

R 29.091

C/182

Dpto. Farmacología, Podología y Radiología
Facultad de Medicina

7-XII-98

ANTONIO HEVIA ALONSO
DIRECTOR DPTO.

T.D.
C/182

**INFLUENCIA DE LAS LIPOPROTEÍNAS
EN LA FRACCIÓN PLASMÁTICA LIBRE
DE LA CICLOSPORINA A.**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR
FRANCISCO CALLEJÓN LINARES



14 331
10 NOV. 1998

Francisco Callejón Linares

DIRECTORES :

DR. D. JOSÉ ANTONIO DURÁN QUINTANA
DR. D. JOSÉ ANTONIO ABADÍN DELGADO

José A. Durán Quintana

José A. Abadín Delgado

UNIVERSIDAD DE SEVILLA. FACULTAD DE MEDICINA

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 1

I.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN DE LA CICLOSPORINA 4

I.1.1. ESTRUCTURA DE LA CsA 4

I.1.1.a. Estructura primaria. 4

I.1.1.b. Estructura secundaria. 5

I.1.1.c. Estructuras terciaria y cuaternaria. 6

I.1.2. ESTRUCTURA DE CONGÉNERES NATURALES 7

I.1.3. ESTRUCTURA DE LOS METABOLITOS DE LA CsA 7

I.2. MECANISMO DE ACCIÓN 10

I.2.1. A NIVEL GENERAL 10

I.2.1.a. Inmunología del rechazo. 10

I.2.1.b. Formas de acción de la CsA. 11

I.2.1.c. Tolerancia a largo plazo de los injertos. 13

I.2.2. A NIVEL CELULAR 14

I.2.2.a. Unión de la CsA a los lugares de acción. 14

I.2.3. A NIVEL BIOQUÍMICO 18

I.2.3.a. Unión ciclofilina - ciclosporina e inmunosupresión. 19

I.3 FARMACOCINÉTICA 20

I.3.1. ABSORCIÓN ORAL.....20

I.3.1.a. Influencia de los alimentos.....21

I.3.1.b. Efecto de las enfermedades hepáticas.....21

I.3.1.c. Efectos de las enfermedades gastrointestinales.....22

I.3.1.d. Influencia del tiempo postrasplante.....23

I.3.2. ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR.....23

I.3.3. ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.....23

I.3.4. DISTRIBUCIÓN.....24

I.3.4.a. Distribución tisular.....25

I.3.4.b. Distribución sanguínea.....26

I.3.5. BIOTRANSFORMACIÓN.....35

I.3.5.a. Farmacocinética de los metabolitos.....35

I.3.5.b. Proceso de biotransformación.....36

I.3.5.c. Factores que influyen en el aclaramiento hepático.....37

I.3.6. ELIMINACION.....39

I.3.7. LA CsA NEORAL.....40

I.4. MONITORIZACIÓN TERAPEUTICA..... 42

I.4.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....44

<i>I.4.1.a. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i>	44
<i>I.4.1.b. Radioinmunoanálisis (RIA)</i>	50
<i>I.4.1.c. Inmunoanálisis de polarización fluorescente (FPIA)</i>	59
<i>I.4.1.d. Inmunoanálisis enzimático múltiple (EMIT)</i>	61
I.4.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.....	62
I.4.3. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS METABOLITOS.....	63
I.4.4. MONITORIZACIÓN DE LA CsA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.....	65
<i>I.4.4.a. Parámetros farmacocinéticos</i>	65
<i>I.4.4.b. Parámetros farmacodinámicos</i>	68
I.4.5. INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS.....	72
<i>I.4.5.a. Fármacos que alteran los niveles sanguíneos de CsA</i>	72
<i>I.4.5.b. Fármacos que aumentan la nefrotoxicidad</i>	74
<i>I.4.5.c. Otras interacciones</i>	75
I.4.6. UNIFICACIÓN DE CRITERIOS.....	75
I.5. GRAFICOS Y TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN.....	76
II. PLANTEAMIENTO.....	85
III. MATERIAL Y MÉTODO.....	89

III.1. MATERIAL..... 90

III.1.1. MUESTRAS.....90

III.1.2. REACTIVOS.....90

III.1.2.a. Buffer para la diálisis.....90

III.1.2.b. Solución de CsA.....90

III.1.2.c. Reactivo para medición de la CsA.....91

III.1.2.d. Reactivos de bioquímica.....91

III.1.3. CÁMARA DE DIÁLISIS.....91

III.1.3.a. Descripción de la cámara.....92

III.1.3.b. Membrana semipermeable.....92

III.1.4. OTROS MATERIALES.....93

III.2. MÉTODOS..... 94

III.2.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....94

III.2.2. ESTUDIO BIOQUÍMICO.....94

III.2.3. COMPROBACIÓN ESTANQUEIDAD DE LA CÁMARA.....95

III.2.4. PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA SEMIPERMEABLE.....95

III.2.5. REALIZACIÓN DE LA DIÁLISIS DE EQUILIBRIO.....96

III.2.6. MEDICIÓN DE LA CsA TOTAL.....96

III.2.7. MEDICIÓN DE LA CsA LIBRE.....97

III.2.7.a. Obtención de la muestra donde efectuar la medición.....	97
III.2.7.b. Determinación de la concentración de CsA en la muestra.....	98
III.2.7.c. Fiabilidad de los cálculos.....	99
III.2.8. CÁLCULO DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA LIBRE Y UNIDA.....	100
III.2.8.a. Cálculo de la fracción de volumen desplazado.....	100
III.2.8.b. Cálculo del cambio en la razón de proteínas.....	101
III.2.8.c. Corrección de FU y FL (FUc, FLc).....	101
III.2.9. VARIABLES DEL ESTUDIO.....	102
III.2.9.a. Farmacológicas.....	102
III.2.9.b. Bioquímicas.....	102
III.2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	102
III.2.11. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.....	102
IV. RESULTADOS.....	104
IV.3.1. ESTANQUEIDAD DE LAS CÁMARAS DE DIÁLISIS.....	105
IV.3.2. VALIDEZ DEL MÉTODO UTILIZADO PARA EL CÁLCULO DE LA CSA LIBRE.	105
IV.3.3. DIÁLISIS DE EQUILIBRIO.....	105
IV.3.4. FL DE CsA.....	106
IV.3.5. RESULTADOS DE BIOQUÍMICA.....	106

IV.3.6. DE LOS ESTUDIOS DE CORRELACIÓN.....	107
IV.3.7. TABLAS Y FIGURAS DE LOS RESULTADOS.....	108
V. DISCUSIÓN.....	125
VI. CONCLUSIONES.....	135
VII. BIBLIOGRAFIA.....	137

I. INTRODUCCIÓN

La ciclosporina A (CsA) es una molécula obtenida de hongos pertenecientes a la especie *Tolyposcladium Inflatum Gams*, previamente conocida como *Trichoderma polysporum*, que fueron encontrados en muestras de tierras recogidas en los fiordos de Noruega ^{1,2}. En la actualidad tanto la CsA como sus análogos son obtenidos de forma sintética ³.

Los primeros estudios sobre sus efectos biológicos pusieron de manifiesto su capacidad para inhibir la proliferación de las células del sistema inmune responsable del reconocimiento celular, o células de resistencia específica (SR), en especial los linfocitos T⁺. Sin embargo no produce prácticamente inhibición en la proliferación de células responsables de la resistencia no específica (NSR); tanto, que su índice de inhibición ISI (concentración de medicamento para inhibir la NSR / concentración de medicamento para inhibir la SR) es extraordinariamente alto ⁵. Esta capacidad para producir inmunosupresión selectiva la ha convertido en un fármaco de primera elección para evitar el rechazo en los trasplantes de órganos sólidos ^{6,7}, resultando también útil en la prevención de la enfermedad *injerto contra huésped* que sigue al trasplante de médula ósea alogénica ⁸.

También se esta utilizando con éxito en enfermedades que han sido catalogadas como autoinmunes: uveitis, diabetes *mellitus*, psoriasis, esclerosis múltiple etc. ⁹.

I.1. ESTRUCTURA Y ORIGEN DE LA CICLOSPORINA

La CsA, es un polvo blanco, con un peso molecular de 1203 daltons, marcadamente hidrófobo, con un coeficiente de partición octanol/agua de 120/1 a temperatura ambiente; en cambio es ampliamente soluble en alcohol, éter y disolventes orgánicos^{9,10}.

I.1.1. ESTRUCTURA DE LA CsA

I.1.1.a. Estructura primaria.

La CsA es un polipéptido cíclico formado por 11 aminoácidos cuya fórmula empírica es **C₆₂ H₁₁₁ N₁₁ O₁₂**. Mediante hidrólisis ácida de la molécula, seguida de cromatografía de intercambio iónico, se determinó que diez de los aminoácidos eran alifáticos (cuatro N-metil-leucina, un ácido α -amino-butínico, una sarcosina, una leucina, una valina, una alanina, una D-alanina y una N-metil-valina) y el restante era un aminoácido desconocido hasta entonces, que se le denominó provisionalmente como C-9. Todos tienen la configuración S de los L-aminoácidos naturales, a excepción de la sarcosina y la D-alanina que tienen una configuración R. De los 11, 6 son N-metilados; esto unido a la

ausencia de aminoácidos polares o aromáticos, hace que la molécula de CsA sea altamente hidrófoba ^{11,12}.

El aminoácido C-9 no se puede obtener en forma libre, y sólo se ha logrado aislar algunos derivados cíclicos del mismo. El análisis cristalográfico con rayos X de uno de estos derivados, concretamente un iódoderivado, ha permitido conocer su estructura; la resonancia nuclear magnética (RNM) ha permitido determinar el enlace insaturado que contiene. Ha resultando ser un aminoácido de 9 átomos de carbono, al que se denomina N-metil-L-treonina; posee un grupo butanil y otro metil en su carbono terminal, y un enlace insaturado en posición trans¹¹.

I.1.1.b. Estructura secundaria.

La secuencia de aminoácidos de la CsA se determinó aplicando la degradación de Edman, modificada, sobre la isociclosporina, un derivado de aquella que se obtiene tratándola con ácido en ausencia de agua. se estableció que el aminoácido 1 es N-metil-L-treonina; el 2, ácido α -amino-butínico; los 4,6,9 y 10, N-metil-leucina; el 5, N-metil-valina; el 8, D-alanina y el 3, sarcosina. En la *Figura 1* se puede ver una representación esquemática de la estructura de la CsA ^{11,12}.

I.1.1.c. Estructuras terciaria y cuaternaria.

La estructura tridimensional de la CsA ha sido ampliamente estudiada, mediante la RNM en disolventes no polares y la cristalografía con rayos X. Los resultados sugieren que la zona comprendida entre los aminoácidos 1 y 6 adopta una forma de hoja plegada β antiparalela y que la comprendida entre el 7 y 11 el de una hélice α cerrada. Esta estructura es bastante rígida, y está fuertemente estabilizada por: tres enlaces transanulares de hidrógeno entre los radicales N-metilos y acídicos, dos entre los aminoácidos 2 y 5, y uno entre el 7 y 11; un enlace intramolecular entre los aminoácidos 6 y 8, que engloban al 7 dentro de un arco invertido; y un enlace cis-amino entre los aminoácidos 9 y 10. En la **Figura 2** se representa la imagen tridimensional de la estructura¹¹⁻¹⁴.

Mediante RNM en disolventes polares se ha comprobado que la CsA adopta diferentes conformaciones, que se reconvierten entre sí con rapidez; esto tiene una importante repercusión en las determinaciones de la CsA mediante la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)¹⁵.

I.1.2. ESTRUCTURA DE CONGÉNERES NATURALES.

Algunos congéneres naturales de la CsA, aislados del mismo hongo, mantienen la misma estructura cíclica y casi la misma composición; casi todos se diferencian de la CsA y entre sí por el segundo aminoácido, que en el caso de la ciclosporina B es la alanina, en la C la treonina, en la D la valina y en la G la N-valina. Otros congéneres se diferencian por cambios en otros aminoácidos, como es la ciclosporina E en la que el aminoácido 11 es la valina. Por razones prácticas se ha acordado denominar a la CsA como ciclosporina y al resto de los congéneres con el nombre del aminoácido diferente seguido de ciclosporina y así la [Ala²] ciclosporina es la ciclosporina B, la [Thr²] ciclosporina es la ciclosporina C y la [Val¹¹] ciclosporina es la ciclosporina E ^{3,9}.

I.1.3. ESTRUCTURA DE LOS METABOLITOS DE LA CsA.

La CsA es ampliamente metabolizada detectándose sus metabolitos en orina y en bilis. Para su aislamiento y purificación se ha utilizado la HPLC y la cromatografía de capa fina (TLC). Su composición ha sido determinada por degradación de Edman y su estructura elucidada por RNM y espectrometría de masas (MS).

Inicialmente se aislaron nueve metabolitos que se denominaron; M1, M8, M9, M10, M13, M16, M17, M18, y M21. Todos mantienen la estructura original de la CsA y las únicas modificaciones se limitan a: hidroxilaciones en la posición η del aminoácido 1 (R1) y γ de los 4,6 y 9, (R2, R3, R); N-dimetilación del aminoácido 4 (R4); y ciclización intramolecular (**Figura 3 y 4**). Los metabolitos M1 y M17 son derivados monohidroxilados de la CsA; los M8, M10 y M16 son derivados dihidroxilados; el M21 es un derivado N-dimetilado; el M13 monohidroxilado y N-dimetilado; el M9 dihidroxilado y N-metilado; y el M18 resulta de una ciclización interna del metabolito M17^{16,17}. Posteriormente se aislaron nuevos metabolitos, el M25 (hidroxilación en R1 y N-dimetilación en el aminoácido 4), el M26 (hidroxilación en R1 y ciclización interna) y el M203-218 que tiene un radical ácido en el R1¹⁸⁻²⁰.

La presencia de un metabolito ácido hace sospechar que existe un aldéhidido intermedio. Con la HPLC se han detectados picos (ALD1, ALD2), que la MS revela como aldéhdidos localizados en el aminoácido 1, que podrían ser debidos a una apertura de la ciclización interna del carbono 9 (R1)²¹.

El uso de la TLC ha permitido aislar nuevos metabolitos altamente polares, los denominados M-A (no presente en humanos), M-D, y M-E,

cuya estructura todavía no ha podido ser perfectamente elucidada ²²⁻²⁴. También se ha identificado en la bilis de pacientes trasplantados de hígado, y tratados con CsA, un sulfato conjugado de CsA ²⁵.

La combinación de HPLC de fase normal (NP) y fase inversa (RP) permite separar hasta 27 metabolitos diferentes en la bilis de pacientes pos-trasplantados de riñón que tomaban CsA. La mayoría son los metabolitos ya conocidos, aunque se han observado (mediante MS) tres nuevas estructuras con pesos moleculares de 1.174, 1.236, y 1.222. El primero deriva probablemente del M21 por una segunda N-dimetilación, pero los dos restantes parecen tener una estructura vic-dihidrodiol ²⁶, lo que confirmaría la sospecha de un epóxido altamente inestable como metabolito intermedio ²⁷.

Los metabolitos M17 en humanos, M1 en animales y el M21 en ambas especies, son los metabolitos de primera generación. La posterior oxidación de los 2 primeros da lugar a los metabolitos M8, M10 y M16. Una segunda oxidación del M17 da lugar al M203-218. Posteriores oxidaciones de éstos metabolitos, dan metabolitos de segunda y tercera generación, así como metabolitos intermedios como los aldéhdos y epóxidos antes citados ¹⁷.

I.2. MECANISMO DE ACCIÓN

I.2.1. A NIVEL GENERAL

I.2.1.a. Inmunología del rechazo.

La supervivencia de un individuo depende de la capacidad de su sistema inmunitario para reconocer las sustancias extrañas que penetran en él organismo y generar una respuesta contra ellas.

En el hombre los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CHM) codifican unas proteínas esenciales para este reconocimiento, que se denominan antígenos de histocompatibilidad I y II, y que están integrados por al menos seis diferentes antígenos leucocitarios humanos (HLA). Cada gen HLA es capaz de presentar múltiples formas (alelos), lo que hace que los HLA que forman parte de la membrana celular difieran extraordinariamente de unos individuos a otros ²⁸⁻³².

El rechazo de un órgano trasplantado se produce porque el sistema inmunitario del receptor reconoce a las moléculas de aquél como extrañas a su CHM. Ello activa las células presentadoras de antígenos (APC), que contienen los antígenos I y II de histocompatibilidad, que interactúan con los receptores de los linfocitos T que los reconocen como HLA alogénicos modificados por una proteína extraña ³³⁻³⁵.

Simultáneamente los linfocitos T reciben la estimulación de otras moléculas, induciendo en ellos la producción de interleuquina 2 (IL-2) y de receptores específicos de IL-2, y transformándolos de linfocitos T-precitotóxicos en linfocitos T-citotóxicos maduros. Los linfocitos de la clase CD8+ reconocen preferentemente a los antígenos de la clase I, y los CD4+ a los de clase II; ambos se activan por las APC, aunque la CD8+ parece requerir también la presencia de IL-2 producida por los CD4+ ^{36,37}.

I.2.1.b. Formas de acción de la CsA.

La CsA actúa inhibiendo, de forma reversible y dosis dependiente, la activación de los linfocitos T. Los diferentes pasos de la misma tienen distinta sensibilidad a la acción de la CsA, e incluso algunos son resistentes.

A) Acción sobre la IL-2:

El primer paso en la acción de la CsA es la inhibición de la producción de IL-2 por los Linfocitos T-Helper (facilitadores). La ausencia de esta linfoquina impide la activación y proliferación del propio linfocito T-Helper, así como la de los linfocitos T-citotóxicos

maduros. Se ha demostrado "in vitro" que la ciclosporina no disminuye la cantidad de IL-2 ya producida³⁸⁻⁴⁰.

B) Acción sobre los linfocitos.

La CsA ejerce una inhibición directa sobre las células precursoras del linfocito T-citotóxico, impidiendo que adquieran citoagresividad y maduren, al inhibir su capacidad para adquirir el receptor de la IL-2. No obstante se ha comprobado que no inhibe la función de los linfocitos citotóxicos maduros y activados.

Las células precursoras de los linfocitos T-supresores no son inhibidas por la CsA, probablemente porque los pasos de su activación son diferentes a los de los linfocitos T-citotóxicos; por tanto maduran a linfocitos T-supresores, cuya actividad no es afectada por la CsA; tampoco afecta a la diferenciación y función de los linfocitos B⁴¹⁻⁴⁷.

C) Acción sobre el interferón

Otro mediador afectado por la CsA es el interferón. El α interferón, producido por los leucocitos no se ve afectado; tampoco el β interferón, producido por los fibroblastos; sí disminuye de forma marcada el γ interferón, producido por los linfocitos T, responsable de la activación de los antígenos de histocompatibilidad I y II. Como consecuencia disminuye la producción o la activación de las células presentadoras de

antígenos del sistema HLA. Estos procesos son dosis dependientes y reversibles al suspender el tratamiento ⁴⁸⁻⁵⁰.

D) Acción sobre los factores quimiotácticos.

Los inmunosupresores azatioprina y prednisona inhiben la producción del factor quimiotáctico de los macrófagos y su capacidad fagocítica, lo que facilita la aparición de infecciones secundarias. La CsA no produce tal inhibición, por lo que las infecciones secundarias son menos frecuentes que con los anteriores tratamientos; como es lógico, a altas dosis aumenta el riesgo ⁵¹⁻⁵³.

I.2.1.c. Tolerancia a largo plazo de los injertos.

La CsA aumenta esta tolerancia, probablemente por dos mecanismos simultáneos: deteniendo la clonación de linfocitos citotóxicos, y permitiendo la activación de linfocitos T-supresores específicos. Esta tolerancia no se transmite por el suero, pero si por infusión de linfocitos T, lo que refuerza la hipótesis de que estos linfocitos están activados ⁵⁴⁻⁵⁸.

I.2.2. A NIVEL CELULAR.

I.2.2.a. Unión de la CsA a los lugares de acción.

Los estudios sobre la unión de la CsA a los linfocitos, sugieren la existencia de receptores muy específicos para aquellos, y con gran afinidad. Sólo las ciclosporinas con estructura y actividad muy semejante a la CsA, como la CsC o la CsD, consiguen el desplazamiento del radiomarcador de dichos lugares. Otras ciclosporinas similares, como la Keto-ciclosporina o la CsH, y otras sustancias estructuralmente diferentes de las ciclosporinas, como los agonistas y antagonistas de la histamina, los de la serotonina y los de la adrenalina, no consiguen tal desplazamiento.

La CsA se une a estos receptores específicos; la unión es concentración dependiente, saturable y reversible. La capacidad para ésta unión es diferente para cada tipo de linfocitos, siendo los timocitos los de mayor capacidad (35 pmol / 4×10^6 células), seguidos de los macrófagos (30 pmol), las células esplénicas (25 pmol), los linfocitos T (15 pmol) y linfocitos B (8 pmol). La afinidad, por el contrario es igual para todos ellos ⁵⁹⁻⁶¹.

A) Localización del receptor.

Las células BW5147, obtenidas de linfomas espontáneos de timo de ratones, tienen en su estructura el antígeno Thy-1 (marcador universal de los linfocitos T), y son 5-10 veces más sensibles a la acción de la CsA que otras células malignas de la línea celular T del ratón; esto, junto a su gran capacidad de clonación, las hace especialmente útiles para el estudio del mecanismo de acción de la CsA. La CsA se une a estas células de igual manera que lo hace a los linfocitos, es decir, de forma específica, saturable, reversible y temperatura dependiente.

La incubación de las células BW5147 con la CsA inhibe en ellas la síntesis de ADN, ARN y otras proteínas; la inhibición se observa a partir de los 30 minutos, pero son necesarias más de 24 horas de incubación para obtener la inhibición de la maduración celular. Esto sugiere que el fármaco interacciona con algún componente intracelular.

Tras la incubación, en el lisado de estas células se ha encontrado un complejo formado por el fármaco y algún componente citoplasmático. Este complejo, que se produce tanto en presencia como en ausencia de la membrana celular, tiene un peso molecular entre 15 y 20 Kd y un punto isoeléctrico entre 6.8 y 8.5.

De estos estudios se deduce que el receptor específico de la CsA es intracelular. No obstante, existen evidencias que gracias a su liposolubilidad, difunde a través de la membrana .

Por tanto puede descartarse la existencia de receptores para la CsA en la membrana de los linfocitos T, a los que si se fijan los anticuerpos monoclonales OKT3 y otros mitógenos (PHA, Con A, PMA, LPS), y también factores de maduración (IL2) ⁶²⁻⁶⁴.

B) Naturaleza del receptor.

Estructuralmente, es una proteína globular de 15 KD de peso molecular, que contiene 163 aminoácidos. Aislada por vez primera en los timocitos, es una proteína no descrita hasta entonces, y que se la denominó con el nombre de ciclofilina. La CsA y las demás ciclosporinas se unen de una forma estero-específica y con alta afinidad ($K_d = 30 \text{ nM}$). Posteriormente se aisló en los eritrocitos una proteína con un peso molecular entre 15 y 17 KD que se denominó *Cyclosporin binding-protein* (CsBP), con estructura semejante a la de la ciclofilina, a la que también se une la ciclosporina con las mismas características que lo hacen al eritrocito intacto.

Aunque se ha postulado que la calmodulina (una proteína citoplasmática reguladora del calcio intracelular) pudiera ser el receptor de las ciclosporinas, estudios posteriores lo han descartado. Por tanto la ciclofilina es el único receptor intracelular propio de las ciclosporinas ^{65 - 75}.

C) Ubicuidad del receptor.

Se ha detectado la presencia de este receptor específico en todas las células humanas estudiadas. Su concentración en los diferentes tejidos humanos oscila de 1 a 2 mg/mg de proteínas totales, excepto en el cerebro que es casi de 3 mg/mg. En el cerebro, con una concentración mayor en el parénquima que en el estroma, la mayor concentración se da en las células de Purkinje. En la sangre la concentración es de 3-9 mg/mL, la mayor parte dentro del compartimento celular (6,6 mg/mL en eritrocitos, 1,5 mg/mL en linfocitos, y sólo 0,6 mg/mL en plasma) ⁷⁶. El receptor también se ha aislado en células malignas, como las del adenocarcinoma de colon. En ellas, la concentración es 2-3 veces mayor que la que tienen las células sanas del colon. El receptor, igualmente está presente en las células de otras especies eucariotas como; moluscos, artrópodos, trematodes, hongos, esponjas marinas, plantas etc. En contraste, no se ha encontrado en bacterias, como la *Escherichia coli* ⁷⁷.

