0,89	-0,39	0,695
156102	9	F A A	0,5	1,33	-0,83	0,915
152362	3	A V V	0,7	0,77	-0,07	0,735
146768	61	J P H	0,9	0,75	0,15	0,825
154941	6	L M	1,5	1,87	-0,37	1,685
184328	12	M L F	1,5	2,5	-1	2
186329	16	N V O	1,5	2,13	-0,63	1,815
149054	36	M B	1,7	2,63	-0,93	2,165
149919	4	C N N	1,8	1,15	0,65	1,475
145556	41	B O B	1,9	2,59	-0,69	2,245
145463	51	M V O	1,9	3,15	-1,25	2,525
145562	48	B V S	2,1	2,52	-0,42	2,31
145597	24	J A D	2,1	2,87	-0,77	2,485
153499	4	J C G	2,2	1,83	0,37	2,015
184326	11	E V P	2,2	0,36	1,84	1,28
145560	47	D V F	2,3	1,43	0,87	1,865
145557	42	Y C R	2,4	2,3	0,1	2,35
154928	3	P E M	2,9	2,32	0,58	2,61
149057	38	N L T	2,9	3,01	-0,11	2,955
186332	18	K T S	3,5	4,72	-1,22	4,11
146762	57	M C R	4,2	4,55	-0,35	4,375
179380	2	W F R	4,3	4,03	0,27	4,165
184903	13	A H E	5,3	6,29	-0,99	5,795
162292	19	F L R	11,5	8,76	2,74	10,13

Tabla N°4, Listado de muestras con los respectivos resultados según técnica analítica aplicada.

Las diferencias entre los valores fueron en promedio de 0,07 µg/ml (95% IC:-0,4; 0,31). La Figura N° 7 muestra los valores dentro del rango de diferencias esperado (-2ds,+2ds).



En la figura N° 7, se aprecia que no existe error sistemático, ya que los puntos se distribuyen de forma aleatoria a uno y a otro lado de la recta correspondiente a la diferencia 0 entre las medidas, es decir, no existe una tendencia hacia los valores positivos o negativos de las diferencias entre ambas metodologías, ya que presenta una Media cercana a cero (homogeneidad de las diferencias). Presenta una pequeña discordancia que tiende a incrementarse a medida que se obtienen valores más elevados de MPA. Además los valores fuera de los límites de la gráfica de Bland & Altman, ya han sido descritos en la literatura y estarían dados por la reacción cruzada con el metabolito activo de MPA, el M2.

7. DISCUSIÓN:

Sin duda que el trasplante de órganos ha sido una de las innovaciones más importantes en la práctica clínica en los últimos 100 años, y en particular en pediatría en el año 1952 cuando se realizó el primer trasplante renal pediátrico en un paciente varón de 16 años de edad, con una excelente evolución hasta el día 21 post trasplante, donde presentó una anuria irreversible falleciendo el paciente a los pocos días después¹. Esto fue la primera indicación respecto a que el principal problema en el futuro sería controlar el rechazo del injerto. Una década después Starlz demuestra la eficacia de la combinación inmunosupresora prednisona-azatioprina, al lograr una sobrevida de 3 años en un paciente trasplantado renal de 12 años de edad.

En la década de los 80, se introducen la CsA y los anticuerpos monoclonales, lo que significó en un cambio radical en las curvas de sobrevida de los trasplantes.

Debido a los buenos resultados que presentan hoy en día los actuales esquemas de inmunosupresión en el rechazo agudo y sobrevida del injerto, es necesario centrar la atención en la evolución a largo plazo de los pacientes, lo que ha generado el interés de crear esquemas terapéuticos nuevos que pretenden disminuir el daño y los efectos no deseados que ellos pueden producir, especialmente en la comunidad pediátrica¹.

En Chile, el esquema de inmunosupresión se modificó progresivamente desde el año 1989, donde contemplaba CsA, esteroides y AZA²³. Ya desde el año 2001, el esquema integraba CsA o FK 506, esteroides, MMF y anticuerpos anti-CD25²³, como terapia inmunosupresora. Con esto la sobrevida del trasplante ha aumentado cada año, al igual que la cantidad de pacientes de escasa edad sometidos a la intervención. Sin embargo, es una práctica limitada debido a que existen variables como la escasez de órganos y el riesgo latente del rechazo del órgano trasplantado²⁴.

El MMF se desarrolló como un profármaco para mejorar la biodisponibilidad del ácido micofenólico (MPA) ³¹, el agente inmunosupresor activo y que actúa como una droga antiproliferativa. Introducida mundialmente en la terapia de mantención en el trasplante renal en 1995, produciendo un gran impacto en la supervivencia tanto del paciente como del injerto a largo plazo²⁸⁻³⁰ y durante el primer año post-trasplante⁵³⁻⁵⁶, y demostrando ser superior, ya sea en los antiguos regímenes de inmunosupresión que contemplaban como antiproliferativo la AZA (40,8% con AZA vs 19,8% con MMF)⁹² como en los nuevos esquemas de inmunosupresión en los que se están disminuyendo o limitando el uso de los corticoides o de los inhibidores de la calcineurina⁵⁸⁻⁶⁰. Sin embargo la gran variabilidad inter e intraindividual^{20-21, 44, 73}, la presencia frecuente de reacciones adversas que obligan a la manipulación de la dosis, aumentando con ello el riesgo de rechazo y la influencia que tienen en la farmacocinética del metabolismo del MMF, así como el tipo de trasplante, la edad, el tiempo transcurrido desde el trasplante, y los fármacos concomitantes que pueden afectar a los niveles plasmáticos de MPA^{62, 68, 93-96}, hacen que esquemas con dosis fijas sean inadecuados en la actualidad, siendo necesario una terapia individualizada, y por ello la necesidad del TDM⁶² como una herramienta de valiosa utilidad para optimizar su uso, a pesar que la determinación de niveles plasmáticos de MPA es un tema controvertido⁶³.