La ciclofilina, la CsBP humana, y los receptores específicos para las ciclosporinas, tienen, a pesar de su diferente filogenia, una estructura muy parecida (a veces hasta del 98%, como la ciclofilina y la CsBP). Además, las tres estructuras tienen una reactividad cruzada con el antisuero policlonal de la ciclofilina. Por estas razones se considera que son sustancias homólogas producidas por una misma familia de multigenes, ampliamente difundida por toda la naturaleza, que juegan un papel importante en el metabolismo celular, y que son el “lugar diana” primario donde interactúa la ciclosporina ^{65-67,76,77}. En las especies mutantes de *Neurospora crassa* y en la *Saccharomyces cerevisiae*, que han perdido el gen codificador de la ciclofilina, la ciclosporina no tiene ninguna actividad ⁷⁸.

I.2.3. A NIVEL BIOQUÍMICO.

Se ha demostrado que la ciclofilina y la peptil-prolil-isomerasa (enzima responsable del correcto plegamiento de las proteínas para su renaturalización) tienen la misma secuencia de aminoácidos, y son por tanto la misma sustancia.

Es probable que la CsA compita con el sustrato natural de la ciclofilina para unirse a ella; de esta manera inhibe la actividad enzimática de la ciclofilina, dificultando el correcto plegamiento de la

proteína substrato. No se conoce cual es la proteína substrato, pero se cree que pudiera ser diferente en cada tejido; consecuentemente la ciclofilina tendría diferente función, según el tejido y por tanto, su inhibición diferentes consecuencias (inmunosupresión, nefrotoxicidad etc.)⁷⁹⁻⁸¹.

I.2.3.a. Unión ciclofilina - ciclosporina e inmunosupresión.

Los aminoácidos implicados en la unión CsA-ciclofilina son los mismos que están implicados en la capacidad inmunosupresora de aquella, excepto los que tienen alterados el radical 3, en ello se produce alteraciones de sus propiedades farmacocinéticas, especialmente su capacidad para atravesar la membrana celular^{59,60}.

I.3 FARMACOCINÉTICA

La amplia diversidad de la respuesta, tanto intra como interindividual, a una misma dosis de CsA, es consecuencia de una serie de factores que influyen, a diferentes niveles, en su farmacocinética, y que la hacen muy variable.

I.3.1. ABSORCIÓN ORAL.

La CsA se absorbe en el tramo superior del intestino delgado de forma lenta e incompleta, siendo necesario disolverla en aceite de oliva u otro emoliente lípido, antes de administrarla, debido a su poca solubilidad. El tiempo medio de absorción es de 0,6 a 2,3 horas. La máxima concentración en sangre se consigue dentro de unos amplios límites horarios, de 1 a 8 horas; en ocasiones pueden observarse perfiles de absorción bifásicos. Posteriormente sigue un lento descenso hasta alcanzar niveles estables a partir de las 12 horas de la administración, que se mantienen hasta pasadas 24 horas .

En voluntarios sanos hay una gran variabilidad interindividual en la biodisponibilidad oral del fármaco (20% - 50%), que se hace mayor en pacientes pos-trasplantados (5% - 89%), en estos, los de médula ósea alogénica presentan una biodisponibilidad mayor que los pacientes con

trasplante de hígado. Esta variabilidad probablemente refleje las diferencias de capacidad para liberar a la ciclosporina de su vehículo ⁸²⁻⁹⁸.

I.3.1.a. Influencia de los alimentos.

El ayuno previo a la administración del fármaco no influye en la cantidad o velocidad de absorción. La toma previa de alimentos ha aumentado la absorción en algunos casos, en otros la ha disminuido, y a veces no la ha modificado. Esta disparidad probablemente se deba al tiempo transcurrido entre la toma de los alimentos y la del fármaco, o a las dietas diferentes de los distintos estudios realizados .

La administración concomitante de leche, zumo de naranja, o leche mezclada con chocolate, no influye en la cantidad ni en la velocidad de absorción; en cambio el chocolate solo, mejora la absorción, probablemente porque produce una mejor dispersión del fármaco ⁹⁹⁻¹⁰¹.

I.3.1.b. Efecto de las enfermedades hepáticas.

Debido al carácter liposoluble de la CsA, su biodisponibilidad oral baja en éstos pacientes (12% frente al 30% en sanos). Los enfermos hepáticos con $<$ de 10 mg/mL de bilirrubina plasmática absorben $>$ del 5% del fármaco administrado, mientras que los que tiene $>$ de 10 mg/mL absorben $<$ del 5%.

También se ha comprobado que la absorción de la CsA es errática y lenta en los pacientes con drenaje biliar externo, pero el pinzamiento del tubo va seguido de un aumento inmediato de la absorción. Por otra parte, la colestasis quirúrgica experimental provoca una disminución de la biodisponibilidad oral de la CsA (del 23.5% al 7.4%); lo mismo ocurre en el postoperatorio inmediato de trasplantes hepáticos, en los que el flujo biliar es escaso.

Todo lo anterior demuestra la importancia de la bilis en la absorción del fármaco (probablemente porque incrementa su solubilidad), habiéndose comprobado en pacientes cirróticos que la administración concomitante de sales biliares con la CsA aumenta su absorción ^{96,105-110}.

I.3.1.c. Efectos de las enfermedades gastrointestinales.

La absorción oral de CsA se ve disminuida si existe aceleración del vaciado gástrico o del tránsito intestinal, como la esteatorrea y la diarrea. Ésta última es muy frecuente en los trasplantados de médula ósea, bien por la radioterapia previa al trasplante, bien por candidiasis o por enteritis secundarias a la enfermedad *injerto contra huésped* ^{94,111,112}.

I.3.1.d. Influencia del tiempo postrasplante.

La biodisponibilidad oral de la CsA se incrementa durante las primeras semanas después del trasplante. En el renal se ha observado incrementos de hasta un 25% pasada la segunda semana, alcanzando el 50 % pasados 3 meses (supone un aumento de la biodisponibilidad de hasta 5 veces), estas cifras son mayores en los pacientes con trasplante hepático. En estos últimos la normalización de la función hepática, con el consiguiente aumento de la producción de bilis, podría explicar este hecho, pero resulta difícil explicar cual es la causa en otro tipo de trasplantes ^{90,113-115}.

I.3.2. ADMINISTRACIÓN INTRAMUSCULAR.

La absorción de la CsA por esta vía es escasa y errática, por lo que su utilización no está indicada en ningún caso ^{83,116}.

I.3.3. ADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA.

Cuando la CsA se administra por vía intravenosa la curva de concentración presenta una fase inicial con un pico alto y vida media de $0,10 \pm 0,03$ h. seguido de una curva de eliminación bifásica, con una

vida media de $1,8 \pm 0,25$ h. en su primera fase y $15,8 \pm 8,4$ h. en su segunda. Este comportamiento multiconpartimental con dos fases bien diferenciadas se debe a la alta liposolubilidad de la molécula que facilita su difusión a través de todas las membranas biológicas, y hace que inmediatamente después de su entrada en el compartimento sanguíneo se distribuya por el compartimento tisular ^{112,117}.

I.3.4. DISTRIBUCIÓN.

El volumen de distribución de la CsA varía ampliamente entre los diferentes pacientes. Los niños con insuficiencia cardíaca, individuos sanos y trasplantados cardíacos tienen un volumen de distribución pequeño, 0,9, 1,2 y 1,3 L/kg. respectivamente. Los pacientes con fallo renal o hepático y sobre todo los trasplantados renales tienen un volumen de distribución mas alto 3,5 a 3,9; 4,5 a 4,9 L/kg. respectivamente, alcanzando hasta 8 L/kg. en pacientes con uremia alta secundaria a fallo renal grave.

La escasa relación encontrada entre su volumen de distribución y la obesidad ha hecho pensar que, además de la liposolubilidad, deben de existir otros factores que expliquen estas diferencias. Uno de estos elementos puede ser la mayor o menor cantidad de CsBP que contengan los tejidos ^{82-85, 96,117,118}.

I.3.4.a. Distribución tisular.

La CsA se distribuye ampliamente por todo el organismo. Después de una dosis oral única, la concentración del fármaco en los tejidos aumenta lentamente y alcanza el máximo a las 4-8 horas. El cociente de distribución tejidos/sangre es de 2 a 10, lo que evidencia la alta afinidad de los tejidos por el fármaco. Con las sucesivas dosis, la concentración tisular de CsA va aumentando hasta la saturación, que se alcanza aproximadamente a la semana de tratamiento continuado, a partir de entonces la concentración tisular de CsA permanece constante. Esta saturación que experimenta el compartimento tisular explica porque al reducir o suspender el tratamiento se produce una rápida desaparición de sus efectos indeseables

El fármaco desaparece de los tejidos según una curva bifásica, con una semivida entre 60 y 120 horas. La fase lenta de la eliminación de la CsA se debe a su depósito en la piel y sobre todo de la grasa; probablemente ambos tejidos actúen como zonas de depósito. Después de la administración de la última dosis de CsA, ésta no desaparece de los tejidos hasta semanas después. Se ha detectado CsA en fallecidos que habían dejado de tomarla 16 días antes de su muerte ^{95,102,119-121}.

En el tejido adiposo es donde se alcanza la mayor concentración de CsA, lo que es concordante con la alta liposolubilidad del fármaco. También se encuentra altas concentraciones en hígado, riñón, glándulas secretoras y tejido linfático . Concentraciones más bajas que las sanguíneas sólo se encuentran en el músculo y en el cerebro y no se ha podido detectar el fármaco en el líquido cefalorraquídeo, lo que sugiere que atraviesa con dificultad la barrera hematoencefálica ^{95,120-125}.

Se ha comprobado la presencia del fármaco en el líquido amniótico y en la sangre periférica del feto 48 después de la última dosis suministrada a la madre lo que implica que atraviesa la membrana placentaria También se ha demostrado que pasa a la leche materna por ello se desaconseja la lactancia materna en las madre en tratamiento con CsA ^{126,127}.

I.3.4.b. Distribución sanguínea.

La CsA se distribuye entre todos los componentes de la sangre, pero especialmente entre los elementos celulares y las lipoproteínas plasmáticas ^{128,129}.

A) Cociente de reparto células/plasma.

"In vitro" el 70% del fármaco se encuentra en las células sanguíneas y el 30% restante en el plasma. Esto se traduce, "in vivo", en un alto cociente de reparto sangre/plasma ^{120,121,128,130,131}. Existe una serie de factores que pueden modificar este reparto:

a) Influencia de la temperatura.

La concentración plasmática de CsA disminuye a medida que baja la temperatura de conservación de la sangre o la de centrifugación para la separación del plasma. Dicha concentración, cuando la sangre se conserva y centrifuga a 37°C, es un 50% mayor que centrifugada a 21°C. La redistribución de la CsA se alcanza dentro de las 2 primeras horas, y es totalmente reversible. Esto se produce porque la CsA que se une a los eritrocitos es mayor conforme disminuye la temperatura (la afinidad por el fármaco aumenta a bajas temperaturas). Esta afinidad presenta gran variabilidad interindividual y no está influenciada por las proteínas plasmáticas porque la afinidad de la CsA por ellas es muy pequeña en relación a la de las células sanguíneas ^{121,129,132}.

b) Influencia de la concentración sanguínea de CsA.

La concentración plasmática de CsA depende de su concentración en sangre total. A bajas concentraciones sanguíneas el cociente de reparto entre células / plasma es constante (comportamiento lineal o no saturable), pero a partir de determinada concentración va aumentando la proporción de CsA plasmática con respecto a su concentración sanguínea total (comportamiento no lineal o saturable). A temperatura ambiente este cociente es constante a concentraciones sanguíneas < 500 ng/mL, a 37°C este cociente es constante a concentraciones sanguíneas < 4 µg/mL.

Cuando la concentración en sangre es superiores a 4 µg/mL la proporción de CsA que se encuentra en el plasma, con respecto a la sanguínea total, es igual a 21°C que a 37°C, porque la influencia de la temperatura en el cociente de reparto células sanguíneas/plasma se va haciendo cada vez menor a medida que la concentración sanguínea total de CsA se va acercando al punto de máxima saturación ^{120,121,128,130,131,133}.

c) Influencia del hematocrito.

De las células sanguíneas son los eritrocitos los que mayor cantidad de CsA transportan, lo que hace suponer que el hematocrito juega un papel

importante en la proporción de CsA que se reparte entre células/plasma.

"In vitro" se ha comprobado que existe una correlación negativa entre la concentración de CsA en plasma y el hematocrito, y que dicha correlación es mayor a medida que disminuye la temperatura de obtención del plasma por centrifugación.

"In vivo" los resultados son controvertidos e, incluso, contrapuestos. Así en el postrasplante renal la correlación antes referida es menor cuando las concentraciones se miden con HPLC que con RIA ; además existe falta de correlación entre las concentraciones en sangre y plasma, que se atribuye a la influencia del hematocrito. Sin embargo, otros autores encuentran un aumento no significativo del cociente de reparto sangre total/plasma al aumentar el hematocrito, y los niveles sanguíneos y plasmáticos guardan una buena correlación entre sí ^{120.133-135}

En 5 pacientes con hematocritos diferentes se ha comprobando que la afinidad de las células sanguíneas por la CsA varía de un individuo a otro y, esta variación es independiente del hematocrito. El cociente de reparto células sanguíneas/plasma también es independiente del hematocrito, probablemente porque los eritrocitos de cada paciente presentan distintas capacidades de saturación. En todos los casos hay una buena correlación entre los niveles de CsA en sangre y en plasma ¹³⁶.

En conclusión, la afinidad de la CsA por los eritrocitos y la capacidad máxima de éstos para fijarla son independientes del hematocrito, y ambas variables son independientes entre sí. Por otra parte, el efecto del hematocrito "in vivo" es poco importante, porque el intercambio dinámico con los tejidos minimiza su influencia en el reparto de la CsA dentro del compartimento sanguíneo ^{135,136}.

B) Distribución en las células sanguíneas.

Los eritrocitos son los mayores transportadores de CsA (entre el 40% y el 50% de la existente en la sangre), los leucocitos transportan entre el 10% y el 20%. A pesar de que los leucocitos tienen una gran capacidad para la unión con la CsA y su afinidad por ella es 10 veces mayor que la del eritrocito, su escaso número en relación con los eritrocitos minimiza su relevancia en la farmacocinética de la CsA. Si se hace abstracción de los volúmenes de ambas células los leucocitos transportan, en proporción, hasta 1000 veces más CsA que los eritrocitos. El cociente de concentración de CsA eritrocitos/leucocitos a baja concentración del fármaco, en la que los leucocitos aún no están saturados, es pequeño, pero una vez saturados, al subir la concentración se hace bastante mayor, aumentando en proporción a la concentración de CsA total ^{102,120,128,129}.

a) Unión de la CsA a los eritrocitos

La CsA no se une a la membrana del eritrocito, ni a la anhidrasa carbónica; sólo lo hace, y moderadamente, a la hemoglobina. Más del 80% del fármaco está unido a una proteína específica intraeritrocitaria de 16 Kd de peso molecular denominada CsBP. Tanto la CsA como la H3-CsA forman complejos con ella; no así la I-CsA, probablemente por que los cambios conformacionales que la yodación provoca en el fármaco afectan a su sitio de unión con la CsBP.

La afinidad de la CsA por la CsBP aislada aumenta al bajar la temperatura, en cambio, la cantidad total de CsA (capacidad) con la que se puede unir la CsBP, no se altera por los cambios de temperatura. Con el eritrocito intacto ocurre lo mismo que con la CsBP aislada . La diferencia interindividual en la concentración de dicha proteína explica la diferencia interindividual, tanto de la afinidad de la CsA por los eritrocitos, como de la capacidad total de estos para unirse a ella
69,70,102,120,137.

b) Unión de la CsA a los leucocitos.

Es semejante a la de los eritrocitos y ya ha sido descrita anteriormente (ver 2.2.2).

C) Distribución plasmática.

La mayor parte de la CsA que se encuentra en el plasma está unida a las proteínas plasmáticas, y sólo una pequeña proporción está disuelta en el agua del mismo, en forma libre.

La unida a las proteínas es independiente de la concentración plasmática del fármaco, dentro de un amplio rango de concentraciones (desde 0,02 a 20 µg/mL). En cambio, depende mucho de la temperatura: a 4°C la proporción unida es del 70% ; pasa a ser del 93% a 20°C ; y del 98% a 37°C.

Independientemente de la proporción de CsA unida a las proteínas plasmáticas el 80% lo hace a las lipoproteínas; el resto se une a otras proteínas plasmáticas, sobre todo a la albúmina. Estas proporciones varían entre distintos individuos y especies, dependiendo de la cantidad y calidad de las diversas proteínas plasmáticas ^{95,102,120,129,138}.

a) Unión de la CsA a las lipoproteínas.

La CsA no solamente va disuelta en la fracción lipídica de las lipoproteínas, sino que existe una unión selectiva e inespecífica con la

parte proteica (apoproteína) de aquellas. Este tipo de unión no se da con las otras proteínas plasmáticas, incluida la albúmina ¹³⁹.

b) Distribución entre las fracciones lipoproteicas.

Tanto en el plasma de trasplantados que reciben el fármaco, como en el de individuos sanos a los que se le incorpora *in vitro*, una gran proporción de CsA esta unida a la HDL-Colesterol (33%-57%), una menor lo esta a la LDL (25% a 35%) y una pequeña a la VLDL (2% a 19%). Estos porcentajes no varían dentro del rango de concentración plasmática de CsA de 100 a 500 ng/mL. Por el contrario, varían ampliamente entre los diferentes individuos, dependiendo de los factores que modifican el patrón lipoproteico (edad, sexo, dieta, hiperlipemias, tiempo de ayuno, etc.).

La capacidad para fijar la CsA de cada una de las lipoproteínas es elevada. Así la LDL y VLDL comienzan a saturarse a partir de 100 pmol/mL de CsA, mientras que la HDL no lo hace incluso por encima de 200 pmol/mL. La afinidad de la **CsA** por las lipoproteínas depende de su cociente lipídico/proteico. Por ello las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones, VLDL, IDL), vehiculan la mayor proporción de CsA plasmática.

Se ha comprobado que existe un intercambio de CsA entre las diferentes lipoproteínas, así como entre estas y la albúmina y las células sanguíneas. Este paso de unas a otras, probablemente no se haga solo por difusión pasiva, y puede haber determinados factores plasmáticos o tisulares que lo modulen. Se ha sugerido que podría realizarse durante la lipólisis, junto con el colesterol y los fosfolípidos. Todo ello confirma la importancia de las lipoproteínas en la distribución de la CsA, en la que jugaría un papel de transporte y de liberación de la CsA en el sitio de acción ^{129,132,136,140-142}.

c) Fracción plasmática libre (FP) del fármaco

Muestra gran variabilidad ínter e intraindividual, oscilando ésta entre el 0,5% y 4,2% (media 1,30%); esos límites supone una posibilidad de variación del 800 %.

La FP de la CsA no se altera con los cambios de su concentración plasmática total, pero sí (de manera inversamente proporcional) con las modificaciones de la temperatura. No se correlaciona con la dosis oral del fármaco ($r=0,02$), ni con los niveles plasmáticos totales del mismo ($r=0,03$); en cambio se ha observado una gran correlación inversa con los niveles

plasmáticos de HDL-Colesterol (no así con los de LDL-Colesterol y triglicéridos ^{138,113-116}).

I.3.5. BIOTRANSFORMACIÓN.

Dado que la CsA es muy poco *polar*, su eliminación del organismo en forma inalterada es escasa. Antes de su eliminación, sufre diferentes procesos de biotransformación, que originan finalmente metabolitos mas *polares*, fácilmente excretados por las vías urinaria y/ó hepática.

I.3.5.a. Farmacocinética de los metabolitos.

El metabolismo de la CsA es muy rápido: 4 horas después de una dosis oral única ya se miden cantidades importantes de sus metabolitos en sangre total, sobre todo M17 y algo menos M1, sin que exista correlación entre las concentraciones de CsA y de M17. 12 horas después de la dosis oral, la concentración de M17 es superior a la de CsA; en ocasiones, hasta 20 veces mayor.

La concentración de CsA y la de sus metabolitos es mayor en las células sanguíneas que en el plasma. Dentro de ellas el compuesto mayoritario es la CsA (27% sobre el total), seguido de los metabolitos

M17 (24%) y M1 (13%) . El resto de los metabolitos aparecen en pequeñas proporciones; el M10 y el M18 ni aparecen en las células sanguíneas. No existe competencia de unión, entre el M17 y la CsA, por las células sanguíneas. En el plasma la CsA también es el compuesto mayoritario (52%), seguido de M17 (13%), los demás metabolitos se encuentran en porcentajes entre el 3 y el 7%. La concentración del M17, y especialmente del M18, es temperatura dependiente, no hallándose ninguno de ellos en el plasma separado a temperatura ambiente. La unión de los metabolitos de la CsA a las proteínas plasmáticas es independiente de la concentración de ellos, y su presencia no interfiere con la unión de la propia CsA con dichas proteínas. El porcentaje de unión de tales metabolitos es variable: baja como el M8, M10; media como el M13 (entre 24% y el 57%); y elevada como el M21 (87%) .

En los tejidos la CsA es también el elemento más abundante (50 a 90%). Entre los metabolitos el más abundante en los tejidos es el M1, excepto en el tejido graso donde solo representa el 20% del total de los metabolitos ^{16.17.114.147-153}.

I.3.5.b. Proceso de biotransformación.

La oxidación de la CsA, que se realiza fundamentalmente en el hígado, es NADPH - dependiente (isoenzima del citocromo P-450). Se

ha comprobado que el isoenzima P-450IIIa encodado por el gen P-450IIIA, es el responsable de más del 80% de dicha oxidación ^{16,154-157}.

El aclaramiento hepático de la CsA tiene amplias variaciones interindividuales, habiéndose determinado valores en trasplantes renales que van desde 0,63 mL/m/Kg. hasta 23,9 mL/m/Kg. determinados en pacientes con trasplante renal. Dado que la extracción hepática de la CsA es intermedia - baja, el flujo hepático tiene poca influencia en las variaciones del aclaramiento. Los factores que pueden alterar dicho aclaramiento son: factores genéticos, edad, tipo de trasplante y, patologías previas ^{82,95,119,153,158-160}.

I.3.5.c. Factores que influyen en el aclaramiento hepático.

A) factores genéticos.

Los hígados sanos tienen diferente capacidad para metabolizar CsA, con variaciones de hasta 25 veces. Debido a la discreta (baja - intermedia) extracción hepática del fármaco, las modificaciones del flujo sanguíneo hepático influyen poco en aquellas variaciones. Son otros factores (como la concentración y/o estructura del citocromo P-450) los responsables de las mismas, y las variaciones de tales factores están determinadas genéticamente ¹⁵⁶.

B) Edad.

Los niños tienen un aclaramiento de la CsA mayor que los adultos. En caso de trasplante hepático mostraron una media de 9,3 mL/m/Kg. mientras que en adultos era de 5,5 mL/m/Kg. En trasplantes renales las diferencias fueron de 11,8 mL/m/Kg. y 5,7 mL/m/Kg. Respectivamente. Igualmente se ha comprobado esta diferencia en trasplante de médula ósea alogénica. Por tanto los niños necesitan dosis mas altas del fármaco que los adultos para unos niveles semejantes en sangre y, además es necesario disminuir el intervalo entre dosis ^{82,86,87,92,93}.

C) Tipo de trasplante y patologías previas.

Como el metabolismo de la CsA es hepático, en los trasplantes de este órgano disminuye su aclaramiento en tanto no se restablezca la total funcionalidad del nuevo hígado. Por otro lado el aumento de la bilirrubina sérica por encima de 2 mg/dL disminuye el aclaramiento de la CsA. En la cirrosis hepática también se observa dicha disminución (medias de aclaramiento de 2,8 mL/m/Kg.) ^{95,96,153,161,162}.

La insuficiencia cardíaca influye en el aclaramiento de la CsA en la medida que altere el funcionamiento hepático. Incluso se ha comprobado un aumento de dicho aclaramiento en los trasplantes

cardíacos, probablemente porque mejoran las alteraciones hepáticas secundarias a la hipertensión portal ¹⁶³.

No hay diferencias significativas entre el aclaramiento de la CsA en sanos y en trasplantados de riñón, de médula ósea alogénica, o en insuficiencia renal ^{82.92.118}.

I.3.6. ELIMINACION.

Es un proceso bifásico que comienza 48 horas después de la administración oral de CsA. La eliminación es lineal, aunque hay estudios en los que se ha observado una no linealidad.

A las 96 horas de una dosis única oral de CsA, sólo aparece en orina el 6% de la cantidad administrada: la mayor parte en forma de metabolitos, sobre todo M17 (1,1%) y algo de M18 (0,5%), siendo mínima la que aparece en forma de CsA inalterada (0,1%).

La más importante vía de excreción de la CsA y sus metabolitos es la bilis. Al igual que en la orina, el fármaco se encuentra principalmente en forma de metabolitos (sobre todo M8 y M17, y algo menos M13, M18, M1, M21).

Para explicar la aparición de un segundo *pico* de concentración de CsA tras su administración oral se ha formulado la hipótesis que dicho fármaco sufre un proceso de recirculación enterohepática. Estudios posteriores no la han confirmado; no obstante, si se ha observado la excreción por la bilis, en gran cantidad, de un sulfato conjugado de CsA, que podría ser degradado por las bacterias intestinales dejando libre CsA inalterada, y que está pudiera ser posteriormente reabsorbida

17.25.95,159,160,161.

I.3.7. LA CsA NEORAL.

La CsA neoral es una forma galénica (microemulsión) de administración oral de la CsA, que favorece la dispersión de la misma en el punto de absorción. Con esta nueva formula se ha comprobado que la absorción es más regular, homogénea y rápida que con la formula tradicional (Sandimmune ®) e independiente de los alimentos, lo que se traduce en una menor variabilidad intraindividual mejorando la correlación entre la dosis y la Cm.

Tanto en individuos sanos como en pacientes con trasplante estable se produce un aumento de la biodisponibilidad, aumento de la Cmx (60-70%) y el AUC (50-60%), además, la correlación entre Cm y AUC es mejor en la mayoría de los pacientes, así como la correlación entre dosis

y AUC. Cuando se usa la formula neoral en las primeras semanas de un trasplante hepático es necesario disminuir con frecuencia la dosis administrada para evitar niveles tóxicos.

I.4. MONITORIZACIÓN TERAPEUTICA

El manejo clínico de la ciclosporina y su dosificación es muy complejo debido a los siguientes motivos:

1º- Existe escasa correspondencia entre la dosis administrada y la concentración alcanzada en sangre, debido a la gran variabilidad inter e intraindividual de su farmacocinética, tanto por vía oral como intravenosa. Aspecto ya revisado en el capítulo III.

2º- Tiene un rango terapéutico muy estrecho, que hace que sea frecuente la presencia de efectos tóxicos. En este aspecto, cabe destacar la frecuencia y gravedad de la nefrotoxicidad, tanto aguda como crónica. Otros efectos tóxicos descritos, aunque aparecen con menor frecuencia, son: alteraciones nerviosas como, parestesias, somnolencia, estupor e incluso coma; alteraciones hepáticas como, aumento de las transaminasas, colestasis y listiasis biliar; alteraciones endocrinas como, incremento de la secreción de prolactina (Ginecomastias), disminución de la espermatogénesis (infertilidad), hiperglucemia; alteraciones gastrointestinales como, anorexia, vómitos; y otras alteraciones como, hiperplasia gingival, hipertrichosis e hipertensión. Todos ellos, a excepción de la hipertensión, desaparecen al disminuir la dosis o suspender el tratamiento ^{5,10,165}.

3º- Es frecuente la interacción con otros fármacos, que pueden aumentar o disminuir los niveles de CsA en sangre o bien aumentar su toxicidad por adición de sus efectos. Aspecto que veremos mas adelante.

No obstante, por lo general, tanto la toxicidad como la ausencia de acción terapéutica, se asocian, respectivamente, con altos y bajos niveles de CsA en sangre. Por ello, desde que se comenzó a utilizar la CsA en la practica clínica, quedo patente la necesidad de su monitorización terapéutica rutinaria (MT) ^{9,95,97,166,167}.

Hasta hace unos años, los estudios tanto clínicos como farmacocinéticos se venían haciendo indistintamente en plasma, suero o sangre completa, y las mediciones se realizaban con una amplia gama de técnicas analíticas que frecuentemente, median conjuntamente el fármaco inalterado y una cantidad indeterminada de sus metabolitos. Esta heterogeneidad en el origen de los resultados dificulta la interpretación de las cifras obtenidas y crea confusión a la hora de compararlos e interpretarlos, por ello los aspectos más polémicos de la MT de la CsA como son: decidir la técnica analítica más adecuada para medirla; el tipo de muestra que conviene utilizar; y la importancia que tienen los metabolitos en la acción terapéutica o tóxica del fármaco, se han resuelto mediante consenso, unificándose los criterios seguidos en la MT para permitir la comparación de los resultados ¹⁶⁸⁻¹⁷¹.

I.4.1. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

La química analítica ha puesto a disposición del clínico numerosas técnicas para determinar los niveles de CsA en diferentes tipos de muestras. Cuando se mide la concentración de CsA, los resultados varían sensiblemente según la utilizada. Por ello, es necesario tener un buen conocimiento de las características de cada una de estas técnicas y las diferencias cuantitativas y cualitativas que el uso de una u otra conlleva.

I.4.1.a. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Fue el primer método adoptado para la cuantificación específica del fármaco ⁹⁵. Actualmente, también se pueden determinar específicamente con él algunos de los metabolitos de la CsA ¹⁷²⁻¹⁷⁴.

No obstante, las propiedades fisicoquímicas de la CsA no son las más apropiadas para las particularidades técnicas de la HPLC ⁹. Ello hace que su realización sea laboriosa y complicada por las dos siguientes razones:

1º- La escasez de cromóforos de la molécula de CsA obliga a utilizar volúmenes relativamente grandes de muestra (0,5 a 1 mL) y longitudes de onda ultravioleta muy bajas (la máxima absorción de la CsA está en

214 nm). Como esas longitudes son poco selectivas, las muestras tienen que someterse previamente a procesos que eliminen las impurezas que interfieren la medición. Aunque se ha conseguido amplificar la sensibilidad cromatográfica de la CsA mediante la incorporación de un determinado radical, los reactivos necesarios para realizarla no están disponibles comercialmente.

2º- La elevada liposolubilidad de la molécula dificulta su extracción de las muestras (especialmente de la sangre completa) y hace que los procedimientos empleados sean de eficacia variable. Esta variabilidad obliga a usar un estándar interno que sirva de referencia en las determinaciones.

A) Metodología e instrumental

Al método original ¹⁷⁵ se le han hecho modificaciones que facilitan la extracción, aumentan la resolución, o simplifican el aparataje para la determinación de la CsA. Todas las variantes tienen una serie de pasos comunes, que son los siguientes:

a) Preparación de la muestra

Cuando se utiliza sangre completa, las muestras son pretratadas para provocar la lisis del eritrocito. La solución del estándar interno, generalmente CsD ó CsA, se prepara disolviendo el compuesto en metanol o acetonitrilo. A la muestra a determinar se le añade una cierta cantidad del estándar interno, y queda lista para el paso siguiente.

b) Extracción de la CsA

Se han desarrollado algunos procedimientos, que se pueden agrupar en dos: los que utilizan para la extracción sólo disolventes orgánicos (procedimientos líquido-líquido), y los que emplean columnas sólidas en las que la muestra va siendo lavada con diferentes disolventes orgánicos (procedimientos líquido-sólido).

En los primeros se utiliza sobre todo el éter como disolvente, porque el extracto obtenido contiene pocas sustancias que puedan producir interferencias, o bien el metil-butyl-éter, que tiene una mayor resolución. Tanto con uno como con otro los compuestos con absorbancia por debajo de los 210 nm pueden co-extraerse con la CsA, y para eliminarlos es necesario realizar un lavado ácido básico. Otros disolventes utilizados en este tipo de procedimiento son el hexano y el heptano, con los que no aparece el lípido neutro que se encuentra cuando se usan los éteres.

Los porcentajes de extracción con el procedimiento líquido-líquido son altos: entre el 75% y el 96% en plasma, y superiores al 90% en sangre completa ¹⁷⁵⁻¹⁸⁰.

En el procedimiento líquido-sólido las columnas utilizadas deben de ser previamente acondicionadas, mediante el paso por ellas de disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, etc.) y posterior lavado con agua. Las muestras, con el estándar interno ya incorporado, se inyectan directamente en ellas o son previamente sometidas a un proceso de purificación (adición de metanol y centrifugado posterior); en este último caso lo que se inyecta es el sobrenadante. Posteriormente se pasan por la columna disolventes orgánicos y agua para eliminar las impurezas. La eficacia de extracción es similar al del método líquido-líquido, con la ventaja de ser más cómodo y el inconveniente de ser relativamente caro, pues las columnas son de un solo uso y las que no lo son terminan obstruyéndose por las proteínas precipitadas ^{9,181,182}.

c) Medición cromatográfica

El cromatógrafo consta básicamente de: recipiente para la fase móvil, que incluye bomba inyectora; columna cromatográfica, en ocasiones precedida de una precolumna para protegerla de las impurezas; detector

de longitud de onda, variable entre 202 y 220 nm; sistema de registro; y microprocesador que regula, automatiza e integra el conjunto.

La fase móvil ésta constituida por la combinación, en diferentes proporciones, de distintos compuestos (agua, metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano, heptano, isopropanolol, etc.); las mas utilizadas son: acetonitrilo/agua, metanol/agua y acetonitrilo/metanol/agua . El metanol estrecha los *picos* gráficos obtenidos, pero su absorbancia por debajo de los 215 nm restringe mucho su uso.

Los tipos de columnas que se utilizan son muy variados, con longitudes entre 10 y 30 cm y diámetros entre 3,4 y 6 mm. El tamaño de sus partículas es de 5 μm , aunque hay algunas con partículas de 10 μm .

El método para obtener el eluido puede ser contra gradiente o, más frecuentemente, de forma isocrática. El tiempo de retención está alrededor de 10-20 minutos, aunque cuando se utilizan fases líquidas-líquidas es algo mayor.

Las columnas se mantienen entre 50 y 70C° de temperatura, porque a la temperatura ambiente los *picos* que se obtienen son muy amplios (poco específicos). Estas temperaturas, relativamente altas, reducen la vida útil de las columnas ^{166,183}.

d) Columnas swintching

Es un sistema de columnas más complejo: tiene hasta 6 recipientes para la fase móvil, 2 bombas inyectoras y, al menos, 3 columnas con 2 válvulas de paso independientes (una para la columna de medición y otra para las demás). Los procesos de extracción, secado y medición cromatográfica, se realizan dentro de un único aparato. En él se encuentran un número de columnas situadas en serie, que trabajan de una manera secuencial e integrada. Las muestras, previa desproteinización por centrifugado, son introducidas en el aparato y automáticamente procesadas. El procedimiento utilizado para la extracción es el líquido-sólido ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

Las principales ventajas de utilizar estas columnas son: cómodas de usar, necesitan poca cantidad de muestra, tienen un límite inferior de detección muy bajo y su eficacia de extracción es del 100%. Su único inconveniente es el elevado precio.

B) Ventajas e inconvenientes de la HPLC

La HPLC es el método más exacto para determinar de forma específica la CsA. Su límite inferior de sensibilidad está entre 25 y 100 ng/mL y la linealidad se mantiene hasta 4.000 ng/mL como mínimo.

Su principal desventaja estriba en su complejidad, requiriendo una considerable experiencia en el laboratorio para su realización. Prueba de ello es que en los controles de calidad, la variabilidad entre centros es mayor que la de otros métodos. Además es lento, porque el tiempo de extracción es largo; y también es caro, por el rápido deterioro de las columnas dadas las altas temperaturas a las que tienen que trabajar.

En la actualidad este método no se recomienda para uso rutinario en la monitorización clínica de la CsA, reservándolo para cuando surgen problemas graves en la absorción ó metabolismo del fármaco y, para la investigación, no obstante hay que resaltar que sigue siendo la técnica de referencia para las determinaciones del fármaco inalterado ^{169,187,188}.

I.4.1.b. Radioinmunoanálisis (RIA).

Como cualquier inmunoanálisis, el RIA mide la concentración de CsA basándose en la competitividad de la unión antígeno-anticuerpo. Se basa, en que si a una muestra con una concentración desconocida del CsA se le añade una concentración conocida de CsA marcada y posteriormente se enfrenta a anticuerpos específicos (que también se añaden a la muestra), la cantidad de CsA marcada que se une a los

anticuerpos es inversamente proporcional a la cantidad de CsA no marcada que contiene la muestra. Por eso, midiendo la CsA marcada que queda sin unir, se puede determinar la que hay sin marcar.

Cronológicamente, el RIA ha sido el primer método desarrollado para la medición de la CsA. Los distintos RIAs para CsA que se han utilizado, difieren entre sí por el tipo de antisuero (anticuerpos específicos) y/o el isótopo radiactivo utilizado para el marcado. Atendiendo al tipo de antisuero se puede hablar de dos RIAs bien diferenciados: los policlonales y los monoclonales.

A) Policlonales.

A pesar de que los RIAs policlonales han dejado de comercializarse, existe un número muy importante de estudios clínicos y farmacológicos realizados con ellos que hace necesario su conocimiento.

El primer RIA policlonal para la CsA, fue desarrollado por el laboratorio farmacéutico Sandoz, el antisuero se obtuvo de conejos sensibilizados con un conjugado de Ciclosporina C y proteínas IgG, como marcador se utilizó la dihidrociclosporina marcada con tritio ($[^3\text{H}]$ - CsA). La técnica es laboriosa y lenta, pero con la ventaja de

necesitar poca cantidad de muestra (5 mL). Tiene una sensibilidad de 20 ng/mL, linealidad entre 130 y 600 ng/mL, y coeficiente de variación del 24%. Su principal problema es la falta de especificidad para la molécula inalterada. La reactividad cruzada con su metabolito mas abundante, el M17, con respecto a la CsA inalterada, es del 60%. El antisuero se sustituyó por otro obtenido de ovejas, con el que se redujo al 32% la reactividad cruzada con éste metabolito.

Mediante la yodación del resto aminoácido 1 de la CsA con el isótopo radiactivo [I125], se obtuvo el marcador [I125]- CsA. Este marcador se comercializo por Inmuno Nuclear Corporation (INC). Utilizando como antisuero el del RIA Policlonal de Sandoz obtenido de ovejas se obtiene una curva estándar paralela a la obtenida con [H3]- CsA (**Figura 5**), aunque de menor altura (menos unión antígeno-anticuerpo). La yodación se hace en un sitio altamente antigénico de la molécula de CsA, de hay que la afinidad de los anticuerpos por el [I125]- CsA sea menor que por el [H3]- CsA y, en consecuencia las concentraciones medidas con el yodotrazador (utilizando sólo CsA inalterada) son un 15% mayores que con el tritio, con un coeficiente de correlación del 0,98 y coeficiente de variación del 9,4% .

El isótopo radiactivo [125-I]- Histamina, también se ha utilizado para marcar la CsA, uniéndolo al resto aminoácido 2 del fármaco, aunque no

se comercializo. Utilizando este marcador y el antisuero del RIA Policlonal de Sandoz, se obtiene una curva estándar en la que los anticuerpos muestran una afinidad mucho mayor que por los otros dos marcadores (*Figura 5*). Esto se traduce en una alta sensibilidad (mide entre 100 y 106% de las concentraciones esperadas), manteniendo además una alta precisión (coeficiente de variación del 10%), y un coeficiente de correlación con respecto al [H3]- CsA, del 0,975.

El uso del [H3]- CsA como radiomarcador tiene dos problemas importantes: por una parte, la poca estabilidad y duración del marcador; y, por otra, que utiliza líquido escintilador para su medición. El uso del [125]- CsA como marcador, da mayor precisión a la medición, y es más estable y duradero que el [H3]- CsA (se puede almacenar hasta seis meses a 20C°); a ello hay que añadir la ventaja de poder utilizar contadores gamma, que evitan el uso de líquido escintilador para su medición. El [125-I]- Histamina tiene la ventaja adicional sobre el otro trazador yodado ([125]- CsA) de su alta sensibilidad, que permite diluir el antisuero suministrado en el RIA Policlonal Sandoz, con el ahorro que esto supone.

La reactividad cruzada de los tres marcadores estudiados, no es superponible, porque cada uno tiene distinta sensibilidad para los diferentes metabolitos. Con cualquiera de los marcadores, la

concentración que se mide de CsA sin alterar, es la misma, en cambio la de cada metabolito es diferente, según el marcador que se utilice. En concreto, la sobreestimación de la concentración de CsA que se obtiene cuando se utiliza el marcador [I125], se debe exclusivamente a que éste tiene mayor sensibilidad por los metabolitos de la CsA, que los otros dos (**Figura 6**)^{9,189-191}.

a) RIAs Policlonales comercializados.

Se han comercializado dos RIAs policlonales: el *Policlonal RIA Kit Cyclosporin*® de Sandoz, que utiliza el marcador [H3]- CsA, antisuero procedente de ovejas, y separa el fármaco unido del no unido por suspensión en carbón y posterior centrifugado; y el *Cyclo-Trac*® de Incstar, que utiliza el marcador [I-125]- CsA, antisuero obtenido de conejos, y para la separación usa un segundo anticuerpo.

Ambos RIAs policlonales proporcionan cifras 2-4 veces mayores que la obtenida por HPLC, debido a la reactividad cruzada con los metabolitos. Esta diferencia llega a ser mucho mayor durante las primeras semanas después de un trasplante de hígado, o en el transcurso de alteraciones hepáticas que afecten al citocromo P₄₅₀ ó a la eliminación de la bilis; en cualquier caso, esta cifra es muy variable tanto ínter como intraindividualmente.

Los estudios comparativos entre el *Cyclo-Trac* y el *RIA Policlonal de Sandoz* han demostrado que existe una buena correlación entre ellos, aunque el primero tiene mayor precisión (coeficientes de variación <9'3 y 24'3 respectivamente); sin embargo, su linealidad sólo se mantiene hasta 1000 m/mL para el *Cyclo-Trac*, mientras que el *RIA Policlonal de Sandoz* la mantiene por encima de los 1500 m/mL. En cambio, la reactividad cruzada de ambos no es superponible (**Figura 7**)^{9.95.192-195}.

El antisuero policlonal ha dejado de usarse y en la actualidad no se comercializa debido a su escasa especificidad, falta de uniformidad y reactividad cruzada entre los diferentes lotes. Las modificaciones de la respuesta que el animal tratado presenta durante la inmunización, y la mezcla de sueros provenientes de diferentes animales en un mismo lote, son la causa de estas diferencias.

B) Monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos del ratón. Estos anticuerpos, además de su capacidad para diferenciar pequeñas alteraciones en la molécula de CsA, tienen una buena uniformidad interlotes.

El anticuerpo monoclonal MAbs1 interacciona con los residuos aminoácidos 1, 6 y 9 de la CsA, y algo menos con el 4. La concentración de metabolito M17 (que tiene alterado el residuo aminoácido 1) necesaria para inhibir el 50% de la unión CsA-MAbs1, es 150 veces la concentración de CsA. Los metabolitos con más de un residuo aminoácido modificado (M18, M25 y M26), necesitan concentraciones de hasta 300 veces la de la CsA para conseguir el mismo efecto. La elevada afinidad del anticuerpo monoclonal MAbs1 por la CsA con respecto a sus metabolitos hace que a los antiseros que lo contienen se les denomine antiseros específicos.

El anticuerpo monoclonal MAbs2 sólo interacciona con el residuo aminoácido 4 y débilmente con los del 1 y el 9. La concentración necesaria de la mayoría de los metabolitos para inhibir el 50% de la unión CsA-MAbs2, es la misma que la de CsA. Los metabolitos M21 y el M26 (que tienen modificado el residuo aminoácido 4), necesitan concentraciones 3-4 veces la de la CsA para obtener el mismo efecto. El que la afinidad del MAbs2 por la CsA sea prácticamente la misma que por la mayoría de sus metabolitos hace que a los antiseros que lo contienen se les denomine antiseros inespecíficos (*Tabla I*)¹⁹⁶.

a) RIAs Monoclonales comercializados.

Los antisueros específico e inespecífico de este tipo han sido comercializados en un mismo Kit, con el nombre de *Sandimmune RIA Kit* ®. Utiliza el mismo marcador [H3]- CsA e idéntico sistema de separación (carbón) que el RIA Policlonal de la misma casa. Por su parte, la firma Inestar Int. comercializo con el nombre de *Cyclo-Trac SP* ® un RIA basado en el mismo antisuero específico, con el [125I]- CsA como marcador y el sistema de doble anticuerpo como separador.

La curva de calibración del *Sandimmune RIA* ® con antisuero específico abarca desde 25 a 1600 ng/mL, con linealidad entre 100 y 1000 ng/mL, y con unos coeficientes de variación intra e interanálisis menores del 7% . Las concentraciones de CsA medidas en sangre total por este RIA tienen una buena correlación con las obtenidas por HPLC, tanto en sanos tras dosis única como en trasplantados (de riñón, médula ósea, hígado y corazón) que toman el fármaco crónicamente. El cociente RIA/HPLC en estos trasplantados se mantiene alrededor de 1, y no varía con el tiempo. Cuando la concentración de CsA es inferior a 100 ng/mL tiende a sobrestimarla, lo que supone un problema en politerapia donde las dosis empleadas de CsA son pequeñas. Por el contrario, tiene

tendencia a infraestimar la concentración de CsA cuando ésta es mayor de 600 ng/mL.

La curva de calibración del *Cyclo-Trac SP* ® es semejante a la de *Sandimmune RIA* ® específico, y mantiene la linealidad entre 50 y 1000 ng/mL. Las concentraciones medidas por ambos guardan una buena correlación, aunque las medidas con *Cyclo-Trac SP* ® son aproximadamente un 10% mayores y tiene la ventaja adicional de no necesitar liquido escintilador para su medición.

El *Sandimmune RIA* ® con antisuero inespecífico tiene reacción cruzada con diferentes metabolitos de la ciclosporina y, en consecuencia, un alto y variable cociente de concentración RIA/HPLC. Usando sangre total como muestra, las concentraciones son 3-5 veces mayores que las obtenidas con HPLC, y unas 3 veces superiores que con el antisuero específico; las cifras más altas se obtienen en trasplantados de corazón e hígado, sobre todo en los primeros días después del trasplante. Las concentraciones medidas con el RIA monoclonal inespecífico son hasta 140 % mayores que las obtenidas con el RIA policlonal, por la mayor reactividad cruzada con los metabolitos que tiene el primero ¹⁹⁷⁻²⁰³.

En la actualidad sólo se comercializa el *Cyclo-Trac SP* ® que, además de no necesitar liquido escintilador, es de técnica mas simple y rápida que el *Sandimmune RIA* ®. No obstante, la necesidad de manipular

compuestos radioactivos hace que esta técnica no esté al alcance de muchos laboratorios y sea poco utilizada para la monitorización rutinaria de la CsA ^{166,167,204}.

I.4.1.c. Inmunoanálisis de polarización fluorescente (FPIA).

Al igual que el RIA, se basa en la competitividad de la unión antígeno-anticuerpo: un derivado fluorescente de la CsA (trazador) es atravesado por un haz de luz polarizada y emite una fluorescencia que es inversamente proporcional a su cociente de rotación. El cociente de rotación del trazador unido al anticuerpo es menor que el del trazador solo, por lo que a mayor cantidad de CsA contenida en la muestra, menor es la fluorescencia que emite, después que se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo.

La concentración se determina por comparación de la fluorescencia medida en la muestra con la de una curva de calibración, obtenida previamente con muestras que contienen una concentración conocida (calibradores). Esta curva conviene repetirla con cierta frecuencia porque se va desfasando con el tiempo, probablemente por deterioro de los reactivos.

Las muestras son pretratadas antes de analizarlas para precipitar las proteínas endógenas que se pueden unir a los compuestos fluorescentes e interferir los resultados. Es conveniente introducir siempre, en cada ensayo, una muestra con una concentración conocida (controles), para comprobar que las mediciones son correctas.

La mezcla de los reactivos con la muestra, la medida de la fluorescencia emitida y la determinación de la concentración de CsA se realiza de forma automática en el analizador *TDx*® de Abbott^{205,206}.

A) FPIA comercializados.

Se han comercializado dos FPIA que pueden llevarse a cabo mediante el analizador *TDx*® de Abbott: uno inespecífico, *TDx Ciclosporina y Metabolitos*®, que utiliza anticuerpos policlonales obtenidos de conejo; y otro específico, *TDx Ciclosporina*®, que utiliza anticuerpos monoclonales del mismo animal.

El FPIA inespecífico sobrevalora en 3-4 veces la concentración de CsA medida con la HPLC, debido a la reactividad cruzada con algunos de los metabolitos de la CsA. Se correlacionan bien con *RIA Policlonal de Sandoz*® y con los RIAs Monoclonales inespecíficos, aunque las concentraciones medidas con el *TDx*® son superiores.

El FPIA específico tiene una excelente reproducibilidad, mejor que las del RIA y de la HPLC. Su coeficiente de variación es menor del 5%, y su linealidad está comprendida entre 25 y 1000 µl. Las concentraciones de CsA medidas en sangre completa con este método se correlacionan bien con las del RIA monoclonal específico y de la HPLC, aunque tiende a sobrevalorarlas porque presenta reactividad cruzada con los metabolitos M17 (8%) y M21 (2,5%) de la CsA.