El área bajo la curva se correlaciona muy bien con efecto inmunosupresor y en menor grado con efectos secundarios, pero resulta impracticable dado el alto número de muestras requeridas. Se han ensayado curvas abreviadas que resultan igualmente poco practicables en la clínica y se han buscado puntos de la curva farmacocinética que se relacionen con los efectos terapéuticos y adversos, siendo M0 un punto con aceptable correlación terapéutica y de fácil aplicación en la práctica clínica^{64, 70-74}.

HPLC es la técnica estándar para la determinación de drogas inmunosupresoras^{64- 69}, sin embargo ha sido de difícil aplicación clínica por su alto costo, lo engorroso de su técnica y el tiempo empleado. Nuevos métodos basados en la técnica de inmunoensayo, entre otros EMIT han surgido como una alternativa de menor costo, rápido y sencillo. Tiene además la ventaja de medir el metabolito activo de MPA, y se han publicado trabajos de comparación entre HPLC y EMIT, existiendo varios reportes de su excelente correlación entre éstas^{68, 75-81}.

Este trabajo se efectuó en niños trasplantados renales no seleccionados salvo por la condición de tener un mes post trasplante.

Existen diversos autores y publicaciones, pero Vogl realizando la técnica EMIT, determinó que la muestra es estable si se almacena entre los 4 y -20°C⁷⁷ y al comparar ambas técnicas utilizando los controles provistos por los fabricantes y muestras de 3 pacientes, encontró coeficientes de variación intradía menores al 5% e interdía menores al 10%. Además en 216 muestras obtuvo, de un número no especificado de adultos cardíacos, un coeficiente de correlación de 0.97 y los límites de concordancia fueron 1,16 y -1,7 mg/L. Resultados comparables a los obtenidos en nuestro grupo de niños trasplantados renales ($r = 0,91$ y límites -1,7 y 1,87).

Al comparar dos métodos se deben manejar diversas variables como por ejemplo, las generalidades de las características de ambos:

- 1) Criterios de fiabilidad: especificidad, exactitud, precisión y grado de detección.
- 2) Criterios de puesta en práctica: rapidez, dificultad técnica, seguridad y costo.

Estas características son de por sí necesarias y suficientes. Sólo deben se deben considerar éstas, ya que incluyen implícitamente cualquier otra que se pueda considerar de interés para la realización del análisis.

Dentro de las precauciones a seguir en los estudios de comparación de métodos, se pueden mencionar entre otras:

- a) El estudio se debe planear con anticipación y en forma cuidadosa para poder aplicar adecuadamente las técnicas estadísticas.
- b) Escoger cuidadosamente el método de referencia y, durante la evaluación, éste debe monitorizarse tan estrictamente como el método a probar, asegurando así, que las características de la ejecución estén dentro de los niveles esperados. Para ello deben efectuar estudios de precisión simultáneamente en ambos métodos.
- c) Se debe abastecer de suficiente material de control (en exceso) y de reactivos para efectuar todo el proyecto, sin problemas de no poder efectuar la reproducibilidad inter-día de la prueba y de evitar confundir el efecto de los lotes con el deterioro de los reactivos.
- d) Definir en forma anticipada la concentración de las muestras de pacientes. Para tener claro que ambas técnicas son sensibles a los mismos rangos de medición.
- e) Comprobar en forma regular todos los instrumentos analíticos, por ejemplo, exactitud de la longitud de onda y la linealidad de la absorción.
- f) Respetar la fecha de vencimiento de los reactivos. Descartar las sobras de reactivos, al igual que no hacer mezclas de ellas.
- g) Asegurar que no exista causa de inexactitud debido al orden en que se efectúan y se realizan las mediciones por ambos métodos. Lo ideal es comparar las muestras en forma simultánea por los dos métodos.

Este estudio permitió plantear la necesidad de establecer programas de educación correctivos en forma periódica al equipo de salud, y el aporte a la creación de un Servicio de Farmacocinética Clínica, que proporcione ayuda e información a la comunidad del hospital, con el fin de mejorar la terapia inmunosupresora del paciente (disminución de efectos adversos y evitar un posible rechazo).

8. CONCLUSIÓN

- Se implementó la técnica EMIT para la cuantificación de niveles plasmáticos de ácido micofenólico. Como referencia se compararon los valores con los obtenidos a través de HPLC.
- Tras hacer el estudio de correlación entre ambas metodologías a través del método de Bland & Altman, se observa el error sistemático del método EMIT, representado por el valor promedio de las diferencias es cercano a cero con lo que se infiere que la técnica EMIT es satisfactoria como herramienta clínica para la medición de los niveles de MPA en sangre. Presenta una pequeña discordancia que tiende a incrementarse a medida que se obtienen valores más elevados de MPA.
- Los resultados muestran que existe una concordancia entre los valores obtenidos por ambas técnicas.
- El análisis estricto para la comparación de dos técnicas de laboratorio utilizando la gráfica de Bland & Altman que muestra la concordancia entre ambos valores arrojó un coeficiente de correlación lineal muy cercano a 1 ($r=0,91$) con un valor de p significativo que descarta el azar.
- Los dos resultados extremos encontrados en este estudio confirman la validez de las muestras, ya que es frecuente su hallazgo en condiciones no controladas. La existencia de valores inferiores de EMIT en relación a HPLC, se podría explicar en que ambas técnicas están sujetas a errores en la medición y el resultado de la suma de los errores por ambas técnicas pudiera dar un resultado amplio como se dio en una muestra con valor alto.
- Los valores fuera del rango límite de concordancia, ya han sido descritos en la literatura y estarían dados por la reacción cruzada con el metabolito activo de MPA, el M2.

ANEXO 1
FECHAS MONITOREO Y NIVELES DE MPA.