Las mayores ventajas del FPIA sobre el RIA son: simpleza, automatismo, rapidez de procesamiento de las muestras y ausencia de radiactividad; ello explica que sea muy utilizado para la monitorización rutinaria de la CsA ^{166.167.207-212}.

I.4.1.d. Inmunoanálisis enzimático múltiple (EMIT)

Ha sido el último inmunoanálisis introducido para medir de forma específica la CsA. Utiliza un antisuero monoclonal obtenido del ratón. Todo el proceso de medición se realiza de forma automática y rápida (40 muestras a la hora) en el analizador *CobasMira*® de Roche.

Las concentraciones de CsA medidas con esta técnica se correlacionan bien con las del RIA monoclonal específico y las de la HPLC, aunque tiende a sobrevalorarlas (eso sí, menos que el *TDx*®) por la reactividad

cruzada, poco significativa, con algunos metabolitos de la CsA. Aún se tiene poca experiencia con este inmunoanálisis ^{167,213}.

I.4.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS.

La concentración de CsA medida en sangre total a 37°C , por cualquiera de las técnicas antes descritas, es tres veces superior a la del plasma. A 20°C esta diferencia es de cuatro veces y media, porque a esa temperatura la concentración de CsA dentro del eritrocito aumenta hasta un 50% respecto a la que contiene a 37°C. Si se mantiene la temperatura constante, se comprueba que la relación entre las concentraciones en sangre total y plasma es muy baja, y además sufre grandes variaciones intra e interindividuales. La principal causa de estas variaciones son los amplios y constantes cambios que ocurren en el número de hematíes durante los periodos postrasplante. La saturación del hematocrito a partir de la concentración de los 500 ng/mL de CsA explica que la variación sea mayor a bajas concentraciones, dada la mayor afinidad del eritrocito por la CsA que por las proteínas plasmáticas y que estas variaciones sean menores a altas concentraciones

120.121.128.133-137.

Es difícil decidir si las muestras de plasma o de sangre total son la más adecuada para medir las concentraciones de CsA; se ha llegado al consenso que es mejor la sangre completa fundamentalmente por dos factores:

1º- La gran cantidad de CsA sin metabolizar que se encuentra dentro del hematíe (aproximadamente el 60% de la total a temperatura fisiológica de 37° C); además, a dicha temperatura el 90% del metabolito M17 (el metabolito con más actividad de la CsA) se encuentra dentro del eritrocito, al igual que la mayor parte de los otros metabolitos 119-151.

2º- La buena reproducibilidad, debido a la falta de influencia sobre ella de la temperatura y el hematocrito.

I.4.3. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS METABOLITOS.

Los metabolitos primarios de la CsA en el hombre son el M17 y el M21, y los secundarios el M8, el M10 y el M16. Después de una dosis oral de CsA, el 50 % de la concentración bajo la curva (AUC) en el plasma corresponde a la CsA no metabolizada, el 15% al metabolito M17 y el resto (en proporciones del 3% al 7%) a los demás metabolitos. El 27 % de la concentración bajo la curva (AUC) en la sangre completa

corresponde a la CsA no metabolizada y el 24% al metabolito M17. Esto es debido a que la mayor proporción de los metabolitos, en especial del M17, se encuentra dentro de las células sanguíneas ^{16,17,214}.

La mayor parte de los metabolitos primarios y secundarios tienen actividad inmunosupresora, aunque menor que la de la CsA. El más activo es el metabolito M17 que presenta *in vitro* una actividad del 10 al 80% de la CsA. Dicha actividad es especialmente alta en la inhibición de la reacción de mezcla linfocitaria (MLR) y en la inhibición de la producción de IL-2, sobre todo a dosis altas; no obstante se desconoce el grado de su actividad *in vivo*. Se ha demostrado que la nefrotoxicidad del metabolito M17 es prácticamente nula; solo el M21 ha mostrado cierto potencial nefrotóxico, aunque menor que la CsA ²¹⁵⁻²¹⁸.

En conclusión: Las capacidades inmunosupresora y nefrotóxica de los metabolitos no están interrelacionadas, y ambas son menores que la de la CsA original. Dada la dificultad de interpretación del valor inmunosupresor o nefrotóxico de los metabolitos, y su escasa repercusión en el efecto del fármaco, se acepta que la monitorización terapéutica de la CsA debe de realizarse con métodos específicos para el fármaco inalterado ^{167,219}

I.4.4. MONITORIZACIÓN DE LA CsA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Como se ha dicho al principio de este capítulo, la MT de la CsA es imprescindible en la práctica clínica. En los pacientes trasplantados se debe mantenerse mientras estén tomando el fármaco. Sin embargo, en los demás pacientes (enfermedades autoinmunes y otras que no impliquen trasplante) la monitorización no está indicada más allá del período inicial del tratamiento, excepto en circunstancias especiales mientras estas persistan (complicaciones, farmacocinética inusual o sospecha de interacción farmacológicas) ^{167,220}.

Para realizarla se han utilizado diversos parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos.

I.4.4.a. Parámetros farmacocinéticos

A) Concentración mínima (Cm)

Es el sistema más utilizado para evaluar la eficacia terapéutica de la CsA, y consiste en medir la concentración sanguínea predosis, es decir, 12 ó 24 horas después de la última dosis, según se de una o dos veces al día, respectivamente. La frecuencia de la medición de la Cm de CsA

varía con el tiempo. Inmediatamente después de un trasplante la concentración de CsA debe hacerse 3 veces a la semana, durante los 2-3 primeros meses; en trasplantes de hígado o corazón la frecuencia debe ser mayor. Después, la medición de la CsA pueden reducirse a 1-2 veces al mes, salvo deterioro funcional del trasplante ^{166,171}.

En términos generales, la incidencia del rechazo de un trasplante es elevada a baja C_m , mientras la toxicidad ocurre a C_m alta; por ello, mantener la concentración sanguínea de CsA dentro de unos límites tiene el beneficio clínico de reducir los efectos adversos y aumentar la duración del injerto. No obstante, es difícil establecer el rango terapéutico de la CsA porque varía, ínter e intraindividualmente, en función de una serie de factores: tipo de trasplante, tiempo del mismo, interacciones farmacológicas, variaciones farmacocinéticas, etc. Además, en algunos pacientes se solapan las concentraciones terapéuticas y tóxicas. La concentración (medida en sangre total y con métodos específicos) que se recomienda mantener durante los primeros meses es de 150 a 250 ng/mL; en los pacientes con trasplante de hígado o corazón debe ser algo mayor. Como la concentración eficaz disminuye con el tiempo postrasplante, la dosis debe bajarse de forma progresiva a partir del 2º-3º mes; a partir del año es suficiente mantener la concentración sanguínea entre 75-150 ng/mL ^{9,166,168,170,221-229}.

Para hacer una correcta interpretación de las concentraciones obtenidas, hay que tener en cuenta dos cosas: que el estado de equilibrio después de un cambio de dosis se alcanza a los 2 días (en trasplantados de hígado el período es más largo); y que la C_m depende del número de dosis diarias (con 3 dosis al día se obtiene una C_m un 40% mayor que con 2 dosis) ^{166,230}.

B) Área bajo la curva de concentración-tiempo (AUC)

Tiene como objetivo medir la exposición del paciente al fármaco a lo largo del tiempo. Se ha comprobado que dicha exposición se correlaciona con la dosis recibida mejor que la C_m y puede resultar más útil ^{231,232}.

Para determinar el AUC se hacen frecuentes mediciones de la concentración sanguínea entre cada dosis, lo que supone un serio inconveniente en pacientes con una precaria salud. Para disminuir este inconveniente se han diseñado sistemas de cálculo de la misma (mediante ecuaciones bayesianas) utilizando solo 3 muestras entre dosis. A pesar de ello, el número de muestras necesarias para la MT a través de la AUC sigue siendo excesiva para su uso rutinario y se reserva para aquellos pacientes con graves trastornos farmacocinéticos ^{167,170,224,227,233,234}.

C) Monitorización de la concentración media (Cav).

Se obtiene dividiendo el AUC por el tiempo transcurrido entre dosis. Su monitorización, además de los inconvenientes derivados de la determinación del AUC, no ha demostrado ser mejor parámetro que la C_m para determinar el rango terapéutico de la CsA, ni tiene mayor capacidad que ésta para predecir el rechazo del órgano o los efectos adversos del fármaco ^{167,170}.

En resumen, la ciclosporina se distribuye ampliamente por los tejidos y alcanza en ellos concentraciones altas comparadas con las de la sangre; además, las dosis pueden tener efectos acumulativos que no se reflejan en la concentración sanguínea, lo que explica que los parámetros farmacocinéticos basados en éstas no reflejen bien lo que ocurre en el punto de acción. De ahí el relativo fracaso de los métodos basados en tales parámetros para evaluar el tratamiento con este fármaco, y la necesidad de utilizar otros parámetros analíticos y clínicos.

I.4.4.b. Parámetros farmacodinámicos.

El tiempo que transcurre entre la presencia de la CsA en la sangre y sus efectos tóxico o inmunosupresor es desconocido, aunque es

predecible la variabilidad en la relación concentración/efectos entre pacientes. Ello justifica la necesidad de desarrollar pruebas capaces de medir la actividad biológica del fármaco ^{166,170,235}.

Como los mecanismos de acción de la CsA no están totalmente definidos, es difícil determinar que prueba permitiría la monitorización directa de la respuesta inmune. Las dos vías más utilizadas para medir la inmunosupresión han sido el estudio de la activación de las células T y el de la unión al receptor específico de la CsA.

A) Activación de las células T.

La presencia de moléculas extrañas al organismo (como son los trasplantes) provoca la activación de los linfocitos T citotóxicos, que atacan a dichas moléculas. Para que estos linfocitos se activen son necesarios dos procesos: la producción de interleuquina 2 (IL-2) por parte de los linfocitos T-Helper (facilitadores) y la producción de receptores de la IL-2 (IL-2R) por parte de los linfocitos precitotóxicos. La CsA actúa inhibiendo ambos procesos ²³⁶.

Los pacientes con trasplante renal tratados con CsA tienen una marcada disminución de la IL-2 una semana después de iniciado el tratamiento, que se mantienen baja 6 meses. Sin embargo, si hay

rechazo al injerto la IL-2 es semejante a la de individuos sanos no tratados ^{237,238}.

La IL-2 no es detectable en la orina de trasplantados renales tratados con CsA, mientras están estables o presentan síntomas de toxicidad; tampoco lo es en individuos sanos que no toman el fármaco. En cambio, los pacientes con rechazo del injerto renal o con infecciones por citomegalovirus tienen una alta excreción urinaria de IL-2 ²³⁹.

Los pacientes con trasplante hepático tratados con CsA tienen concentraciones plasmáticas y biliares de IL-2 semejantes a las de los individuos sanos no tratados. Si se produce el rechazo del injerto las concentraciones anteriores se incrementan. En estos trasplantados no se ha detectado IL-2 en la orina en la fase estable, ni durante los episodios de rechazo ²⁴⁰.

Por otro lado, los trasplantados renales tratados con CsA que sufren un rechazo o una infección por citomegalovirus, tienen concentraciones plasmáticas más altas del IL-2R que los individuos sanos sin tratamiento, que los trasplantados renales estables, o que los que presentan toxicidad por CsA ²⁴¹.

Estos hechos sugieren que la medición de la concentración de IL-2 en la orina o en la bilis, o la de su receptor en el plasma, permite

diagnosticar precozmente un fracaso inmunosupresor en los trasplantados renales o hepáticos respectivamente. Conviene aclarar que la medición de la IL-2 es lenta, aproximadamente 72 horas, y se precisa entre 24 y 96 horas para que se comience a producir la IL-2 después de ocurrir el fracaso inmunosupresor. La medición de la IL-2R es más rápida ^{167,238}.

B) Unión al receptor específico (ciclofilina).

La CsA se une con gran afinidad a un receptor específico intracelular denominado ciclofilina ; los residuos aminoácidos implicados en esta unión CsA-ciclofilina son los mismos que los implicados en su actividad inmunosupresora, de ahí que también se unan a la ciclofilina los metabolitos de la CsA con actividad inmunosupresora. Por tanto, se puede detectar la concentración conjunta de CsA y sus metabolitos activos mediante un análisis de competitividad de la unión CsA-ciclofilina; el límite de detección de este análisis es de 50 mg/L ⁶⁵⁻⁶⁸.

No obstante, se ha demostrado que no todos los metabolitos que se unen a la ciclofilina son activos, por lo que su valor para determinar la actividad inmunosupresora es relativa ^{242,243}.

I.4.5. INTERACCIONES FARMACOLÓGICAS.

I.4.5.a. Fármacos que alteran los niveles sanguíneos de CsA.

A) Que disminuyen los niveles sanguíneos de CsA.

Fenitoina: Disminuye la absorción de CsA al reducir la producción de bilis y además, aumenta el aclaramiento hepático de la CsA por aumento de actividad de los isoenzimas hepáticos ²⁴⁴.

Fenobarbital: tiene un efecto semejante a la Fenitoina ²⁴⁵.

Rifampicina: Aumenta el aclaramiento de la CsA por aumento de la actividad de los isoenzimas hepáticos ^{246,247}.

Rifabutín: Igual que el anterior, aunque sus efectos, en general, son menos apreciables ^{247,248}.

B) Que aumentan los niveles sanguíneos de CsA.

Eritromicina: Aumenta la absorción de CsA por causas no aclaradas y disminuye su aclaramiento hepático porque compite con está por los isoenzimas hepáticos, que además, muestran mayor afinidad por la eritromicina que por la CsA ^{249,250}.

Claritromicina y Josamicina: también disminuyen el aclaramiento hepático de CsA, por el mismo motivo que la eritromicina^{251,252}.

Ketoconazol: Disminuye el aclaramiento hepático de la CsA por inhibición de los isoenzimas hepáticos, provocando un rápido incremento de los niveles de CsA²⁵³.

Fluconazol e Intraconazol: Sus efectos son semejantes al Ketoconazol, no obstante, la respuesta de los pacientes es individualizada y en algunos no tienen efectos significativos^{254,255}.

Metoclopramida: Aumenta la absorción de CsA porque acelera el vaciado gástrico²⁵⁶.

Alopurinol: Impide el aclaramiento de la CsA porque inhibe la acción de las isoenzimas hepáticas, dando lugar a grave toxicidad²⁵⁷.

Calcioantagonistas: Disminuyen el aclaramiento de CsA por disminución de la función de los isoenzimas hepáticos secundario al bloqueo de los canales de calcio²⁵⁸.

Contraceptivos orales: Aumentan la absorción de CsA y disminuyen su aclaramiento hepático por inhibición de las isoenzimas hepáticas²⁵⁹.

C) Con acción variable sobre los niveles.

Antihiperlipemiantes: Cuando se administran simultáneamente con la CsA, los efectos sobre esta son difíciles de predecir, ya que producen alteraciones en su distribución por los cambios cualitativos y cuantitativos que inducen en las proteínas plasmáticas. El Probucol además disminuyen la absorción de la CsA por los cambios que introducen en la composición de la bilis. La administración simultánea de más de uno de ellos con la CsA, suele acompañarse de severos efectos tóxicos de esta ²⁶⁰.

I.4.5.b. Fármacos que aumentan la nefrotoxicidad.

Antiinflamatorios no esteroideos: Por inhibición del efecto protector de las prostaglandinas sobre el riñón ²⁶¹.

Aminoglucosidos, Quinolonas, Anfotericina B, Acyclovir y Cotrimoxazol: Por potenciación de sus efectos nefrotóxicos ²⁶².

Inhibidores de la Angiotensina: Por causas desconocidas ²⁶².

I.4.5.c. Otras interacciones.

El uso de CsA aumenta el riesgo de intoxicación digital, y favorece la resistencia a los antineoplásicos ²⁶².

I.4.6. UNIFICACIÓN DE CRITERIOS.

Con objeto de poder comparar los resultados obtenidos en la monitorización terapéutica de la CsA en los diferentes centros que la realizan, se ha recomendado lo siguiente ^{168,170,223}.

- 1º Efectuar la determinación en sangre total.
- 2º Utilizar EDTA como anticoagulante.
- 3º Tomar la muestra preferentemente en predosis.
- 4º Emplear reactivos específico para la CsA no metabolizada.
- 5º Participar en programas de calidad y control de los análisis.

I.5. GRAFICOS Y TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN

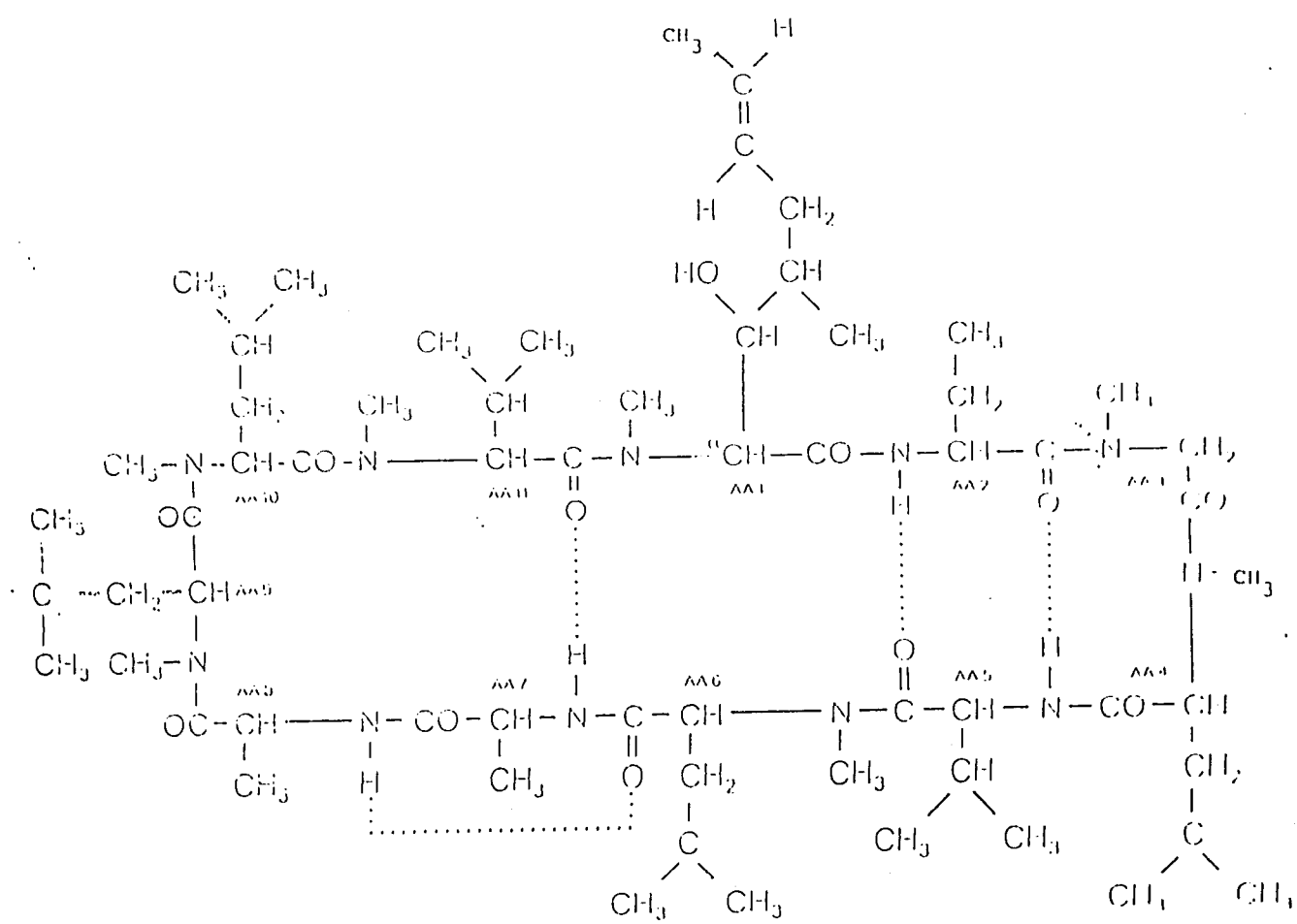


Figura 1.- Representación esquemática de la estructura de la CsA.

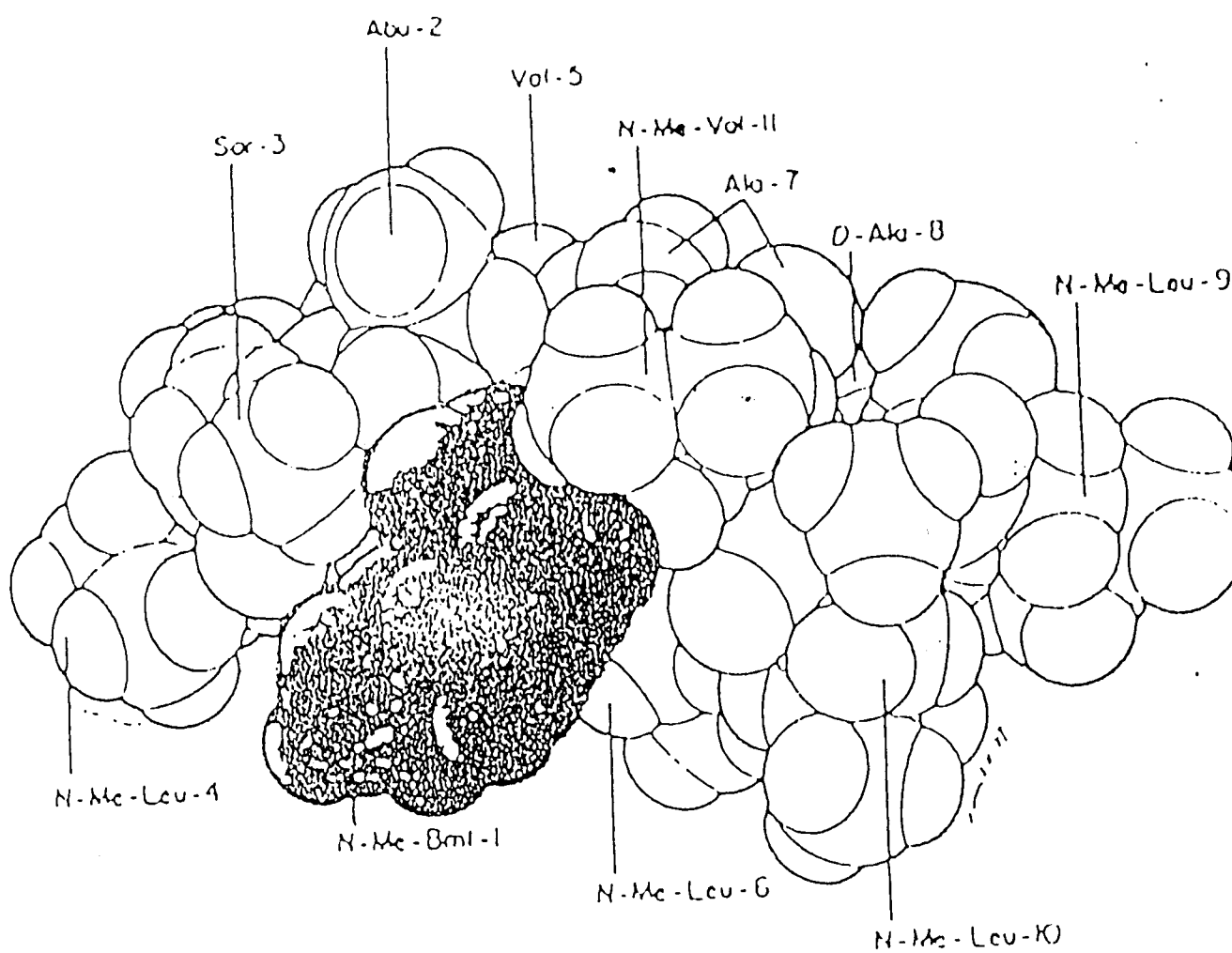


Figura 2.- Representación tridimensional de la estructura de la CsA.