Protocolo de Seguimiento Pacientes Trasplantados					
Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Semanalmente Perfil bioquímico* ELP-GSV* Hemograma* Niveles MMF y FK o CsA Orina completa + URO* Ag CMV PTH Ca/Creat. Y Proteínas en orina (muestra aislada) Perfil lipídico IC Urología Retiro Pig Taily /o Tenckhoff	Quincenalmente Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV Mag-3 ECO PTH Perfil lipídico	Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV PTH Ca/Creat. Y Proteínas en orina (muestra aislada) Perfil lipídico
Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV PTH Ca/Creat. Y Proteínas en orina (muestra aislada) Perfil lipídico	Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV PTH Ca/Creat. Y Proteínas en orina (muestra aislada) Perfil lipídico
2º año control c/2 meses					
Rutina* Ag CMV	Rutina* Ag CMV ECO MAG-3	Rutina*	Rutina*	Rutina*	Rutina* Ag

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

NIVELES PLASMATICOS DE ACIDO MICOFENÓLICO EN EL TRASPLANTE RENAL PEDIATRICO

Investigadores : Dr. Eugenio Rodríguez, , QF. Susana Valdebenito, Dr. Ignacio Salgado, QF C. Salas , Dra. Ángela Delucchi, Dr .Francisco Cano, Dr. Iván Saavedra, E.U. Marlís Gilbert

Quién suscribe padre/ tutor
de..... paciente portador de
insuficiencia renal crónica terminal, en control en la Unidad de Nefrología del Hospital Luis Calvo Mackenna, con ficha clínica N°....., he sido invitado a participar con mi hijo (a) en un estudio para medir niveles plasmáticos del medicamento Micofenolato (Cellcept®). Este estudio se esta realizando en la Unidad de Nefrología, con el objeto de demostrar la utilidad que tendrá esta medición en el adecuado control al disminuir el rechazo y los efectos no deseados, como diarrea, vómitos o anemia que pueden presentar los pacientes en forma secundaria al uso de esta droga.

Los doctores me han informado que después del trasplante renal al cual será sometido mi hijo(a) se le administrarán medicamentos que se utilizan para evitar el rechazo. Estos medicamentos llamados inmunosupresores incluyen además del Micofenolato, la azatioprina, ciclosporina y FK-506 ó Tacrolimus. Para los dos últimos (FK y Ciclosporina) existe de rutina la medición de niveles plasmáticos de la droga y con estos resultados se ajusta mes a mes la dosis para obtener los mejores resultados de inmunosupresión intentando disminuir al máximo los efectos no deseados de la droga .Para Micofenolato, esta practica No se está realizando de rutina en nuestro país. Si bien la comunidad científica discute todavía la utilidad de esta medición, en otros países como Alemania se está realizando en forma rutinaria. Sobre el tema todavía son escasos los estudios en pediatría.

He sido informado que el Micofenolato es una droga muy útil en el tratamiento de niños trasplantados renales y que desde su uso ha mejorado la posibilidad de no perder el riñón trasplantado, pero que , puede tener efectos no deseados, y sería muy útil

determinar los niveles plasmáticos seguros de esta droga y así conocer la dosis necesaria a dar en cada paciente y esto es lo que pretenden estudiar los doctores, ya que no los conocemos en los niños chilenos.

Este estudio se iniciará en el momento del trasplante, donde mi hijo (a) comenzará a recibir la droga Micofenolato. Una semana más tarde comenzará la toma de muestras de sangre que se realizarán en los mismos días y frecuencia que los controles habituales de un niño trasplantado. La técnica y cantidad de sangre extraída será la misma a la que se utilizaba en los exámenes antes del trasplante, y servirá tanto para los exámenes de rutina del control post trasplante como para este estudio. (No significará una punción adicional)

La incorporación en esta investigación no significará mayor costo y se darán gratuitamente los medicamentos

Los riesgos a los cuales se expone mi hijo son los propios del trasplante renal, incluyendo la aparición de rechazo agudo y las reacciones no deseadas a los diferentes medicamentos que forman parte del tratamiento del niño trasplantado.

Las dudas que tenga podré consultarlas en cualquier momento a los Dres. Eugenio Rodriguez o (Dr). Ignacio Salgado al fono 3401815 o 3401728.

Participaré voluntaria y libremente en el estudio, no recibiendo remuneración alguna y podré retirarme de él en cualquier momento sin que ello perjudique los controles y tratamientos posteriores.

Los resultados podrán ser utilizados en forma anónima por los autores, siendo todos los datos clínicos confidenciales.

_____ Profesional informante	_____ Cédula de identidad	_____ Firma
_____ Padre o tutor	_____ Cédula de identidad	_____ Firma
_____ Testigo	_____ Cédula de identidad	_____ Firma

Fecha:

ASENTIMIENTO PARA EL PACIENTE MAYOR DE 12 AÑOS

NIVELES PLASMATICOS DE ACIDO MICOFENÓLICO EN EL TRASPLANTE RENAL PEDIATRICO

Investigadores : Dr. Eugenio Rodríguez, QF. Susana Valdebenito, Dr .Ignacio Salgado, QF C. Salas, Dra. Angela Delucchi, Dr .Francisco Cano, Dr. Iván Saavedra, E.U. Marlis Gilbert

He sido invitado a participar en un estudio para medir niveles plasmáticos del medicamento Micofenolato (Cellcept®). Este estudio se esta realizando en la Unidad de Nefrología, con el objeto de demostrar la utilidad que tendrá en el adecuado control, disminuyendo el rechazo, y efectos no deseados, como diarrea, vómitos o anemia que pueden presentar algunos pacientes en forma secundaria al uso de esta droga.

Los doctores me han informado que después del trasplante renal al cual seré sometido me administraran medicamentos que se utilizan para evitar el rechazo. Estos medicamentos llamados inmunosupresores incluyen además del Micofenolato, azatioprina, ciclosporina y FK-506 ó Tacrolimus. Para los dos últimos (FK y Ciclosporina) existe de rutina la medición de niveles plasmáticos de la droga y con estos resultados se ajusta mes a mes la dosis para obtener los mejores resultados de inmunosupresión intentando disminuir al máximo los efectos no deseados de la droga .Para el Micofenolato, esta practica No se está realizando de rutina en nuestro país. Si bien la comunidad científica discute todavía la utilidad de esta medición, en otros países como Alemania ya se está realizando en forma rutinaria. Sobre el tema todavía son escasos los estudios en pediatría.

He sido informado que el Micofenolato es una droga muy útil en el tratamiento de niños trasplantados renales y que desde su uso ha mejorado la posibilidad de no perder el riñón trasplantado, pero que , puede tener efectos no deseados, y sería muy útil determinar los niveles plasmáticos seguros de esta droga y así conocer la dosis necesaria a dar en cada paciente y esto es lo que pretenden estudiar los doctores, ya que no los conocemos en los niños chilenos.