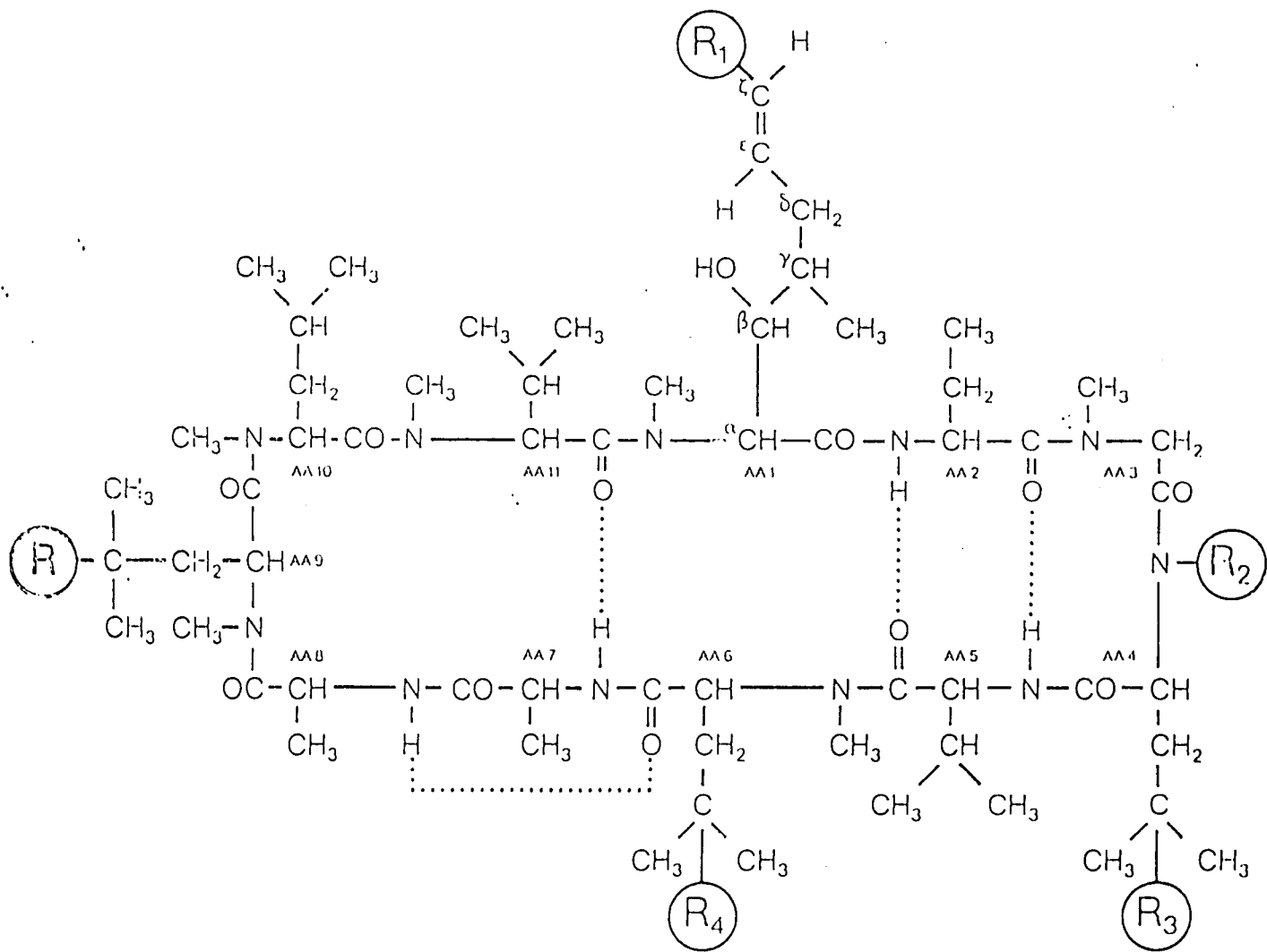


Figura 3.- Representación de las zonas (R_n) donde se producen las modificaciones de la molécula de CsA, durante su biodegradación.

Metabolite No.	(R)	(R ₁)	(R ₂)	(R ₃)	(R ₄)
Cyclosporine	H	CH ₃	CH ₃	H	H
1	OH	CH ₃	CH ₃	H	H
8	OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	H
9	OH	CH ₃	H	H	OH
10	OH	CH ₃	CH ₃	OH	H
13	hydroxylated and N-demethylated derivative of cyclosporine				
16	OH	CH ₃	CH ₃	H	OH
17	H	CH ₂ OH	CH ₃	H	H
18*)	H	CH ₂ OH	CH ₃	H	H
21	H	CH ₃	H	H	H
25	H	CH ₂ OH	H	H	H
26*)	OH	CH ₂ OH	CH ₃	H	H

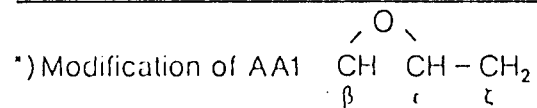


Figura 4.- Esquema de las modificaciones que presentan los metabolitos de la CsA, con respecto a la molécula original.

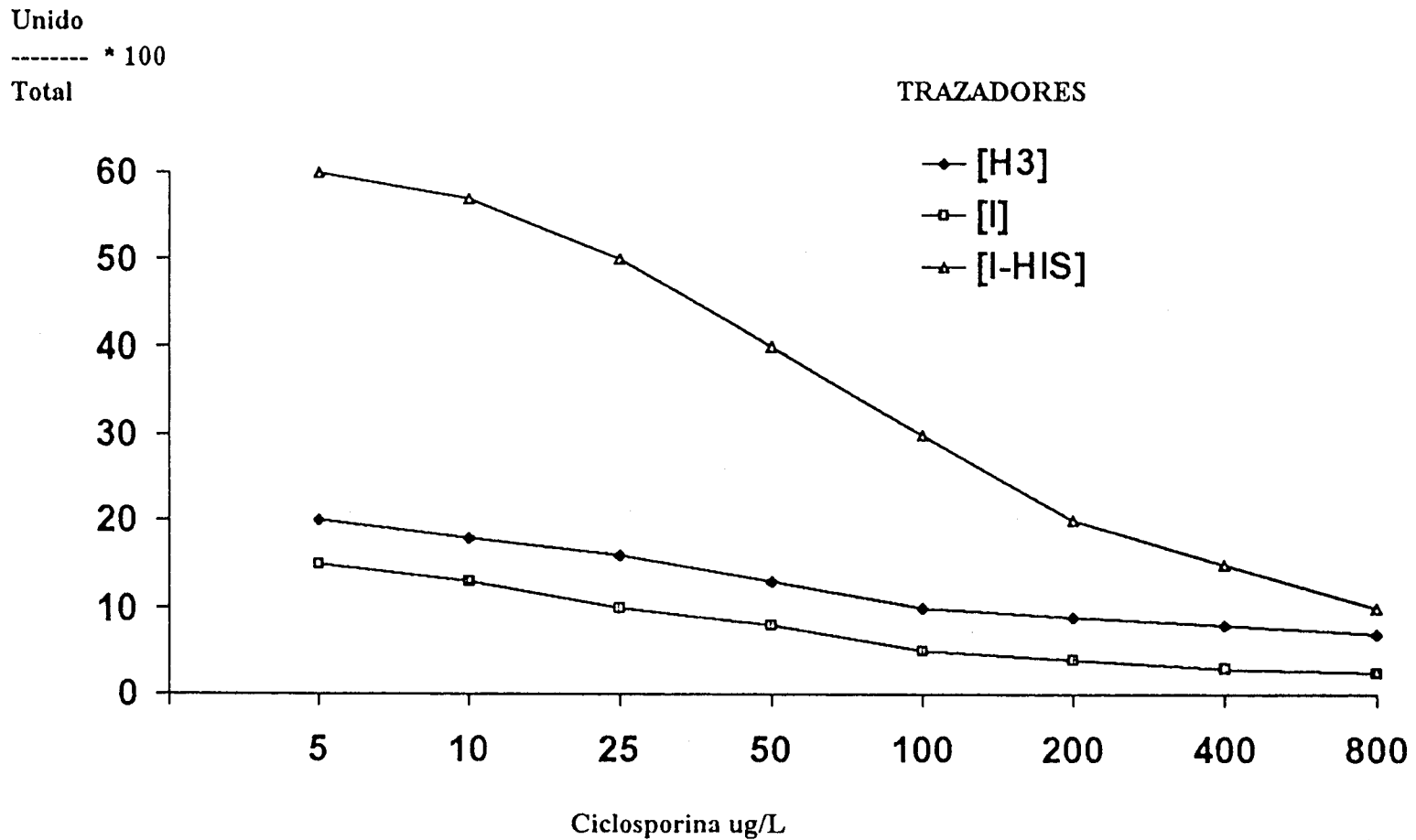


Figura 5: Curvas estándar de los trazadores Tritio [H3], Iodo-125 [I], y Iodo-125-Histamina, obtenidas con el antisuero policlonal de Sandoz.

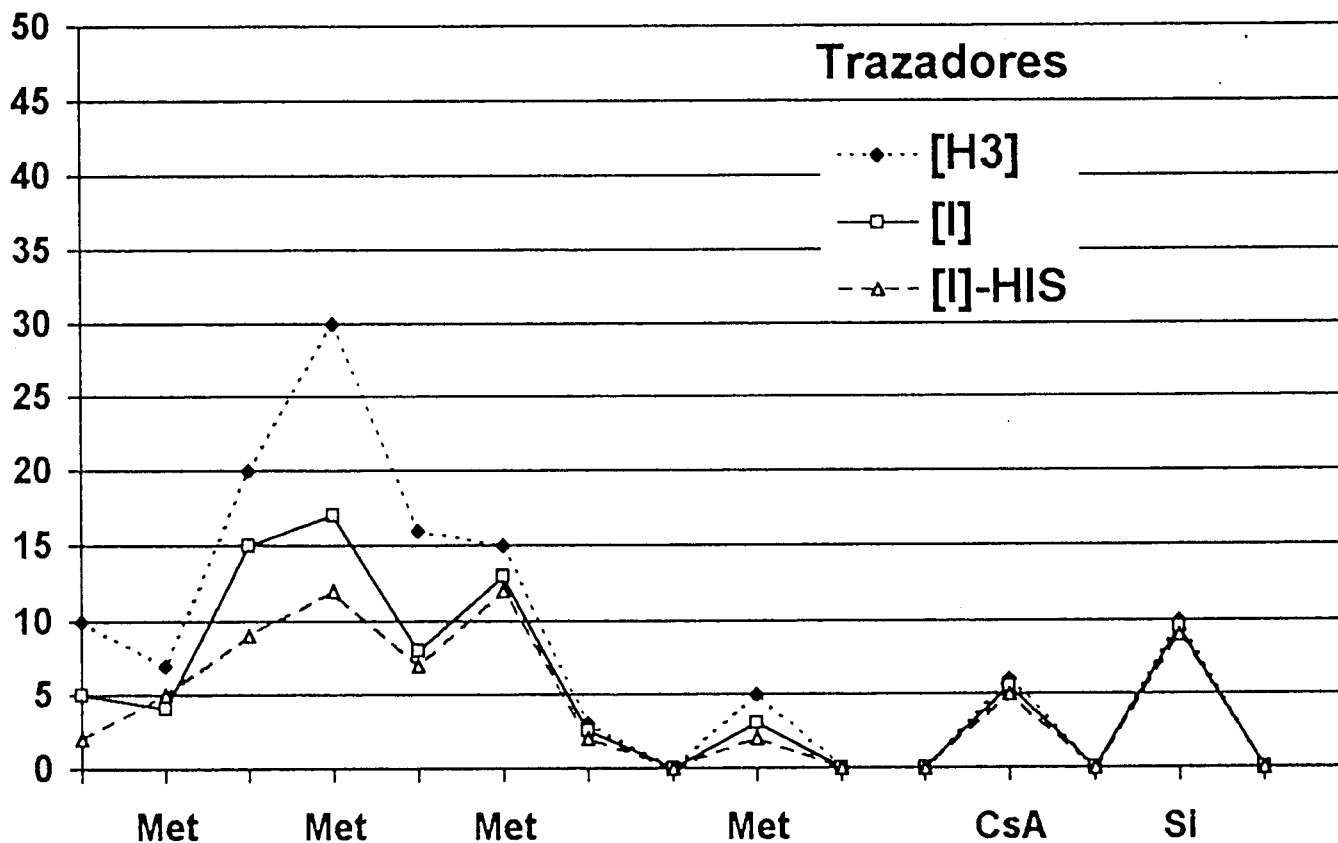


Figura 6: Gráficas superpuestas de tres HPLC realizadas con diferentes radiotrazadores pero con el mismo antisuero (RIA Policlonal Sandoz) en una muestra de bilis de un paciente que tomaba ciclosporina.

(Met) - Metabolitos ; (CsA) - Ciclosporina A ; (Si) - Estándar interno.

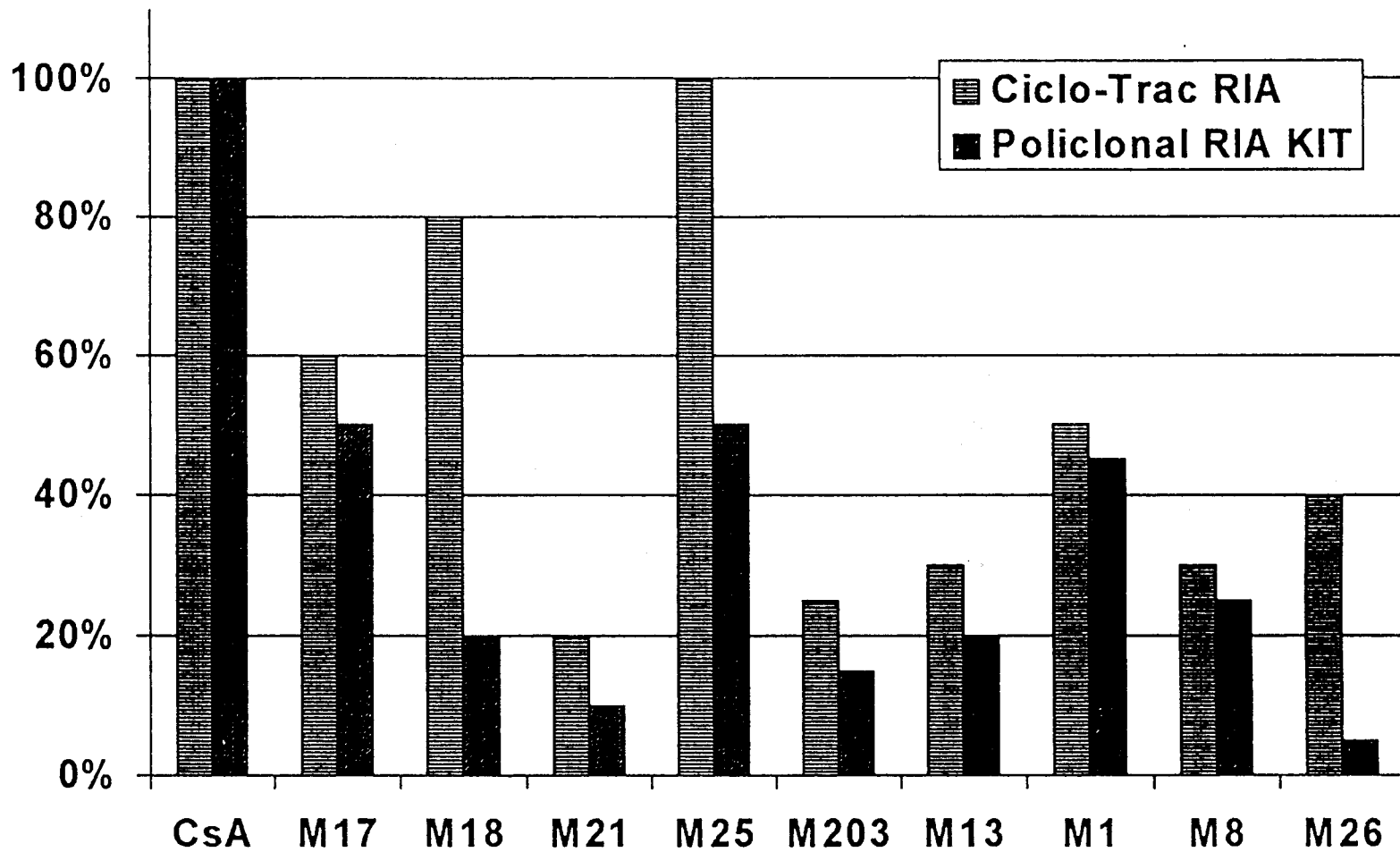


Figura 7: Reactividad cruzada (%) de la ciclosporina A (CsA) con sus principales metabolitos (Mn.) medidas con dos RIAs policlonales distintos.

Tabla I: Capacidad de diferenciación entre ciclosporina A (CsA) y sus metabolitos por los anticuerpos monoclonales MAbs1 y MAbs2.

Metabolito	Modificación		MAbs1	MAbs2
			Diferencias *	
M17	(OH)	RA1	150	0
M1	(OH)	RA9	20	0
M21	(DME)	RA4	16	4
M18	(OH)+(IME)	RA1	25	0
M8	(OH)	RA1 y RA9	> 300	0
M16	(OH)	RA6 y RA9	300	0
M25	(OH)RA1 +	(DME) RA4	1000	3
M26	(IME)RA1 +	(OH) RA9	300	0
Derivado	(OH)	RA4	0	5

(* Se expresa como el cociente $[\text{Metabolito}]/[\text{CsA}]$ capaz de inhibir el 50% de la unión MAbs-CsA, medido con Inmunoanálisis enzimático indirecto .

(OH) - Hidroxilación; (DME) - Demetilación; (IME) - Esterificación intramolecular; (RA) - Residuos de aminoácidos en diferente posición;

II. PLANTEAMIENTO.

La monitorización terapéutica de los niveles de ciclosporina (CsA) total en sangre (CT) y plasma (CPT) de pacientes trasplantados, ha demostrado que la toxicidad y el rechazo se asocian con altos y bajos niveles, respectivamente. No obstante, el intervalo terapéutico de la CsA es muy estrecho, varía entre individuos, en un mismo individuo no es constante a lo largo del tiempo, y es frecuente que se produzcan solapamientos entre los niveles inmunosupresores y tóxicos; por ello, la monitorización de dichas concentraciones totales resulta a menudo insuficiente para orientar su correcta dosificación ^{225,267-269}.

En teoría, la acción farmacológica se relaciona bien con la concentración de fármaco no unido, o libre, que hay en el sitio de acción, y una buena referencia de ésta es la fracción plasmática libre (FL) y la concentración plasmática libre (CPL). Los acontecimientos clínicos también guardan una clara relación con la FL de CsA ¹⁴⁶. Una semana antes de un episodio de rechazo, la FL de la CsA sufre una bajada significativa, volviendo a subir, aunque de manera no significativa, una semana después. Esta relación con los acontecimientos clínicos y su valor como referencia de la concentración de CsA en el sitio de acción, justificaría su monitorización terapéutica rutinaria. Pero la determinación de la FL de CsA (CPL/CPT) es muy complicada, porque

a niveles terapéuticos la CPL de CsA está muy por debajo de los límites de detección de las técnicas habituales de medida (TDx, RIAs o HPLC). Por ello, para su determinación se utiliza CsA marcada y contadores de radioactividad ^{143,144}.

La FL de la CsA es independiente de la dosis administrada y de su CPT; sólo depende de la calidad y cantidad de las proteínas plasmáticas, sobre todo de las lipoproteínas, ya que son las que transportan la mayor parte de la CsA unida (principalmente la fracción HDL, en menor medida la LDL y muy poco a la VLDL). Se ha objetivado una importante correlación inversa entre la FL de CsA y la concentración de HDL-Colesterol, y entre la FL de CsA y concentración plasmática de Apoproteína A1. Los parámetros farmacocinéticos que se relacionan inversamente con la FL (vida media y volumen de distribución), también tienen una importante correlación directa con la concentración de HDL-Colesterol. Por ello, y teniendo en cuenta que la mayor parte de la CsA plasmática esta unida, cabe pensar que las proteínas plasmáticas y sobre todo la fracciones lipoproteica HDL, sean la principal fuente de variabilidad de la FL ^{129,139,270,271}.

Dado que la determinación de la FL de la CsA no está al alcance de la mayoría de los laboratorios (por la necesidad de usar isótopos radioactivos) y que los intentos de calcularla indirectamente conociendo la CT de CsA y los niveles de colesterol, triglicéridos y eritrocitos no han tenido éxito ^{138,146}.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- a) Desarrollar un método para determinar la FL de CsA sin usar isótopos radioactivos
- b) Cuantificar la influencia de las fracciones lipoproteicas y Apoproteínas A1 y B en las fluctuaciones de la FL de la CsA.
- c) Evaluar la posibilidad de calcular la FL de CsA basándose en los niveles plasmáticos de éstas y la CT de CsA.

III. MATERIAL Y MÉTODO.

III.1. MATERIAL.

III.1.1. MUESTRAS.

Se obtuvieron un total de 25 muestras de sangre procedente de 25 voluntarios sanos, 18 hombres y 7 mujeres, con edades comprendidas entre 19 y 20 años, que no habían tomado ningún tipo de medicación en los 30 días anteriores a la extracción.

III.1.2. REACTIVOS.

III.1.2.a. Buffer para la diálisis

Se ha utilizado una solución de agua destilada conteniendo 4 gr. de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$, 0,78 gr. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$, y 5,6 gr. de ClNa por cada 100 mL de solución ¹⁴⁵.

III.1.2.b. Solución de CsA.

La CsA , en forma de polvo puro, ha sido gratuitamente proporcionada por el laboratorio Sandoz Ltd. , y utilizada en forma de solución en metanol al 0,1% (1 μl de dicha solución contenía 10.000 ng

de CsA). La solución es conservada en el frigorífico a 4°C, dentro de un recipiente hermético de acero inoxidable, hasta su utilización.

III.1.2.c. Reactivo para medición de la CsA.

Se ha utilizado el Kit para TDx® " Cyclosporine and Metabolites Serun assay" comercializado por Abbott Ltd.

III.1.2.d. Reactivos de bioquímica.

Para la medición de la apoproteína A1 y B, y las fracciones lipoproteicas HDL, LDL, VLDL-Colesterol se ha utilizado los Kit para Technicon RA® Systems ; APO A-I , APO B y Colesterol, respectivamente, comercializado por Bayer Corporation. Para la medición del HDL-Colesterol se ha utilizado, además el precipitante "HDL Colesterol" comercializado por Boehringer Mannheim.

III.1.3. CÁMARA DE DIÁLISIS.

Se ha utilizado una fabricada en acero inoxidable, según un diseño propio registrado en la Oficina de Patentes Española con el n° P9501320.

III.1.3.a. Descripción de la cámara.

Con una capacidad aproximada de 1 mL, está compuesta por dos cilindros, de acero inoxidable, en cada uno de los cuales se ha excavado media esfera. Uno de los cilindros posee un escalón en donde se apoya una membrana semipermeable y asienta una arandela de goma (Celdilla A); el otro tiene una forma complementaria (Celdilla B), de manera que al unirlos quedan convertidos en una sola pieza (*Figura 8*).

Cada cilindro posee en su cara superior dos orificios que confluyen hacia el centro de la esfera, uno para introducir el líquido y otro para la salida del aire que desplaza la entrada de aquél. La cara inferior va achaflanada para poder apoyarlos en la mesa de trabajo sin que rueden (*Figura 9*).

III.1.3.b. Membrana semipermeable

La membranas utilizada es la Diaflo® Amicom YM3 de 25 mm de diámetro, con el corte de peso molecular en 6000-8000. Las membranas están pretratadas por ambas caras con glicerina, para prevenir la desecación, y ácido sódico como conservante. Una cara es lisa y brillante y la otra mate y rugosa.

III.1.4. OTROS MATERIALES.

- Micropipetas de 1 μ L y 10 μ L.
- Pipetas de precisión de 50, 150, 250, 500 y 750 μ L.
- Jeringa Hamilton para 1 mL.
- Centrifugadora rotativa.
- Ultracentrifugadora
- Estufa incubadora.
- Agitador.
- Equipo analítico automático para la determinación "in vitro" de inmunoanálisis por fluorescencia polarizada (FPIA) TDx® Abbott Ltd.
- Equipo analítico automático para determinaciones colorimétricas Technicon RA® Systems de Bayer Corporation.

III.2. MÉTODOS.

III.2.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.

Las muestras fueron obtenidas a primera hora de la mañana, en ayunas, mediante punción venosa. Se obtuvieron 10 mL de cada voluntario, 5 mL son depositados en un tubo con gelatina y otros 5 mL en un tubo conteniendo como anticoagulante EDTA. El tubo con gelatina es llevado inmediatamente al laboratorio de bioquímica para su procesamiento y análisis. El tubo con EDTA es centrifugado a 3500 r.p.m. durante 5 minutos a la temperatura ambiente para obtener plasma que es almacenado en el frigorífico a 4° C hasta su utilización (las lipoproteínas permanecen estables a esa temperatura por un periodo de hasta 3 semanas) ¹³².

III.2.2. ESTUDIO BIOQUÍMICO.

Las fracciones lipoproteicas HDL, LDL, y VLDL-Colesterol y las apoproteínas AI y B fueron separadas por ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. durante 20 horas y su concentración determinada con el Technicon RA® y con los reactivos especificados en el apartado 1.2.4.