Este estudio se iniciará en el momento del trasplante, donde comenzaré a recibir la droga Micofenolato, una semana mas tarde , se iniciará la toma de muestras de sangre que se realizarán los mismos días y frecuencia que los controles habituales de un niño

trasplantado. La técnica y cantidad de sangre extraída será la misma a la que se utilizaba en los exámenes antes del trasplante, y servirá tanto para los exámenes de rutina del control post trasplante como para este estudio. (No significará una punción adicional)

La incorporación en esta investigación no significará mayor costo para mis padres y se me darán gratuitamente los medicamentos

Los riesgos a los cuales me expongo son los propios del trasplante renal, incluyendo la aparición de rechazo agudo y las reacciones no deseadas a los diferentes medicamentos que forman parte del tratamiento del niño trasplantado.

Las dudas que tenga podré consultarlas en cualquier momento a los Dres. Eugenio Rodriguez o Ignacio Salgado al fono 3401815 o 3401728.

Participare voluntaria y libremente en el estudio, no recibiendo remuneración alguna y podré retirarme del estudio en cualquier momento sin que ello perjudique los controles y tratamientos posteriores.

Los resultados podrán ser utilizados en forma anónima por los autores, siendo todos los datos clínicos confidenciales.

Profesional informante Cédula de identidad Firma

Paciente Cédula de identidad Firma

Testigo Cédula de identidad Firma

Fecha:

**ANEXO 3
FICHA MONITOREO MPA.**

FICHA MONITOREO MPA																
Pacientes nuevos con FK-506 o CsA																
Paciente : J A D		Fecha Nacimiento : 05 / 11 / 1997				Inicio Tratamiento : 22 / 04 / 2005										
Fecha : 12/7/90		PESO (kg)		Motivo solicitud		Fármaco Nº tubo		DOSIS		Última dosis		Toma de muestra		Resultados		
Fecha	DEP VTO	Creatinina	CMV	WBC (mil/mm3)	TALLA (cm)	Motivo de dosis	Fármaco Nº tubo	MMF	FK-506	Día	Hora	Día	Hora	MPA (ug/mL)	TAC (ng/mL)	TIEMPO Post-TX
18-07-05	N	1,33	S/E	5,3	17,2	Ajuste de dosis Control periódico	MMF 145559	250 mg c/12 hrs		24-7-05	20:45	25-7-05	8:45	1,84		3m
25-07-05		1,2		5,7	106		FK-506									
01-09-05	N	1,36	01-09-2005 (-)	9,7	16,5	Ajuste de dosis Control periódico	MMF 156879	250 mg c/12 hrs		30-8-05	20:45	31-8-05	8:45	1,96		4m
26-09-05	N	1,61			107	Control periódico	MMF 166091	250 mg c/12 hrs		25-9-05	20:45	26-9-05	8:45	1,05		5m
27-09-05			27-09-2005 (-)		107		FK-506									
24-10-05	N	1,36	24-10-2005 (-)	9,3	17	Control periódico	MMF 2E+06	250 mg c/12 hrs		23-10-05	20:45	24-10-05	8:45	3,10		6m
					107		FK-506									
	N						MMF									
							FK-506									
	N						MMF									
							FK-506									
	N						MMF									
							FK-506									
							MMF									
							FK-506									

OBSERVACIONES :

ANEXO 4
SISTEMA DE TOMA DE MUESTRA PARA LA CORRECTA
MONITORIZACIÓN DEL MICOFENOLATO.

1. Recepción de la muestra de sangre con la orden de micofenolato proveniente de un servicio del hospital (muestra fresca) por parte de la sección de centrifugado del laboratorio.
2. Ingreso de orden de niveles plasmáticos de MPA a sistema Allsys para enumerar la orden.
3. Centrifugación en tubos de centrifuga (eppendorf) en centrifuga Sorvall Legend RT por 3 minutos a 3500 rpm.
4. Separar el suero en tubos de eppendorf, rotulándolos con el nombre del paciente y N° de identificación Allsys.
5. Entrega al Químico Farmacéutico encargado en ese momento para darle un orden correlativo que se llevará para el análisis posterior.
6. Guardar, congelando la muestra por su mejor estabilidad.
7. Una vez que se crea un pool de muestras las cuales están rotuladas, ordenadas y caracterizadas para el análisis; se lleva a cabo la medición de los niveles plasmáticos de MPA expresados con la unidad ug/mL y cuyos valores de referencia están entre 1 y 4 ug/mL (1,0-3,5 ug/mL co-tratamiento con Ciclosporina; 1,7-4,0 ug/mL co-tratamiento con Tacrolimus)
8. Registro de resultados en la parte posterior de la orden del examen, para luego ser registrada en el sistema allsys e impresas.
9. Revisión del correcto llenado de la orden respuesta.
10. Firma del resultado por parte del Químico Farmacéutico.