III.2.3. COMPROBACIÓN ESTANQUEIDAD DE LA CÁMARA.

Se sustituyó la membrana semipermeable que separa las dos celdillas de la cámara por una membranas impermeable. A la celdilla A se le añaden 750 μ L de la solución buffer descrita anteriormente, mientras que la celdilla B se deja vacía. Después de una incubación a 37°C durante 24 horas, se comprueba por observación la ausencia o la presencia de líquido en la celdilla B.

III.2.4. PREPARACIÓN DE LA MEMBRANA SEMIPERMEABLE.

Antes de su uso hay que lavarla y estabilizarla; para ello se introduce en una solución de ClNa al 5% durante 30 minutos y después se enjuaga haciéndola flotar, con la superficie brillante hacia abajo, en un vaso con agua durante al menos 1 hora (hay que cambiar el agua cada 15 minutos).

III.2.5. REALIZACIÓN DE LA DIÁLISIS DE EQUILIBRIO.

Se hizo en la misma semana en la que se extrajeron las muestras. En el escalón de la celdilla A de la cámara de diálisis (véase 1.3) se coloca la membrana semipermeable, con su superficie brillante mirando hacia el interior de la celdilla. A continuación se coloca la arandela de goma, se acopla la celdilla B y el conjunto se encaja en el hueco labrado en una plataforma de metacrilato que mantiene ambas celdillas fuertemente unidas. Se depositan 750 μL de plasma en la celdilla A y 750 μL de buffer en la celdilla B. Después se añade a la celdilla A 1 μL de la solución de CsA descrita anteriormente. Posteriormente la cámara se mantiene en la estufa incubadora durante 16 horas a 37°C.

III.2.6. MEDICIÓN DE LA CsA TOTAL.

Después de la diálisis de equilibrio se extrae 10 μL de plasma de la celdilla A y se diluyen en 500 μL de plasma procedente del mismo voluntario, obteniendo así una dilución de 1/51. Para homogeneizar y equilibrar la distribución de la dilución, el tubo de ensayo que la contiene se incuba en la estufa durante 30 minutos a 37°C con agitación permanente.

La concentración de CsA se determina con el autoanalizador TDx®, y el Kit para CsA del apartado 2.1 . La concentración de CsA en el plasma se obtiene multiplicando el valor obtenidos por 51, que es el coeficiente de dilución.

III.2.7. MEDICIÓN DE LA CsA LIBRE.

No existen reactivos comercializados capaces de medir directamente la concentración de CsA libre con la técnica FPIA, por lo que esta concentración se ha determinado de forma indirecta

III.2.7.a. Obtención de la muestra donde efectuar la medición.

Después de la diálisis de equilibrio se extraen 250 μ L de buffer de la celdilla B (que sólo contiene CsA libre) y se diluyen en 250 μ L de plasma procedente del mismo voluntario; se obtiene así una dilución al 1/2. La homogeneización y equilibrado de la dilución se hizo como en el apartado 2.6.

III.2.7.b. Determinación de la concentración de CsA en la muestra.

Se determina a través de la polaridad obtenida tras analizar las muestras con el TDx y el Kit para CsA descrito en el apartado 1.2 .

A) Obtención de una curva de calibración específica para la muestra.

Para obtenerla hubo que preparar calibradores específicos para ésta. Para ello 100 µL del buffer antes descrito (ver punto 1.2) se diluyo en 100 µL de cada uno de los calibradores del Kit TDx utilizado (ver punto 1.2). Estas diluciones se homogeneizaron y equilibraron como en el apartado 2.6. Se analizaron con el TDx y el reactivo descrito para CsA en el apartado 1.2.

La polaridad obtenida para cada uno de los calibradores específicos (cuya concentración de CsA conocíamos) nos permite, mediante calculo infinitesimal, obtener la curva de calibración específica para la muestra (*Figura 10*).

B) Calculo de la Concentración de CsA en la muestra.

La concentración de CsA en la dilución se calcula siguiendo la siguiente fórmula: $[CsA] = - \text{Ln} (\text{Polaridad} / X) / Y$

Para polaridades entre 126,91 y 161,77 $X = 190,1805$ $Y = 0,001618$

Para polaridades entre 161,78 y 180,3 $X = 200,9525$ $Y = 0,002169$

(Los valores de X y de Y son obtenidos de la curva de calibración del apartado anterior).

C) Calculo de la concentración de CsA libre.

La concentración de CsA libre (CsA del buffer) se calcula multiplicando el resultado por 2, que es el coeficiente de dilución.

III.2.7.c. Fiabilidad de los cálculos.

Para comprobar la fiabilidad de los datos obtenidos con este método, se preparan 10 muestras de una dilución igual a la descrita en 2.7.1. conteniendo 0, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750 y 1000 ng/mL de

CsA. Las muestras fueron calculadas siguiendo la metodología descrita, y la precisión determinada por la siguiente fórmula: (concentración medida / concentración real) \times 100.

III.2.8. CÁLCULO DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA LIBRE Y UNIDA.

La fracción plasmática libre (FL) y la unida (FU) se calcula según las siguientes fórmulas: $FL = [LIBRE] / [TOTAL]$, y $FU = 1 - FL$

Durante la diálisis se produce un desplazamiento de líquido desde la celdilla B (menos presión osmótica) a la A, esto da lugar a un cambio en la razón de proteínas (Rp), por lo que los resultados deben de ser reajustados para dichos cambios ²⁷². Este reajuste incluye las siguientes etapas :

III.2.8.a. Cálculo de la fracción de volumen desplazado

Mediante jeringa de Hamilton se mide los volúmenes de líquido que quedan en las celdilla A y B, a los que se les suma el volumen ya extraído para los análisis anteriores.

La fracción de volumen desplazado durante la diálisis (F_v) se calcula con la siguiente ecuación: $F_v = V_p - V_b / V_p + V_b$ en donde V_p y V_b son respectivamente, los volúmenes de plasma y buffer después de la diálisis de equilibrio.

III.2.8.b. Cálculo del cambio en la razón de proteínas.

Se calcula según la siguiente fórmula: $RP = 1 / (F_v + 1)$.

III.2.8.c. Corrección de FU y FL (F_{Uc} , FLc).

Se efectúa mediante las ecuaciones siguientes: $F_{Uc} = 1 / [(1 / FU - 1) \times R_p] + 1$, y $FLc = 1 - F_{Uc}$

Este método asume que algunas las pérdidas de líquido que se producen en el aparato de diálisis por evaporación, ocurren en la misma proporción en ambas celdillas por lo que una vez hecha la corrección, en teoría $F_{Uc} = FU$ y $FLc = FL$

III.2.9. VARIABLES DEL ESTUDIO.

III.2.9.a. Farmacológicas.

- Concentración de CsA total, Concentración de CsA libre.
- FL de CsA.

III.2.9.b. Bioquímicas.

- Concentración plasmática de HDL, VDL, VLDL- Colesterol
- Concentración plasmática de Apoproteínas A1 y B.

III.2.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico se ha realizado con la hoja de calculo EXCEL 97 de Microsoft. Para determinar la relación entre las variables bioquímicas y la FL de CsA se hizo un análisis de regresión lineal simple y se determino el coeficiente de correlación. El limite de significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

III.2.11. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA.

Búsqueda manual en Index Medicus® de los años 1979 a 1994.

Búsqueda informática en Mediline® años 1994 a 1997.

Palabras clave de la búsqueda: Cyclosporine, fraction unbound,
Protein binding, Equilibrium dyalisis, Stainless steel chamber.

IV. RESULTADOS.

IV.3.1. ESTANQUEIDAD DE LAS CÁMARAS DE DIÁLISIS.

Todas las cámaras utilizadas resultaron ser estancas, comprobándose después de la prueba de estanqueidad que no había pasado líquido a la celdilla B.

IV.3.2. VALIDEZ DEL MÉTODO UTILIZADO PARA EL CÁLCULO DE LA CSA LIBRE.

En la *Tabla II* se pueden ver los resultados obtenidos en la prueba de fiabilidad del método utilizado para calcular la CsA libre. El porcentaje promedio de precisión es del 100 %, con unos valores límites entre 103 % de máximo y 98 % de mínimo.

IV.3.3. DIÁLISIS DE EQUILIBRIO.

El promedio de las concentraciones de CsA en el plasma (Celdilla A) después de la diálisis de equilibrio es de 17.686 ng/mL \pm 2.183, con unos límites entre 22.137 y 14.163 ng/mL. El promedio de la concentración

de CsA en el buffer (Celdilla B) después de la diálisis de equilibrio es de 211 ng/mL \pm 47, con unos límites entre 319 y 141 ng/mL (*Tabla III*).

En la *Tabla IV* se pueden ver como la suma de los volúmenes de los fluidos de ambas celdilla es sensiblemente inferior a la inicial (1500 μ L) y como los de la celdilla A son superiores a la B.

IV.3.4. FL DE CsA.

Una vez corregido el volumen de desplazamiento, el valor promedio de la FL de CsA es de 0,014965 \pm 0,004018 (1,4% \pm 0,4%) con un máximo de 0,023283 (2,33 %) y un mínimo de 0,009925 (0,99 %) *Tabla V* . En la *Figura 11* se puede apreciar la distribución de los valores de la FL de CsA en las muestras estudiadas y en las que se constata una gran variabilidad interindividual.

IV.3.5. RESULTADOS DE BIOQUÍMICA.

En la *Tabla VI* aparecen las concentraciones séricas de las fracciones lipoproteicas de las muestras del estudio. La fracción HDL presenta un promedio de 52 mg/dL \pm 10, con límites máximo y mínimo de 71 y 35 mg /dL respectivamente. El promedio de la VDL es de 116 mg/dL \pm

26, y unos límites máximo y mínimo de 176 y 81 mg /dL respectivamente. La fracción VLDL tiene un promedio de 10 mg /dL \pm 6 y unos límites máximo, y mínimo de 31 y 2 mg /dL respectivamente. En la **Figura 12** se puede apreciar la distribución de la concentración de dichas fracciones en la población estudiada.

En la **Tabla VII** se recogen las concentraciones séricas de las apoproteínas A1 y B correspondientes a las muestras del estudio. La A1 presenta un promedio de 135 mg/dL \pm 22, con unos límites máximo y mínimo de 187 y 93 mg /dL respectivamente. La B tiene un promedio de 74 mg /dL \pm 18 y unos límites máximo y mínimo de 114 y 50 mg /dL respectivamente.

IV.3.6. DE LOS ESTUDIOS DE CORRELACIÓN.

En las **figuras 13 a 17** se pueden ver cada uno de los gráficos resultantes de relacionar la FL de la CsA con cada una de las variables bioquímicas del estudio y las rectas de tendencia correspondientes. También se pueden observar las ecuaciones respectivas y los coeficientes de correlación resultantes. No existe significación estadística en ninguna de las correlaciones efectuadas.

IV.3.7. TABLAS Y FIGURAS DE LOS RESULTADOS

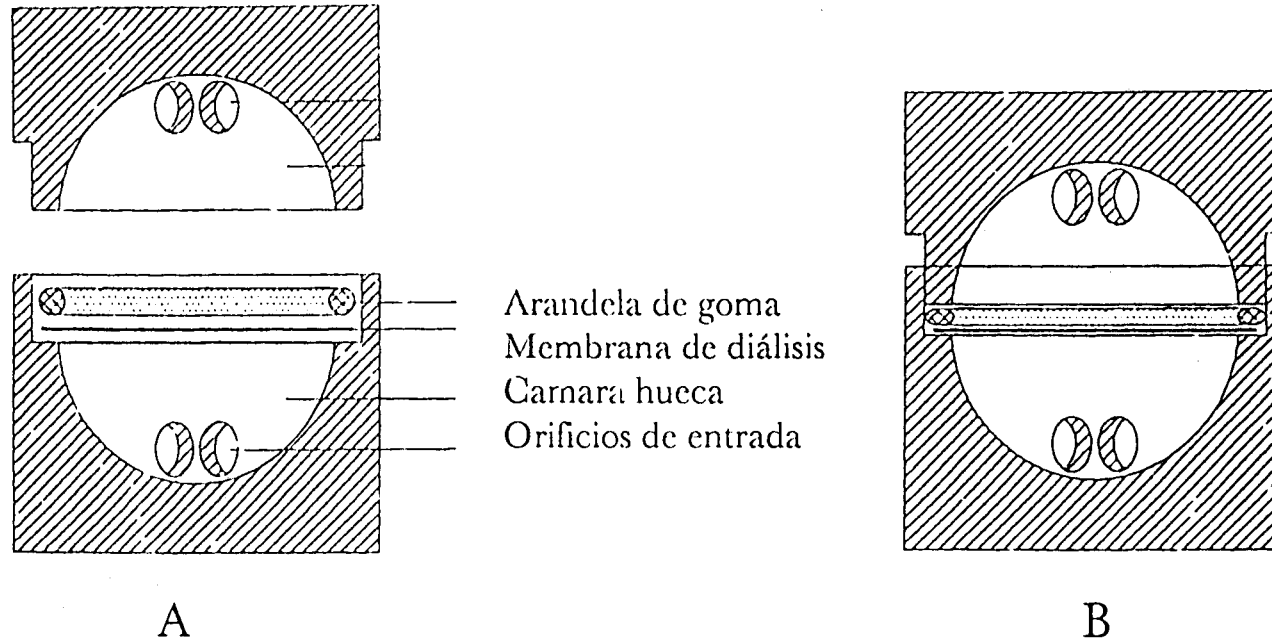


Figura 8.- Corte transversal de la cámara de diálisis de equilibrio antes (A) y después de unir las celdillas que la componen (B).

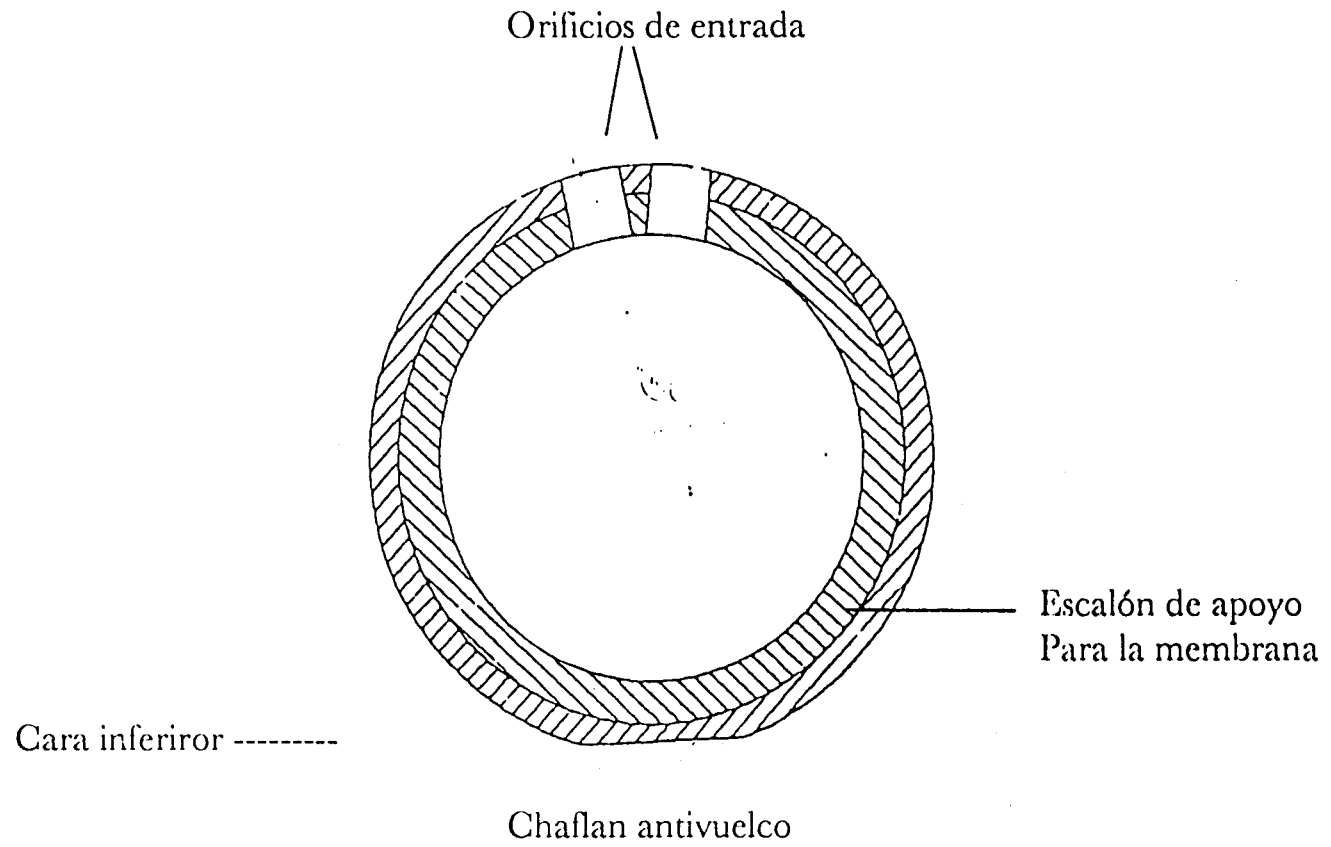


Figura 9.- Corte vertical de la cámara de diálisis de equilibrio.

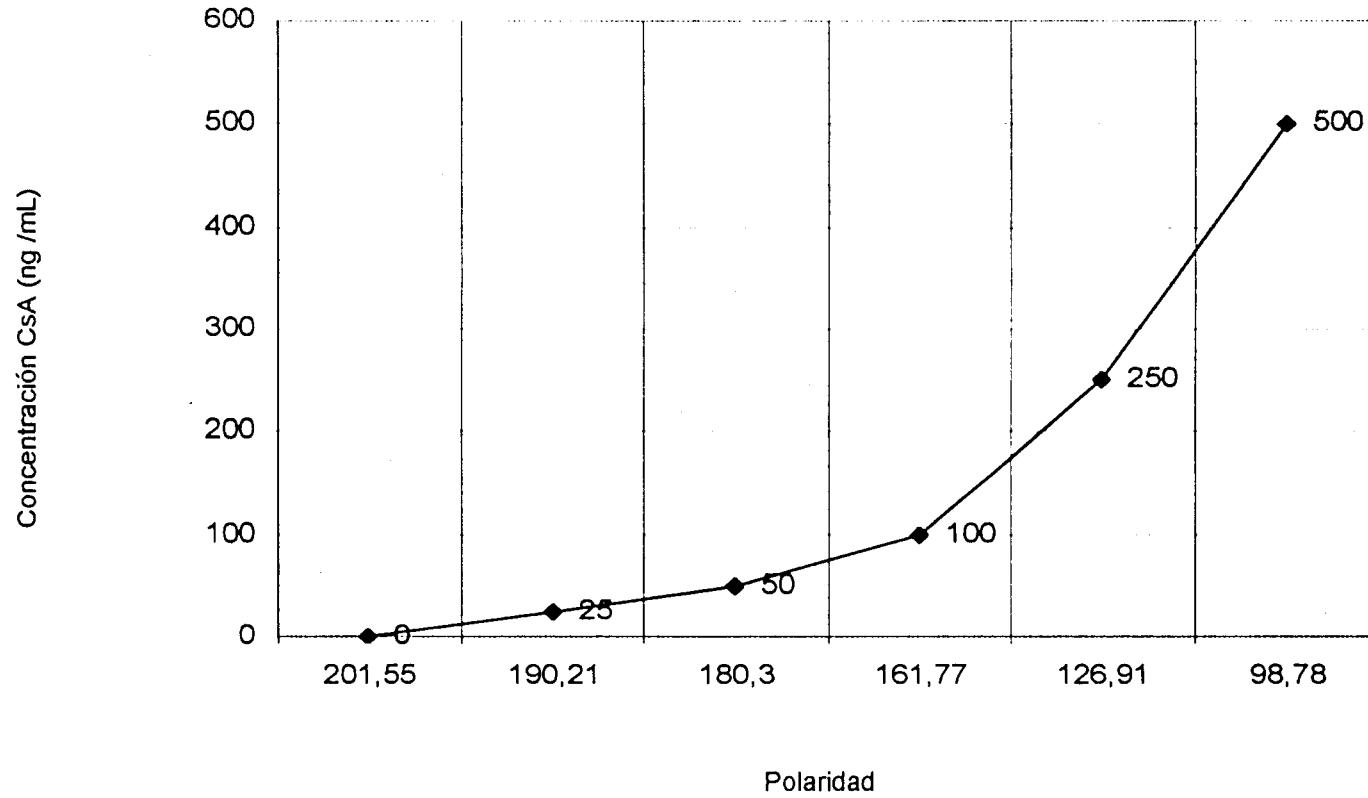


Figura 10.-Curva de calibración de la ciclosporina A (CsA) en la mezcla de plasma y buffer.

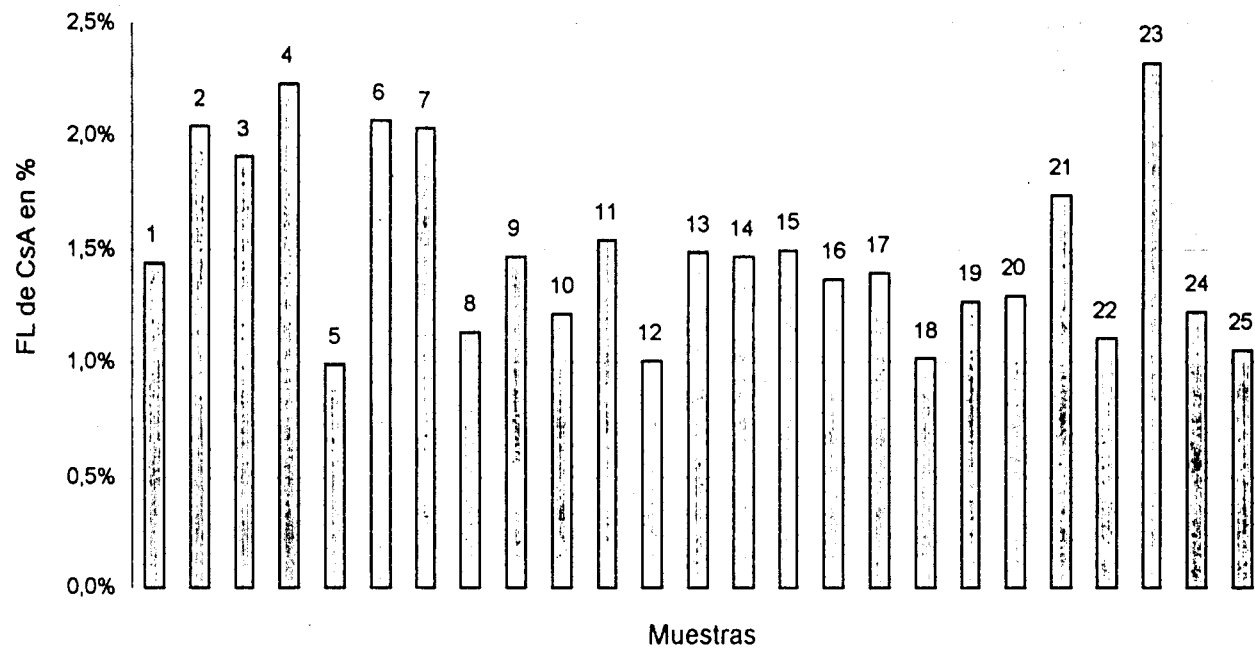


Figura 11.- Fracción plasmática libre de ciclosporina (FL de CsA) de las muestras analizadas.