ANEXO 5

REQUERIMIENTOS TECNICOS ADMINISTRATIVOS DEL EXAMEN

LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA HOSPITAL LUIS CALVO MACKENNA Jul-05	
REQUERIMIENTOS TECNICOS ADMINISTRATIVOS DEL EXAMEN	
Nombre del Examen:	NIVELES PLASMATICOS DE ACIDO MICOFENOLICO
Laboratorio:	CENTRAL BIOQUIMICA
Tipo de Examen:	INMUNOANALISIS
Método Utilizado:	ENZIME MULTIPLIED IMMUNOASSAY TECHNIQUE (EMIT)
Sección :	FARMACOS
Muestra:	TOMAR 3 ml DE SANGRE EN TUBO TAPA LILA CON EDTA RESPECTAR LA MARCA QUE TRAE EL TUBO
Estabilidad de la muestra:	7 DIAS ENTRE 2 Y 8 °C (MUESTRA DE SANGRE); HASTA 11 MESES -20°C (MUESTRA PLASMA) NO EXPONER A MAS DE 3 CICLOS DE CONGELACION
Valores de referencia:	LAS CONCENTRACIONES DEPENDEN DEL TRATAMIENTO COMOCOMITANTE CON CICLOSPORINA O TACROLIMUS 1, 0-3, 5 ng/mL (co-tratamiento con ciclosporina); 1, 7-4, 0ng/mL (co-tratamiento con tacrolimus) (1)
Preparación de paciente:	CUALQUIERA SEA LA VIA DE ADMINISTRACION ES NECESARIO DEJAR TRANSCURRIR 5 VIDAS MEDIAS (6 DIAS) DESDE EL COMIENZO DE LA ADMINISTRACION COM EL FIN DE PERMITIR QUE EL NIVEL SANGUINEO ESTE CERCAO A LA CONCENTRACION EN ESTADO DE EQUILIBRIO (2) SE ACOSTUMBRA A TOMAR LA MUESTRA JUSTO ANTES DE LA PROXIMA DOSIS EN LA MAÑANA.
Observaciones con respecto al Método :	RANGO DE DETECCION:0,1-15 ug/ml SENSIBILIDAD ANALITICA 0,1 ug/ml ESPECIFICIDAD: NO PRESENTA REACCION CRUZADA COM EL PRINCIPAL METABOLITO GLUCURONIZADO, TAMPOCO COM SUSTANCIAS ENDOGENAS (3). INTERACCION DE METODOS :NO COM CICLOSPORINA Y TACROLIMUS.
Recepción de muestras :	DE LUNES A DOMINGO HASTA LAS 20,00 hrs en caso de enviar muestras sabado y domingo avisar via telefonica al 3401708Tecnologo de turno
Dias de Procesamiento:	TRES VECES A LA SEMANA (DIA LUNES MIERCOLES Y JUEVES)
Plazo de Entrega de resultado:	MARTES Y VIERNES DE CADA SEMANA DESPUES DE LAS 10.00HRS fax con resultados se envian lunes miercoles y jueves a las 16 horas ,en caso de algun problema se avisara oportunamente via fax
Requisito especial:	LA ORDEN DE EXAMEN DEBE VENIR TIMBRADA POR RECAUDACION COMO EXAMEN PARTICULAR (4) LAS CONDICIONES PARA UNA CORRECTA UTILIZACION DE LOS NIVELES ES QUE EN EL INFORME QUEDEN CONSIGNADOS LOS DATOS DE :DOSIS-FORMA FARMACEUTICA-INTERVALO DE ADMINISTRACION- DURACION TRATAMIENTO-HORA DOSIS-HORA TOMA DE MUESTRA-PESO-EDAD-TALLA PAC.
REF:	(1) Shaw LM, Korecha M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KL. Mycophenolic Acid Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Provide A Basis for Rational Monitoring Strategies. Am J Transplant 2003; 3: 534-42. (2) Farmacocinetica, vol 9, 1998, Pag. 68-70 Serie Cientifica Basica (3) Schutz E, Shpikova M, Armstrong VW, Wieland E, Oelrich M. Identification of a pharmacologically active metabolite of mycophenolic acid in plasma of transplant recipients treated with mycophenolate mofetil. Clin Chem. 1999; 45(3):419-22. (4) Rev. Médica Chile 1991; 119: 1284-1290
Costo del examen	\$30.000 (Para todo paciente privado, libre elección o institución que lo requiera)

ANEXO 6
ORDEN SOLICITUD MONITOREO NIVEL PLASMÁTICO DE FÁRMACOS.

GOBIERNO DE CHILE
HOSPITAL LUIS CALVO MACKENNA
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUÍMICA

SOLICITUD MONITOREO
NIVEL PLASMÁTICO DE FARMACOS

Fecha: _____

Servicio: _____

Nombre: _____ Rut: _____

Fecha Nacimiento: ____ / ____ / ____ Peso: _____ N° Ficha: _____ Previsión _____

MOTIVO DE LA SOLICITUD

- Ajuste de dosis Posible fracaso terapéutico Posible intoxicación
 Control periódico Posible incumplimiento Otro _____

FARMACO SOLICITADO

- Amikacina Ciclosporina Metotrexato
 Tacrolimus (Fk) Vancomicina

NIVEL Basal (pre dosis) Peak (post dosis)

INFORMACION DEL FARMACO

Dosis: _____ Vía Oral Endovenosa

Fecha/Hora última dosis: _____ / _____

Fecha/Hora toma de muestra: _____ / _____

Fecha y hora inicio/término tratamiento: _____ / _____ (Solo metotrexato)

Indicar cambios en tratamiento farmacológico: _____

Observaciones: _____

Nombre y firma de médico solicitante: _____

Encargado toma de muestra: _____

- Recoger la muestra en tubos tapa negra (amikacina, metotrexato y vancomicina) y lila (ciclosporina y tacrolimus)
- Respetar el volumen de llenado indicado en el exterior del tubo.

El correcto llenado de esta solicitud contribuye al éxito terapéutico

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Cano F, Rosati M, Pinto S, et al. Trasplante Renal en Pediatría: una Década de Experiencia Multicéntrica. *Rev. Chil. Pediatr.*, Nov. 2001; 72(6): 504-15.
2. Fine R, Tejani A. Renal Transplantation in Children. *Nephron* 1987; 47: 81.
3. Browndridge G, Fielding D. Psychosocial Adjustment to End-Stage Renal Failure: Comparing Haemodialysis, Continous Ambulatory Peritoneal Dialysis and Transplantation. *Pediatr Nephrol* 1991; 5: 612-6.
4. Morel P, Almond PS, Matas AJ, et al. Long-term Quality of Life After Kidney Transplantation in Childhood. *Transplantation* 1991; 52: 47-53.
5. Potter DE, Najarian J, Belzer F, Holliday MA, Horns G, Salvatierra O. Long Term Results of Renal Transplantation in Children. *Kidney Int* 1991; 40: 752-6.
6. Potter DE. Long-Term Outcome of Kidney Transplantation in Children. En: Tejani AH, Fine RN, editores. *Pediatric Renal Transplantation*, 1 ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1994: 525-533.
7. French JH, Rapin I, Martinez WC. Neurologic Complications of Renal Failure and Their Treatment. En: Edelmann CM Jr, editor. *Pediatric Kidney Disease*. 2nd ed. 1992: 695-723.
8. Cohn RA. Premptive transplantation. En: Tejani AH, Fine RN, editores. *Pediatric Renal Transplantation*. 1th ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1994: 87-93.
9. Fine RN, Ettenger R. Renal Transplantation in Children. En: Morris PJ editor. *Kidney Transplantation*. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994: 412-459.
10. Najarian JS, Almond PS, Mauer M, et al. Renal Transplantation in the First Year of Life: The Treatment of Choice for Infants with End-Stage Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2 (Suppl): 228.
11. Najarian JS, Almond PS, Gilligham KJ, et al. Renal Transplantation in the First Five Years of Life. *Kidney Int* 1993; 44 (Suppl. 43): 40-4.
12. Tejani A, Sullivan K. Long-term Follow-Up of Growth in Children Post-Transplantation. *Kidney Int* 1993; 44 (Suppl 43): 56-58.