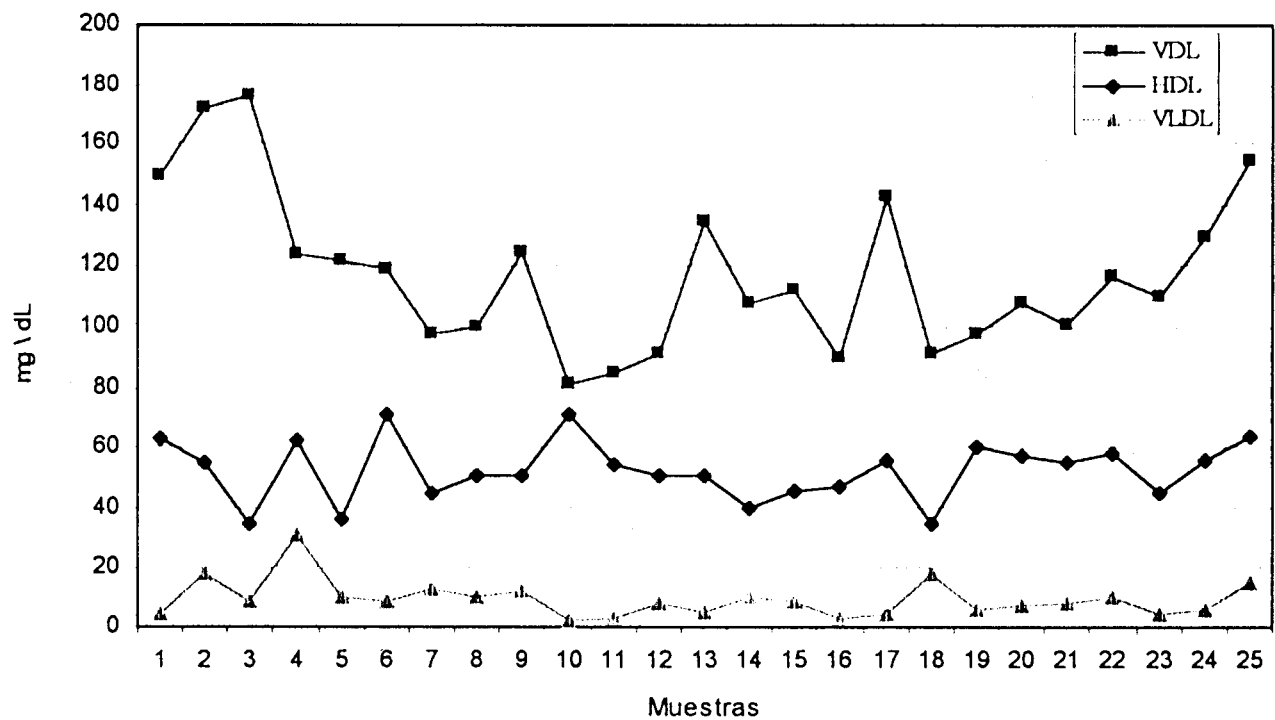


Figura 12.- Concentración séricas de los fracciones lipoproteicas en las muestras del estudio

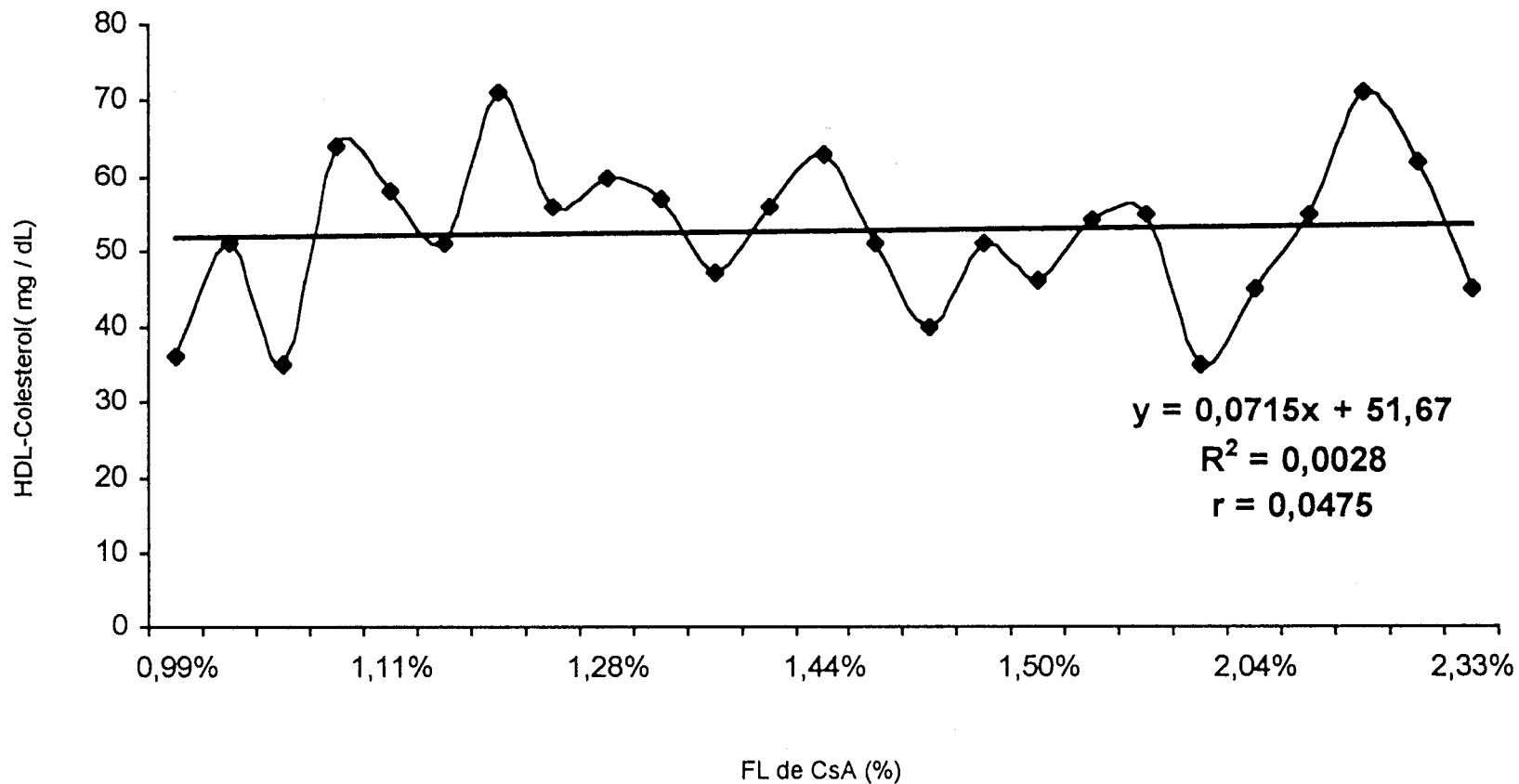


Figura 13.- Relación fracción plasmática libre (FL) de ciclosporina A (CsA) en % / concentración HDL-Colesterol plasmático

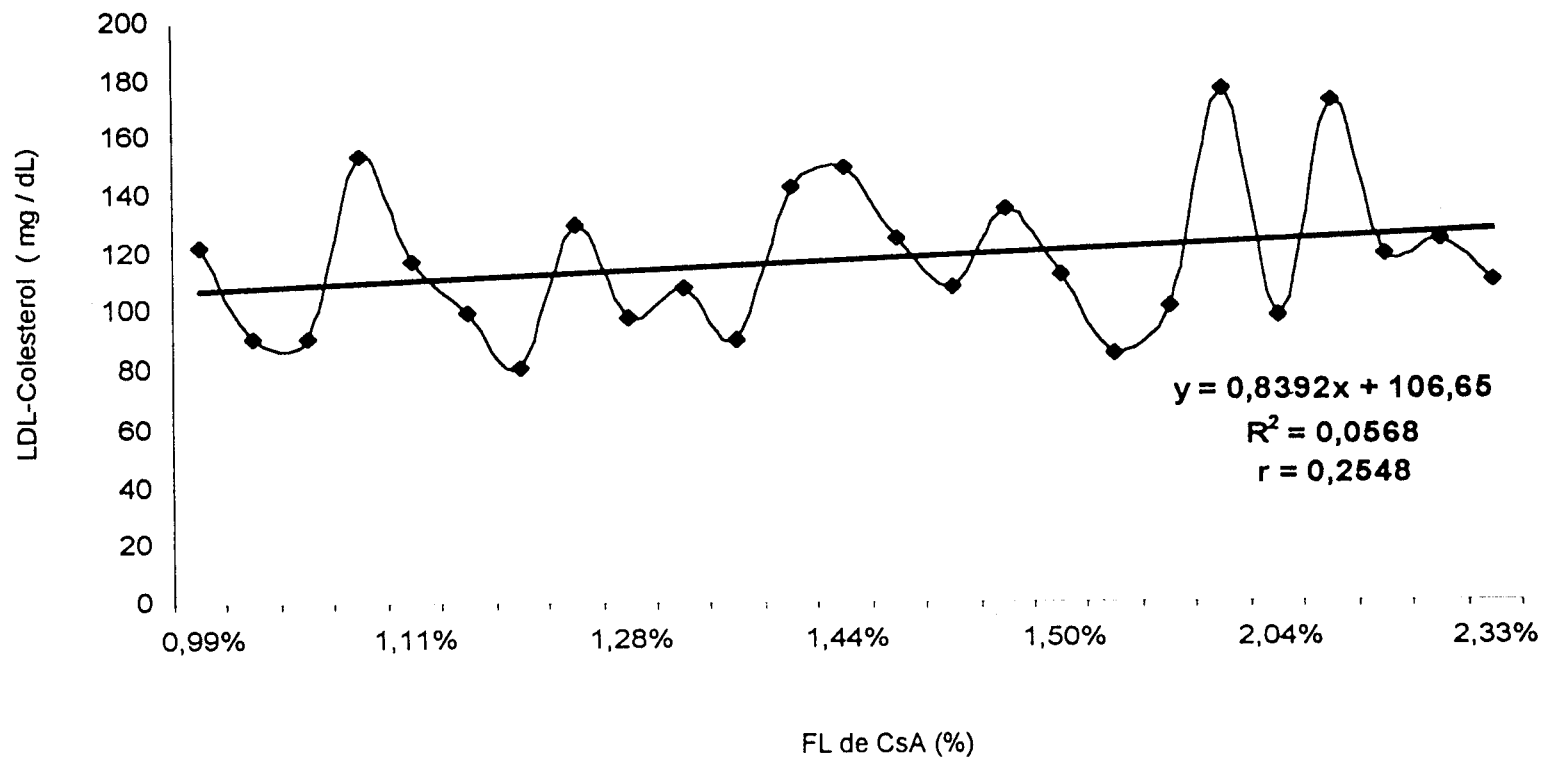


Figura 14.- Relación fracción plasmática libre (FL) de ciclosporina A (CsA) en % / concentración LDL-Colesterol plasmático

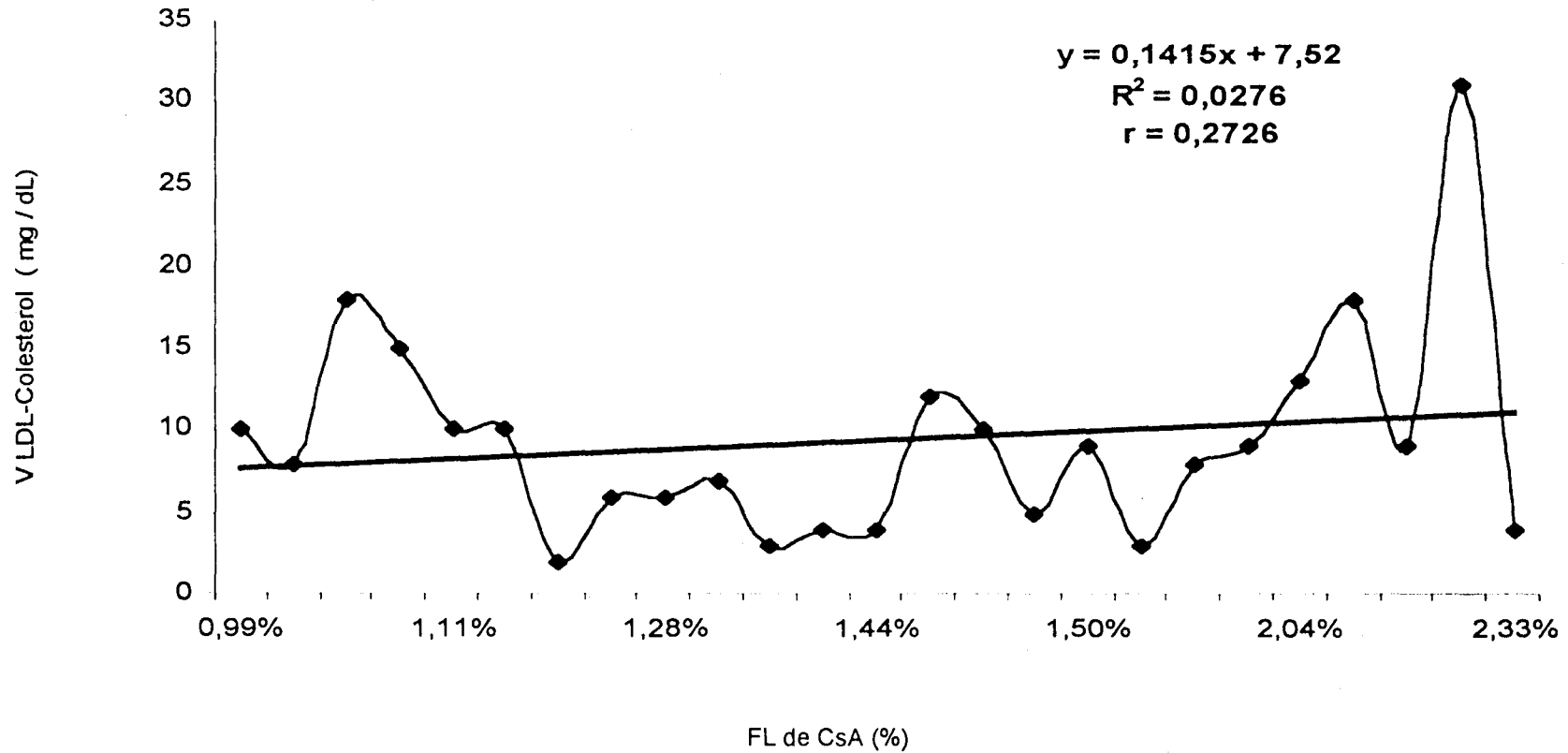


Figura 15.- Relación fracción plasmática libre (FL) de ciclosporina A (CsA) en % / concentración VLDL-Colesterol plasmático

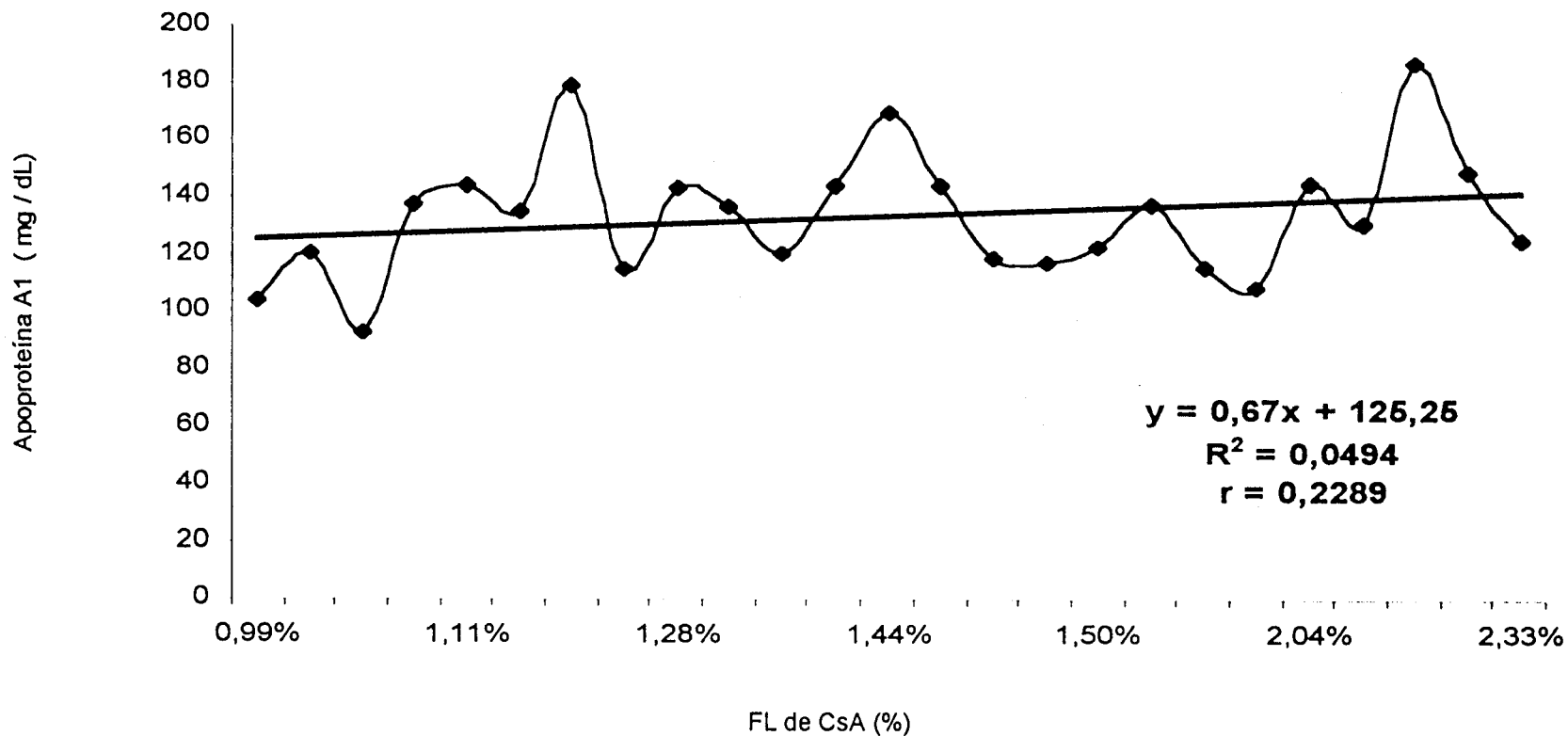


Figura 16.- Relación fracción plasmática libre (FL) de ciclosporina A (CsA) en % / concentración apoproteína A1 plasmática

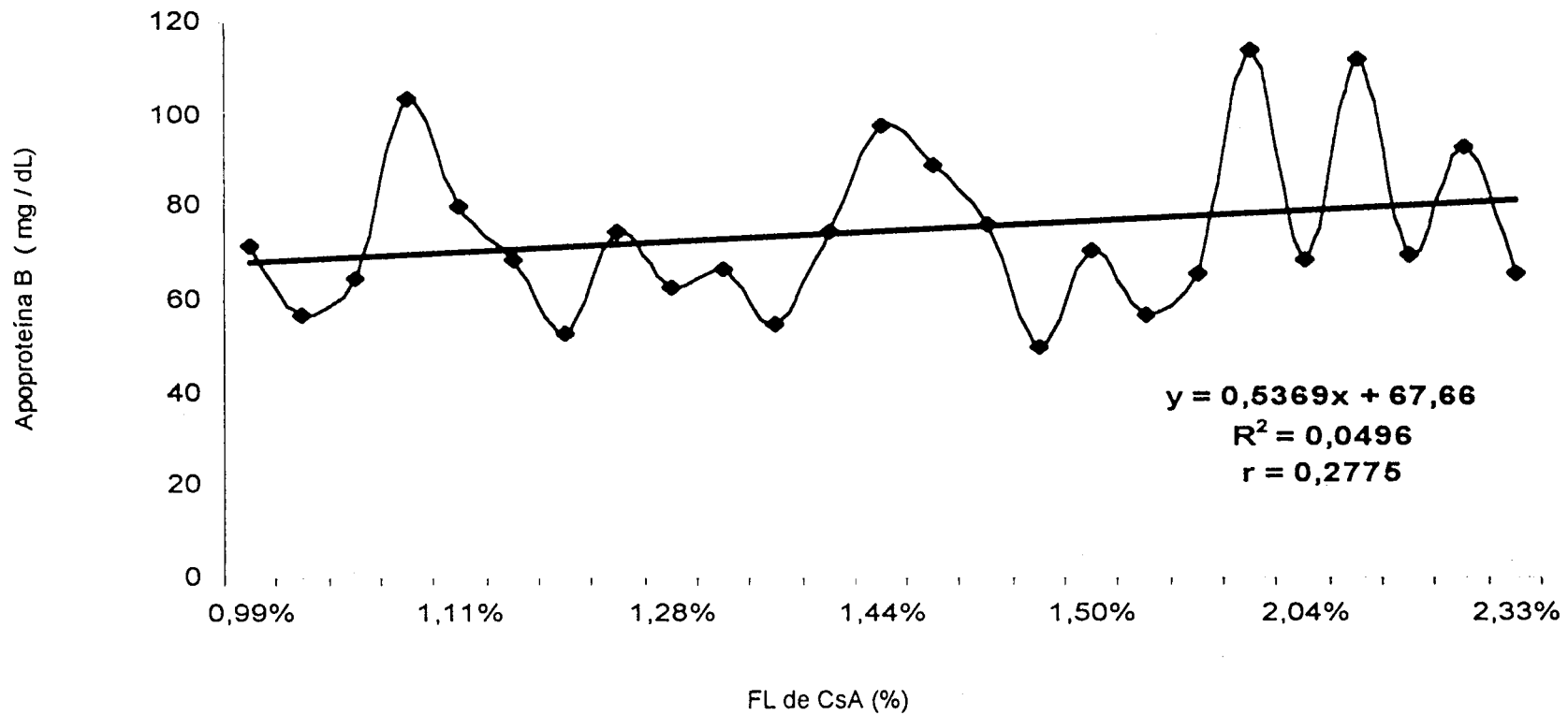


Figura 17.- Relación fracción plasmática libre (FL) de ciclosporina A (CsA) en % / concentración apoproteína B plasmática

Tabla II. Concentración de ciclosporina (CsA) real y calculada por el método descrito en el apartado 2.7 de Material y Métodos

Muestras	CsA real (mg /mL)	CsA calculada (mg /mL)	CsA calculada (%)
1	0	0	100%
2	50	50	100%
3	100	98	102%
4	125	121	103%
5	150	149	101%
6	200	204	98%
7	250	256	98%
8	500	497	101%
9	750	760	99%
10	1000	1000	100%

Tabla III. Concentración de ciclosporina A (CsA) en las celdillas A (plasma) y B (buffer) después de la diálisis de equilibrio.

Muestras	Concentración de CsA en la celdilla A (ng /mL)	Concentración de CsA en la celdilla B (ng /mL)
1	17.637	208
2	18.370	319
3	18.310	264
4	15.277	261
5	18.882	156
6	16.591	267
7	14.163	228
8	17.729	157
9	15.121	175
10	14.823	141
11	20.692	277
12	22.099	209
13	18.262	234
14	17.436	230
15	16.316	210
16	19.174	228
17	18.631	195
18	16.576	148
19	19.192	212
20	18.835	182
21	14.505	179
22	16.540	143
23	15.450	265
24	22.137	222
25	19.394	165

Tabla IV. Volúmenes (μL) de las celdillas de la cámara después de la diálisis y volumen perdido.

Muestras	Volumen celdilla A	Volumen celdilla B	Volumen perdido
1	712	452	338
2	661	456	383
3	678	347	476
4	816	430	254
5	706	468	326
6	784	432	284
7	774	448	278
8	735	406	359
9	780	453	267
10	751	427	322
11	654	478	368
12	602	530	368
13	650	473	377
14	600	480	420
15	667	477	356
16	653	481	366
17	705	352	443
18	648	480	372
19	662	483	355
20	666	330	504
21	715	300	485
22	675	378	447
23	679	323	498
24	602	381	517
25	628	380	492

Tabla V. Fracción plasmática libre de ciclosporina (FL de CsA) una vez corregido el volumen de desplazamiento producido en la diálisis de equilibrio.

Muestras	FL de CsA	Fl de CsA en %
1	0,014442	1,44%
2	0,020526	2,05%
3	0,019090	1,91%
4	0,022412	2,24%
5	0,009925	0,99%
6	0,020773	2,08%
7	0,020383	2,04%
8	0,011394	1,14%
9	0,014668	1,47%
10	0,012169	1,22%
11	0,015445	1,54%
12	0,010072	1,01%
13	0,014854	1,49%
14	0,014687	1,47%
15	0,015017	1,50%
16	0,013721	1,37%
17	0,013981	1,40%
18	0,010230	1,02%
19	0,012767	1,28%
20	0,012957	1,30%
21	0,017395	1,74%
22	0,011070	1,11%
23	0,023283	2,33%
24	0,012264	1,23%
25	0,010604	1,06%

Tabla VI. Concentración séricas (mg /mL) de las fracciones lipoproteicas en las muestras del estudio

Muestras	Colesterol HDL	Colesterol LDL	Colesterol VLDL
1	63	149	4
2	55	172	18
3	35	176	9
4	62	124	31
5	36	122	10
6	71	119	9
7	45	98	13
8	51	100	10
9	51	125	12
10	71	81	2
11	54	85	3
12	51	91	8
13	51	135	5
14	40	108	10
15	46	112	9
16	47	90	3
17	56	143	4
18	35	91	18
19	60	98	6
20	57	108	7
21	55	101	8
22	58	117	10
23	45	110	4
24	56	130	6
25	64	154	15

Tabla VII. Concentraciones séricas (mg /dL) de las apoproteínas A1 y B (Apo A1 y Apo B) en las muestras del estudio

Muestra	Apo A1	Apo B
1	170	98
2	131	112
3	109	114
4	149	93
5	104	72
6	187	70
7	145	69
8	135	69
9	144	89
10	179	53
11	138	57
12	121	57
13	118	50
14	119	76
15	123	71
16	121	55
17	144	75
18	93	65
19	143	63
20	137	67
21	116	66
22	144	80
23	126	66
24	115	75
25	138	104

V. DISCUSIÓN

Desde que comenzó a usarse la CsA en terapéutica, quedó patente la necesidad de monitorizar sus concentraciones sanguíneas y/o plasmáticas para su correcto manejo clínico; ello se debe a la gran variabilidad de su farmacocinética, a su escaso margen terapéutico y a la gravedad de sus efectos adversos ⁹⁵.