13. Wolff G. Pretransplantation and Posttransplantation Psychosocial Evaluation En: Tejani AH, Fine RN, editores. Pediatric Renal Transplantation. 1 ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1994: 109-135.
14. Broyer M, Ehrich J, Jones E, Selwood N. Five Year Survival of Kidney Transplantation in Children: Data from the European (EDTA-ERA) Registry. *Kidney Int* 1993; 44 (Suppl 43): 22-5.
15. Waradley BA, Hébert D, Sullivan EK, Alexander SR, Tejani A. Renal Transplantation, Chronic Dialysis, and Chronic Renal Insufficiency in Children and Adolescents. The 1995 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol* 1997; 11: 49-64.
16. Benfield MR, McDonald R, Sullivan EK, Stablein DM, Tejani A. The 1997 Annual Renal Transplantation in Children Report of North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Pediatr Transplant* 1999; 3: 152-67.
17. Arbus GS, Hébert D. Impact of Recipient Age on Renal Allograft Outcome. En: Tejani AH, Fine RN, editores. Pediatric Renal Transplantation. 1th ed. New York: Wiley-Liss, Inc. 1994: 165-185.
18. Sitio web de la Corporación del Trasplante en Chile [en línea] < <http://www.trasplante.cl/historia/index.html> > [consulta: 25 julio 2006]
19. ENCICLOPEDIA SOBRE Antineoplásicos, inmunosupresores y fármacos utilizados en los cuidados paliativos [en línea] <<http://mednet3.who.int/EMLib/wmf/Spanish/pdf/Sec8-04.pdf>> [consulta: 06 abril 2005]
20. Weber LT, Shipkova M, Lamersdorf T et al. Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid (MPA) and Determinants of MPA Free Fraction in Pediatric and Adult Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1511-20.
21. Oellerich M, Shipkova M, Schütz E et al. Pharmacokinetic and Metabolic Investigations of Mycophenolic Acid in Pediatric Patients After Renal Transplantation: Implications for Therapeutic Drug Monitoring. *Ther Drug Monit.* 2000; 22(1): 20-6.

22. Denys A, Allain F, Masy E, Dessaint JP, Spik G. Enhancing the Effect of Secreted Cyclophilin B on Immunosuppressive Activity of Cyclosporine. *Transplant* 1998; 65/8: 1076-84.
23. Delucchi A, Ferrario M, Varela M, et al. Pediatric Renal Transplantation: A Single Center Experience Over 17 Years. *Pediatr Transplant* 2006; 10(2): 193-7.
24. ENCICLOPEDIA SOBRE Bienestar y medicina [en línea] <<http://www.saludhoy.com/htm/exam/articulo/trasren1.html>> [consulta: 06 abril 2005]
25. Ihara H, Shinkuma D, Ichikawa Y, Nojima M, Nagano S, Ikoma F. Intra- and Interindividual Variation in the Pharmacokinetics of Tacrolimus (FK506) in Kidney Transplant recipients Importance of trough Level as a practical Indicator. *Int J Urol* 1995; 2(3): 151-5.
26. Gosio B. Ricerche batteriologiche e chimiche sulle alterazioni dei Mais Riv. D'Igiene Sanita Pub Ann 1896; 7: 825.
27. Florey HW, Gilliver K, Jennings MA & Sanders AC. Mycophenolic Acid, an Antibiotic from *Penicillium Brevi Compactum*. *Lancet* 1946; 1: 46-9.
28. European Mycophenolate Mofetil Cooperative Study Group: Placebo control study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporine and corticosteroids for prevention of acute rejection. *Lancet* 1995; 345:1321.
29. Benfield MR, Stablein D, Tejani A. Trends in immunosuppressive therapy: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS). *Pediatr Transplant* 1999; 3:27– 32.
30. Takahashi K, Ochiai T, Uchida K et al. Pilot Study of Mycophenolate Mofetil (RS 61443) in the Prevention of Acute Rejection Following Renal Transplantation in Japanese Patients. *Transplant Proc* 1995; 27: 1421-4.
31. Wu J. Mycophenolate Mofetil: Molecular Mechanisms of Action. *Perspect Drug Discovery Design*. 1994; 2: 185-204.
32. Hallora PF. Molecular Mechanism of Immunosuppressive Drugs and Their Importance in Optimal Clinical Outcomes. Available at: <<http://www.medscape.com/Medscape/transplantation/treatmentUpdate/2000/tu01/public/toc-tu01.html>> [consulta: 8 junio 2005]

33. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH. Immunosuppressive Strategies in Transplantation. *Lancet* 1999; 353: 1083-91.
34. 20° Congresso Nazionale della Società Italiana di Nefrologia Pediatrica: 14 al 16 de octubre de 2004. 2004. Napoli, Villa Pignatelli, Museo Diego Aragona Pignatelli Cortes.
35. Shaw LM, Korecka M, Venkataramanan R, Goldberg L, Bloom R, Brayman KL. "Mycophenolic Acid Pharmacodynamics and Pharmacokinetics Provide a Basis for Rational Monitoring strategies". *American Journal of Transplantation* 2003; 3; 534-42.
36. Nowak I, Shaw LM. Mycophenolic Acid Binding to Human FERUM Albumin: Characterization and Relation to Pharmacodynamics. *Clin Chem.* 1995; 41/7: 1011-7.
37. Bullingham R, Monroe S, Nicholls A & Hale M. Pharmacokinetics and Bioavailability of Mycophenolate Mofetil in Healthy Subjects After Single-dose Oral and Intravenous Administration. *J Clin Pharmacol* 1996; 36: 315-24.
38. INTRODUCTION DANS BIAM [en línea] <<http://www.biam2.org/www/Sub5131.html>> [consulta : 25 mayo 2005]
39. Bullingham R, Nicholls AJ, Hale M. Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil (RS 61443): A Short review. *Transplant Proc.* 1996; 28: 925-9.
40. Bullingham R, Nicholls AJ, Kamm B. Clinical Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998; 34(6): 429-55.
41. Shaw L, Nawrocki A, Korecka M. Using established immunosuppressant therapy effectively. Lessons from the measurement of mycophenolic acid plasma concentrations. *Ther Drug Monit* 2004; 26(4): 347-51.
42. Schütz E, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid: Comparison of HPLC and Immunoassay Reveals New MPA Metabolites. *Transplant Proc.* 1998; 30: 1185-7.
43. Shipkova M, Armstrong VW, Wieland E, Niedmann PD, Schütz E, Brenner-Weiss G, Voihsel M, Braun F, Oellerich M. Identification of Glucoside and Carboxyl-linked Glucuronide Conjugates of Mycophenolic Acid in Plasma of Transplant Recipients Treated with Mycophenolate Mofetil. *Br J pharmacol.* 1999; 126(5): 1075-82.

44. AUSTEN, K. F. 2001. Therapeutic Immunology. 2^a ed. USA, Blackwell Publishing. pp. 58-59.
45. Behrend M. Adverse Gastrointestinal Effects of Mycophenolate Mofetil: Aetiology, Incidence and Management. Drug Saf. 2001; 24: 645.
46. Schutz E, Shipkova M, Armstrong VW, et al. Identification of a Pharmacologically Active Metabolite of Mycophenolic Acid in Plasma of Transplant Recipients Treated with Mycophenolate Mofetil. Clin Chem. 1999; 45(3): 419–22.
47. Shipkova M, Schutz E, Armstrong VW, et al. Determination of the acyl glucuronide metabolite of mycophenolic acid in human plasma by HPLC and Emit. Clin Chem. 2000; 46: 365–72.
48. Hale MD, et al. The pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for mycophenolate mofetil in renal transplantation. Clin Pharmacol Ther 1998; 64: 672– 83.
49. Filler G., Foster R., Berard R., et als. Age – Dependency of mycophenolate mofetil dosing in combination with Tacrolimus after pediatric renal transplantation. Transplant Proc. 2004 Jun; 36(5): 1327-31.
50. Pelletier RP, Akin B, Henry ML et al. The Impact of Mycophenolate Mofetil Dosing Patterns on Clinical Outcome After Renal Transplantation. Clin Transplant 2003; 17: 200.
51. Knoll GA, MacDonald I, Khan A, van Walraven C. Mycophenolate mofetil dose reduction and the risk of acute rejection after renal transplantation. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2381.
52. Ettenger R, Menster B., Warshaw B et al: Micophenolate Mofetil (MMF) in pediatric (ped) renal transplantation (TX): Final report of the pediatric MMF study group (PMMFSG). 16 th Annual Meeting American Society of Transplant Physicians, May 10-14, 1997, Chicago, Ill Abstract 287.
53. Mele TS, Halloran PF. The use of mycophenolate mofetil in transplant recipients. Immunopharmacology 2000; 47:215– 45.
54. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplant Group: A Blinded, Randomised Clinical trial of Mycophenolate Mofetil for the Prevention of Acute Rejection in Cadaveric Renal Transplantation. Transplantation 1996; 61(7): 1029-37.

55. US Renal Mycophenolate Mofetil Study Group. Mycophenolate Mofetil in Cadaveric Renal Transplantation. *Am J Kid Dis.* 1999; 34: 293-303.
56. European Mycophenolate Study Group. Mycophenolate Mofetil in Renal Transplantation: 3 Years result from placebo-Controlled Trial. *Transplantation* 1999; 68: 391-6.
57. Ferraris JR, Ghezzi LFR, Vallejo G, Piantanida JJ, Araujo JL, Sojo ET. Improved long-term allograft function in pediatric renal transplantation with micophenolate mofetil *Pediatr Transplantation* 2005; 9: 178-82.
58. Tonshoff B, Hocker B, Weber L. Steroid withdrawal in pediatric and adult renal transplant recipients. *Pediatric Nephrol* 2005; 20: 409-17.
59. Vidhun J, Sarwal M. Corticosteroids avoidance in pediatric renal transplantation *Pediatric Nephrol* 2005; 20: 418-26.
60. Valenzuela M, Delucchi A, Ferrario M, Lillo AM, Guerrero JL, Rodríguez E, Cano F, Cavada G, Godoy J, Rodríguez J, Contreras L. Early Steroid Withdrawal Immunosuppression in Pediatric Renal Transplantation *Transpl Procc* 2005. (por publicar)
61. Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, et al. Drug-related Dyslipidemia After Renal Transplantation. *Am J Health Syst Pharm.* 2004; 61: 565-585.
62. Jacqz-Aigrain E, Khan Shanghaghi. E., Baudouin V, et als: Pharmacokinetics and tolerance of mycophenolate mofetil in renal transplant children. *Pediatr. Nephrol.* 2000; 14(2): 95-9.
63. Shaw LM, Holt DW, Oellerich M, et al. Current Issues in Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid: Report of a Roundtable Discussion. *Ther Drug Monit.* 2001; 23: 305–15.
64. Weber LT, Shipkova M, Armstrong VW, et al. The Pharmacokinetic Pharmacodynamic Relationship for Total and Free Mycophenolic Acid in Pediatric Renal Transplant Recipients: A Report of the German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 759–68.
65. Van Gelder T, et al. A Randomized Double-blind, Multicenter Plasma Concentration Controlled Study of the Safety and Efficacy of Oral Mycophenolate Mofetil for the Prevention of Acute Rejection After Kidney Transplantation. *Transplantation.* 1999; 68: 261– 6.

66. Fulton B and Markham A. Mycophenolate Mofetil: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy in Renal Transplantation. *Drugs* 1996; 51 (2): 278-98.
67. Shipkova M. Overestimation of Mycophenolic Acid by EMIT Correlates with MPA Metabolite. *Transplant Proc.* 1999; 31: 1135– 7.
68. Shaw LM, Nicholls A, Hale M, Armstrong VW, Oellerich M, Yatscoff R, et al. Therapeutic monitoring of mycophenolic acid. A consensus panel report. *Clin Biochem* 1998; 31(5): 317– 22.
69. Mourad M, Malaise J, Chaib Eddour D, et al. Pharmacokinetic basis for the efficient and safe use of low-dose mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus in kidney transplantation. *Clin Chem.* 2001; 47: 1241–8.
70. Hubner GI, Eismann R, Sziegoleit W. Relationship between Mycophenolate mofetil side effects and mycophenolic acid plasma trough levels in renal transplant patients. *Arzneimittelforschung.* 2000; 50:936–40
71. Van Besouw NM, van der Mast BJ, Smak Gregoor PJ, et al. Effect of mycophenolate mofetil on erythropoiesis in stable renal transplant patients is correlated with mycophenolic acid trough levels. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14: 2710–3.
72. Oellerich M, Shipkova M, Schutz E, et al. Pharmacokinetic and metabolic investigations of mycophenolic acid in pediatric patients after renal transplantation: implications for therapeutic drug monitoring. German Study Group on Mycophenolate Mofetil Therapy in Pediatric Renal Transplant Recipients. *Ther Drug Monit.* 2000; 22: 20–6.
73. Borrows R, Chusney G. Determinants of mycophenolic acid levels after renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2005; 27(4): 442-50.
74. Kuypers DR. Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. *Transpl Int.* 2005; 18(2): 140-50.
75. Beal JL. Evaluation of an immunoassay (EMIT) for mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatography assay. *Ther Drug Monit.* 1998 Dec; 20(6): 685-90.
76. Yeung JS. Determination of mycophenolic acid level: comparison of high-performance liquid chromatography with homogeneous enzyme-immunoassay. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31(1-2): 1214-5.

77. Vogl M, Wiegel G, et al. Evaluation of the EMIT Mycophenolic Acid Assay from Dade Behring. *Ther Drug Monit.* 1999 Dec; 21(6): 638-43.
78. Hosotsubo H. Analytic validation of the enzyme multiplied immunoassay technique for the determination of mycophenolic acid in plasma from renal transplant recipients compared with a high-performance liquid chromatographic assay. *Ther Drug Monit.* 2001 Dec; 23(6): 669-74.
79. Premaud A. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a commercial enzyme-multiplied immunoassay for the determination of plasma MPA in renal transplant recipients and consequences for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit.* 2004 Dec; 26(6): 609-19.
80. Schütz E, Armstrong VW, Andrevia M, Niedmann PD, Oellerich M. Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid (MPA): Comparison of HPLC and Immunoassay Reveals New MPA Metabolites. *Transplant Proc.* 1998; 30: 1185-7.
81. Weber LT, Mehls O. Comparison of the Emit immunoassay with HPLC for therapeutic drug monitoring of mycophenolic acid in pediatric renal-transplant recipients on mycophenolate mofetil therapy. *Clin Chem.* 2002; 48(3): 517-25.
82. Shaw LM, Sollinger HW, Halloran P, et al. Mycophenolate Mofetil: A Report of Concensus Panel. *Ther Drug Monit.* 1995; 17: 690-9.
83. Bland JM, Altman DJ. Regresión Análisis. *The Lancet* 1986 April 19;1(8486):908-9.
84. Holt DW. Mycophenolate International Proficiency Testing Scheme. <<http://www.bioanalytics.co.uk>> [consulta: 20 enero 2006]
85. Svensson Jan-Olof, Brattström C and Säwe J. A Simple HPLC Method for Simultaneous Determination of Mycophenolic Acid and Mycophenolic Acid Glucuronide in Plasma. *Ther Drug Monit.* 1999; 21(3): 322-4.
86. Bland JM, Altman DG. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies *Statistical* 1983; 32: 307-17.
87. Bland JM, Altman DG. Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement. *The lancet* 1986 February8; 1(8476): 307-10.

88. Dewitte K, Fierens D. Application of the Bland-Altman plot for Interpretation of Method-Comparison Studies: A Critical Investigation of its Practice. Clin Chem. 2002; 48(5): 799-801.
89. Bland JM, Altman DG. Comparing Methods of Measurement: Why Plotting Difference Against Standard Method is Misleading. Lancet 1995 October 21; 346(8982):1085-7.
90. Fraxeda R, et al. Centelleografía Renal Dinámica en el Trasplante Renal. Alasbimn Journal 6(22): October 2003. Article N° AJ22-15.
91. Sánchez A, Prats D. Evaluación del Donante Renal. Servicio de Publicaciones, UCM, Madrid 1999: 7; 159-79.
92. Sollinger HV. Transplantation. 1995; 60: 225-32.
93. Shaw LM, Korecka M, Aradhye S, et al. Analysis of Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in African American and Caucasian Renal Transplant Recipient. Transplantation. 1998; 66(8): S5.
94. Zanker B, Sohr B, Eder M, Frohmann E, Land W. Comparison of MPA Trough Levels in Patients with Severe Diabetes Mellitus and from Non-Diabetics After Transplantation. Transplant Proc. 1999; 31: 1167.
95. Morgera S, Budde K, Lampe D, Ahnert V, Fritsche L, Kuchinke S, Neumayer H-H. Mycophenolate Mofetil Pharmacokinetics in Renal Transplant Recipient on Peritoneal Dialysis. Transpl Int. 1998; 11: 53-7.
96. Wollenberg K, Krumme B, Pisarski P, Schollmeyer P, Kirste G. Pharmacokinetics of Mycophenolic Acid in the Early Period After Kidney Transplantation. Transplant Proc. 1998; 30: 4090-1.