La monitorización terapéutica de la CsA se hace de forma rutinaria midiendo su C_m en sangre total, utilizando técnicas que miden sólo el fármaco inalterado ¹⁶⁸⁻¹⁷⁰. Esta medición se muestra con frecuencia ineficaz para predecir la dosis ideal, porque se correlaciona mal con la dosis administrada ^{225,267-269}. Por ello se han propuesto métodos alternativos, en especial en los pacientes con problemas farmacocinéticos en los que la correlación es más pobre. La utilización de otros parámetros, AUC o C_{av} , permiten una mejor dosificación porque ambos se correlacionan bien con la dosis suministrada ²³²⁻²³⁵. A pesar de ello, ni la AUC ni la C_{av} han demostrado ser más útiles que la C_m a la hora de determinar el rango terapéutico de la CsA, y tampoco tienen mayor capacidad para predecir el rechazo del órgano o los efectos adversos del fármaco ^{167,169}.

Teóricamente, para la mayoría de los fármacos, la CPL es un buen indicador de la concentración de fármaco no unido (libre) que hay en el sitio de acción. Cuando la FL (CPL / CPT) es estable en el tiempo la CPT se correlaciona bien con la CPL, pero la FL de la CsA no es estable en el tiempo y por eso la CPT no se correlaciona bien con la CPL. Esto explica los fallos de la monitorización basados en la CPT y también los basados en la CT de CsA, ya que a niveles terapéuticos la CT de CsA se correlaciona bien con su CPT.

Hay otros factores que hacen que el uso de parámetros farmacocinéticos basados en las concentraciones en sangre no reflejen bien lo que ocurre en el sitio de acción: por una parte, la amplia distribución de la CsA por los tejidos en los que alcanza concentraciones muy superiores a las de la sangre; por otra parte, el que las dosis repetidas pueden tener efectos acumulativos que no se reflejan en la concentración sanguínea ^{120,138,143,146,210}.

La FL también es una buena referencia de la concentración de fármaco libre en el sitio de acción. En el caso de la CsA los acontecimientos clínicos guardan una clara relación con ella, por eso, este parámetro se ha propuesto como alternativa a la Cm en la monitorización terapéutica de la ciclosporina ^{144,146}.

Para calcularla hay que separar la CsA libre de la unida. Para ello se han utilizado con éxito diferentes métodos como la ultracentrifugación, la ultrafiltración y la diálisis de equilibrio.

La diálisis de equilibrio entre dos soluciones es un método altamente eficaz para determinar la concentración de moléculas con menor tamaño que el del límite de paso de la membrana semipermeable, ya que después de un determinado tiempo de reposo, las concentración de dichas moléculas se igualan a ambos lados de la membrana. Por ello, este tipo de diálisis se usa como referencia en la determinación de la FL de los fármacos y es el método utilizado en este estudio ^{129,144,145,146}.

Una vez separada la CsA libre es necesario medir su concentración, pero la proporción de CsA libre es muy pequeña (media del 1,5 % de la total) ¹²⁰ y sus niveles plasmáticos, a dosis terapéuticas (inferiores a 500 ng/mL), están fuera de los límites de detección (entre 25-50 ng/mL) de las técnicas habituales de medición (RIA, HPLC, FPIA), por ello en los estudios antes citados se ha utilizado CsA marcada con [H3] porque utilizando contadores de radioactividad se pueden medir pequeñas cantidades de CsA marcada. No obstante el uso de CsA radioactiva hace que el estudio de la FL de CsA sea complicado (no todos los laboratorios tienen la infraestructura necesaria y se necesita personal especializado

para el manejo de los isótopos) por lo que se ha descartado para uso rutinario.

En nuestro estudio, para simplificar la determinación de la FL, hemos utilizado concentraciones muy altas de CsA, con objeto de obtener concentraciones libres *in vitro* por encima de los 50 ng/mL (que están dentro del rango de detección de los técnicas habituales). El uso de concentraciones tan altas no modifica la FL ya que hasta los 20.000 ng/mL la FL de CsA permanece constante, a pesar de los cambios en la concentración de CsA plasmática total, porque la unión de esta a las proteínas plasmáticas no se satura por debajo de esta concentración ²⁷⁰.

La manipulación y medición *in vitro* de la CsA es difícil debido a su alta liposolubilidad, que hace que gran parte de ella quede adherida a las paredes de los instrumentos utilizados, sobre todo cuando la superficie de contacto con el fármaco es de plástico. Por esa razón, cuando la diálisis de equilibrio se realiza en cámaras fabricadas en plástico alrededor del 98% de la CsA total queda adherida a las paredes de la cámara, a la membrana de diálisis, y a la arandela de caucho utilizada para obtener la estanqueidad; la consecuencia es la obtención de resultados falsos. Este inconveniente queda minimizado cuando se utilizan cámaras de diálisis fabricadas en acero inoxidable, ya que sólo un 10 % de la CsA total

queda adherida a la membrana y a la arandela y no hay adherencia a las paredes de la cámara. Esta es la justificación de que hayamos utilizado cámaras de acero inoxidable para la diálisis de equilibrio ¹⁴⁵.

Puesto que no existe en el mercado ninguna cámara de diálisis de equilibrio para la separación de fármaco libre, fabricada en acero inoxidable, hemos diseñado y patentado el modelo que se ha utilizado en este estudio y que está descrito en el apartado 1.3.1.

Antes de su uso hemos comprobado que todas las cámaras son estancas. No obstante, durante la diálisis desaparece, aproximadamente 1/3 del volumen inicial; este hecho también ha sido observado por otros investigadores y se atribuye a la evaporación ²⁷². Esta merma en el volumen no tiene influencia en la FL de CsA, porque, como se ha indicado antes, es independiente de la CT ²⁷⁰.

Para medir la concentración de CsA, hemos utilizado la técnica de FPIA con el autoanalizador TDx de Abbott por su sencillez y fiabilidad, cualidades que lo han convertido en una de las técnicas más recomendadas para medir CsA ¹⁶⁶. Sin embargo esta técnica no dispone de reactivos específicos para CsA libre.

Cuando se mide la concentración de CsA que hay en el buffer con esta técnica, utilizando los reactivos para plasma/suero suministrados por

Abbott y siguiendo sus indicaciones de uso, el valor obtenido es muy inferior al real, probablemente por las diferentes características físico-químicas que tienen plasma y buffer. Para minimizar esas diferencias, antes de realizar la medición de la CsA hemos añadido al buffer procedente de la diálisis de equilibrio, una parte alícuota de plasma libre de fármacos procedente del mismo voluntario; con ello se logra que la composición de la muestra de la solución plasma-buffer sea lo mas parecida a la del plasma. Además, para realizar mediciones más exactas hemos utilizado una curva de calibración específica para esta solución plasma-buffer . En la prueba realizada para validar el método se ha comprobado la fiabilidad del mismo, y que su porcentaje de precisión es semejante al que facilita el laboratorio fabricante del reactivo para el análisis en plasma ²⁷³.

En nuestro estudio hemos constatado que la FL de la CsA tienen una gran variabilidad interindividual con valores que van desde 0,99% hasta el 2,33%, con media del 1,4%. Estos datos coinciden con los observados por otros investigadores en estudios previos, con valores entre el 0,5% y 4,2% con media del 1,3%, lo que supone una variabilidad interindividual de hasta 8 veces ^{129,144,146}. El patrón lipoproteico de los voluntarios del estudio es muy variado, lo que coincide con los estudios

realizados en la población general en los que dicho patrón varia ampliamente dependiendo de los factores que lo modifican (edad, sexo, dieta, hiperlipemias, tiempo de ayuno, etc.), siendo mayor la variación en los pacientes trasplantados ^{274,275}. Teniendo en cuenta que la FL de la CsA no se altera con los cambios de su concentración plasmática total siendo su única fuente de variabilidad de la cantidad y calidad de las diversas proteínas plasmáticas, sobre todo de las lipoproteínas a las que se une el 80 % de la CsA libre. Esta diversidad de patrones lipoproteicos podría explicar la gran variabilidad interindividual de la FL de la CsA ^{138,143-146}

En nuestro estudio hemos comprobado que existe una correlación inversa entre la concentración de las fracciones lipoproteicas y la FL de la CsA. Esta correlación es más marcada para la LDL y VLDL que para la HDL-Colesterol, aunque ninguna de ellas es significativa, por lo que deducimos que la mayor influencia de una u otra fracción dependerá sobre todo de su cantidad y no de su calidad. También hemos encontrado el mismo tipo de correlación entre las apoproteínas A1 y B, y la FL de la CsA, aunque tampoco ésta es significativa.

Algunos investigadores han intentado predecir la FL de la CsA mediante la determinación de la CT y de las concentraciones de eritrocitos, triglicéridos y colesterol, pero en ninguno de los tres casos la correlación obtenida fue estadísticamente significativa. En consecuencia

estos parámetros bioquímicos no resultaron útiles para conseguir la predicción antes señalada ^{138,143}.

En nuestro estudio hemos intentado predecir la FL de la CsA basándonos en las concentraciones plasmáticas del fármaco y las concentraciones plasmáticas de algunas fracciones lipoproteicas (HDL, LDL, VLDL - colesterol) y de las apoproteína A1 y B. Los resultados obtenidos demuestran que estos parámetros bioquímicos no presentan una correlación estadísticamente significativa con la FL y, por tanto, no es posible utilizarlos para predecirla.

Al contrario que nosotros, un estudio anterior comparando los mismos parámetros bioquímicos con la FL de la CsA, demostró una correlación inversa estadísticamente significativa entre la FL y la concentración de HDL-Colesterol, y entre la FL y concentración plasmática de Apoproteína A1 ¹⁴⁶. La diferencia de resultados entre ambos trabajos se debe a los diferentes criterios seguidos en los mismos. En el anterior se midieron los valores de los parámetros bioquímicos y los de la FL de la CsA durante un periodo de tiempo, después se calcularon los valores medios individuales de cada parámetro bioquímico y se correlacionó con el valor medio individual de la FL. Utilizando este criterio se puede conocer cual es la tendencia en el tiempo de los parámetros utilizados y si existe correlación entre dichas tendencias.

En nuestro estudio lo que hemos correlación son los valores de estos parámetros bioquímicos con la FL de la CsA obtenida de una misma muestra. Este criterio nos permite conocer cual es la influencia de cada uno de estos parámetros sobre la FL.

VI. CONCLUSIONES.

1.- La cámara de diálisis de acero inoxidable patentada por nosotros es totalmente estanca.

2.- Esta cámara de diálisis permite separar la CsA libre de la unida a proteínas de forma reproducible.

3.- La diálisis de equilibrio efectuada con nuestro cámara permite determinar con fiabilidad la FL de la CsA.

4.- A pesar de la simplificación metodológica que hemos efectuado para la obtención de la FL de CsA, sigue siendo compleja para recomendar su uso rutinario.

5.- Existe una correlación inversa entre las fracciones lipoproteicas HDL, LDL y VLDL, y la FL de la CsA.

6.- Existe una correlación inversa entre las apoproteínas A1 y B, y la FL de CsA.

7.- El tipo de lipoproteína tiene poca influencia en la variabilidad interindividual de la FL de la CsA.

8.- Las concentraciones plasmáticas de las lipoproteínas (HDL, VDL, LVDL - Colesterol) no resultan útiles para predecir la FL de la CsA.

9.- Las concentraciones plasmáticas de las apoproteínas A1 y B, tampoco resultan útiles para predecir la FL de la CsA.

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1 Borel J F : Editorial: Cyclosporin And Its Future. Prog. allergy. 1986; 38: 9 - 18.
- 2 Dreyfuss M, Harrie E, Hoffmann H, et al ... :Cyclosporin A And C. Eur. J. Appl. Microbiol. 1976; 3 : 125 - 127.
- 3 Wenger R : Synthesis Of Cyclosporine And Analoges: Structure, Activity, Relationships Of New Cylosporine Derivatives. Transplant. Proc.1983; 15 (Supple-1): 2230 - 2241.
- 4 Borel J F, Ferre C, Gubler H U, et al ... : Biological Effects Of Cyclosporin A: A New Antilymphocytic Agent. Agents Actions. 1976; 6: 32 - 440.
- 5 Kahan B D : Pharmacokinetics And Phamacodynamics Of Cyclosporine. Transplant. Proc. 1989; 21 (Supple-1): 9 - 15.
- 6 The Canadian Multicentre Transplant Study Group. :A Randomized Clinical Trial Of Cyclosporine In Cadaveric Renal Transplantation. N. Engl. J. Med. 1983; 309: 809 - 815.
- 7 Oyer P E, Stinson F R, Jamieson S W, et al .. : Cyclosporine In Cardiac Transplantation: A 2 1/2 Year Follow-Up. Transplan. Proc. 1983; 15: 2546 - 2552.
- 8 Storb R, Deeg H J, Whitehead J, et al : Metrotexate And Cyclosporine Compare Whit Cyclosporine alone For Prophylaxis Of Acute Graft Versus Host Disease After Bone Marrow

- Transplantation For Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1986; 14: 729 - 735.
- 9 Shaw L M, Bowers L, Demers L, et al ... : Critical Issues In Cyclosporine Monitoring: Report Of The Task Force On Cyclosporine Monitoring. *Clin. Chem.* 1987; 33: 1269 - 1288.
 - 10 Kahan B D : Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* 1989; 21: 1725 - 1736.
 - 11 Rügger A, Kuhn M, Lichti H, et al : Cyclosporin A, Ein Immunosuppressiv Wirksamer Peptidmetabolit Aus Trichoderma Polysporum Rifai. *Helv. Chim. Acta.* 1976; 59: 1075 - 1092.
 - 12 Petcher T J, Weber H P, Rügger A : Crystal And Molecular Structure Of Iodo-Derivative Of The Cyclic Undecapeptide Cyclosporin. *Helv. Chim. Acta.* 1976; 59: 1480 - 1488.
 - 13 Loosli H R, Kessler H, Oschkinat H et al ... : The Conformation Of Cyclosporin A In The Crystal And In Solution. *Helv. Chim. Acta.* 1985; 68: 682 - 704.
 - 14 Werger R : Cyclosporine: Conformation And Analogues As Tools For Studying Its Mechanism Of Action. *Transplant. Proc.* 1988; 20 (Supple.-2): 313 - 318.
 - 15 Bowers L D, Matthews S E : Investigation Of The Mechanisms Of Peak Broadening Observed In The High-Performance Liquid

- Chromatographic Analysis Of Cyclosporine. *J. Romatogr.* 1985;
333: 231 - 238.
- 16 Maurer G : Metabolism Of Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1985;
17 (Supple-1): 19 - 25.
- 17 Maurer G, And Lemaire M : Biotransformation And Distribution
In Blood Of Cyclosporine And Its Metabolites. *Transplant. Proc.*
1986; 18 (Supple--5): 25 - 34.
- 18 Kobel H, Loosli H R, Voges R : *Experientia* 1983; 39: 873 - 876.
- 19 Maurer G, Loosli H R, Schreier E, et al ... : Disposition Of
Cyclosporine In Several Species And Man. Structural Elucidation
Of Its Metabolites. *Drug. Metab. Dispo.* 1984; 12: 120 - 124.
- 20 Hartman N R, Trimble L A, Veredas J C, et al: *Biochem. Biophys.*
Res. Commun 1985; 133: 964 -966.
- 21 Hashem H, Ventakataramanan R, Burckart G J, et al :
Identification Of The aldehyde Metabolites. *Transplant. Proc.*
1988; 20 (Supple.-1): 176 - 178.
- 22 Roesel T R, Martin G E, Kahan B D : Isolation And
Characterization Of Three Immunosuppressive Cyclosporine
Metabolites. *Surg. Forum.* 1985; 36: 333 - 338.
- 23 Roesel T R, And Kahan B D : Thin-Layer Chromatographic
Detection Of Cyclosporine And Its Metabolites In Whole Blood

Using Rhodamine B And alfa-Ciclodextrin. Transplantation.
1987; 43: 274 - 281.

- 24 Roesel T R, Legrue S J, Liehr J, And Kahan B D : Isolation And In Vitro Characterization Of A Novel Immunosuppressive Cyclosporine Metabolite. Transplantation. 1989; 47: 149 - 156.
- 25 Henricsson S, Lindholm A, And Johansson A : Identification Of Sulfate Conjugate Of Cyclosporin. Transplant. Proc. 1989; 21: 837 - 838.
- 26 Wallemacq P E, Lhoëst G, Latinme D, And De Bruyère M : Isolation, Characterization And In Vitro Activity Of Human Cyclosporin A Metabolites. Transplant. Proc. 1989; 12: 906 - 910.
- 27 Nagelkerke J F, Tijdens R B, Schwarz E P, et al : Toxicology. 1987; 47: 277- 280.
- 28 Bell J I, Denny D W, And Mcdevitt H O : Structure And Polymorphism Of Murine And Human Class Ii Major Histocompatibility Antigens. Immunolol. Rev. 1985; 84: 51 - 53.
- 29 Bjorkmam P J, Saper M A, Samraoui B, et al : Structure Of The Human Class I Histocompatibility Antigen, Hla-A2. Nature. 1987; 329: 506 - 508.

- 30 Jordan B R, Caillol D, Damotte M, et al : Hla Class I Genes: From Structure To Expression, Serology And Function. Immunol. Rev. 1985; 84: 73 - 76.
- 31 Korman J, Boss J M, Spies T, et al : Genetic Complexity And Expression Of Human Class Ii Histocompatibility Antigens. Immunol. Rev. 1985; 85: 45 - 48.
- 32 Dupont B : Nomenclature For Factors Of The Hla System. Hum. Immunol. 1989; 26; 3 - 7.
- 33 Bjorkman P J, Saper M A, Samraoui B, et al : The Foreign Antigen Binding Site And T Cell Recognition Regions Of Class I Histocompatibility Antigens. Nature. 1987; 329: 512 - 514.
- 34 Brown J H, Jardetzky T, Samper M, et al ... : A Hypotetical Model Of The Foreign Antigen Binding Site Of Class Ii Histocompatibility Molecules. Nature. 1988; 332: 845 - 847.
- 35 Schwartz R H : T-Lymphocyte Recognition Of Antigen In Association With Gene Products Of The Major Histocompatibility Complex. Ann. Rev. Immunol. 1985; 3: 237 - 239.
- 36 Takeuchi Y, Horiuchi T, Sugimoto T, et al ... : Effects Of Cyclosporin A On T-Cell Development In Organ-Cultured Foetal Thymus. Immunology. 1990; 71: 158 - 165.

- 37 Jenkins M K, Schwartz R H, Pardoll D M : Effects Of Cyclosporine A On T-Cell Development And Clonal Deletion. *Science*. 1988; 241: 1655 - 1658.
- 38 Dos Reis G A, And Shevach E M : Effects Of Cyclosporin A On T Cell Funtion In Vitro: The Mechanismo Of Suppression Of Tcell Proliferration Depend On The Nature Of The T Cell Stimulus As Well As The Differentiation State Of The Responding T Cell. *J. Immunolol*. 1982; 129: 2360 - 2367.
- 39 Foxwell B M J, Simon J, Herrero J, et al : Anti-Cd3 Antibody-Induced Expression Of Both P55 And P75 Chains Of The High Affinity Interleukin-2 Receptor On Human T Lymphocytes Is Inhibited By Cyclosporin A. *Immunology*. 1990; 69: 104 - 109.
- 40 Norin A J, And Kamholz S L : Evidence Of Intregraft Interleukin-2-Activated Kille Cells And allospecific Cytolytic T Lymphocytes In Rejecting Lung allografts. *Transplantation*. 1989; 48: 856 - 862.
- 41 Larsson E L : Cyclosporin A And Dexamethasone Suppress T Cell Resposes By Selectively Acting At Distinct Sites Of The Triggering Process. *J. Immunol*. 1980; 124: 2828 - 2833.
- 42 Hess D H, And Tutschka P J : Effect Of Cyclosporin A On Human Lymphocyte Resposes In Vitro I. Csaallows For The Expression Of alloantigen-Activated Suppressor Cells While Preferentially

Inhibiting The Induction Of Cytolytic Effector Lymphocytes In Mlr.
J. Immunol. 1980; 124: 2601 - 2608.

- 43 Hess D H, Tutschka P J, And Santos G W : Effect Of Cyclosporin A On Human Lymphocyte Responses In Vitro Ii. Induction Of Specific alloantigen Unresponsiveness Mediated By A Nylon Wool Adherent Suppressor Cell. J. Immunol. 1981; 126: 961 - 968.
- 44 Hess D H, Tutschka P J, And Santos G W : Effect Of Cyclosporin A On Human Lymphocyte Responses In Vitro Iii. Csa Inhibits The Production Of T Lymphocyte Growth Factors In Secondary Mixed Lymphocyte Responses But Does Not Inhibit The Response Of Primed Lymphocytes To TcGF. J. Immunol. 1982; 128: 355 - 359.
- 45 Hess D H, Tutschka P J, Zhang, And Santos G W : Effect Of Cyclosporin A On Human Lymphocyte Responses In Vitro Iv. Production Of T Cell Stimulatory Growth Factors And Development Of Responsiveness To These Growth Factors In Csa-Treated Primary Mlr Cultures. J. Immunol. 1982; 128: 360 - 367.
- 46 Wang B S, Heacock E H, Collins K H, et al : Suppressive Effects Of Cyclosporin A On The Induction Of alloreactivity In Vitro And In Vivo. J. Immunol. 1981; 127: 89 - 94.

- 47 Wang B S, Heacock E H, Collins K H, et al : Evidence For The Presence Of Suppressor T Lymphocytes In Animals Treated With Cyclosporin A. J. Immunol. 1982; 128: 1382 - 1385.
- 48 Reem G H, Cook L A, Palladino M A : Cyclosporine Inhibits Interleukin-2 And Interferon Gamma Synthesis By Human Thymocytes. Transplant. Proc. 1983; 15: 2387 - 2389.
- 49 Kalman V K, Klipel G R : Effects Of Cyclosporine On The Production Of Various Interferons. Transplant. Proc. 1983; 15: 2383 - 2386.
- 50 Abb J, Abb H : Effects Of Cyclosporine On Human Leukocytes Interferon Production: Selective Inhibition Of Ifn-Gamma Synthesis. Transplant. Proc. 1983; 15: 2380 - 2382.
- 51 Thomson A W, Moon D K, Geczy C L, et al ... : Cyclosporine And Lymphokines Affecting Macrophage Behavior. Transplant. Proc. 1983; 15: 2390 - 2393.
- 52 Drath D B, Kahan B D : Pulmonary Macrophage And Polymorphonuclear Leukocyte Function In Response To Immunosuppressive Therapy. Transplant. Proc. 1983; 15: 2367 - 2372.
- 53 Rios A, Toledo-Pereyra L H, Buscetta S : Effects Of Cyclosporine alone Or Combined With Prednisone Or Azathioprine On

- Macrophage Phagocytosis. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2373 - 2375.
- 54 Dos Reis G A, And Shevach E M : Cyclosporin A-Treated Guinea Pig Responder Cells Secrete A Genetically Restricted Factor That Suppresses The Mixed Leukocytes Reaction. *J. Clin. Invest.* 1983; 71: 165 - 169.
- 55 Mohagheghpour N, Benike C L, Kansas G, et al ... : Activation Of Antigen-Specific Suppressor T Cells In The Presence Of Cyclosporin Requires Interactions Between T Cells Of Inducer And Suppressor Lineage. *J. Clin. Invest.* 1983; 72: 2092 - 2100.
- 56 Sakamoto K, Ochiati T, Shinohara N, et al ... : Suppressor Cells In Cyclosporin-Induced Long-Term Graft Acceptance In The Rat. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2340 - 2342.
- 57 Yokimura N, Oka T, Onihori Y, et al : Induction Of Suppressor T Lymphocyte In Mice Treatred With Cyclosporin. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2334 - 2339.
- 58 White D J G, Davies H S, Kamada N, et al ... : Potencial For Tolerance Induction With Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2278 - 2284.

- 59 Ryffel B, Donatsch P, Götz U, And Tschopp M : Cyclosporin Receptor On Mouse Lymphocytes. *Immunology*. 1980;41: 913 - 919.
- 60 Ryffel B, Götz U, And Heuberger B : Cyclosporin Receptors On Human Lymphocytes. *J. Immunol*. 1982; 129: 1978 - 1982.
- 61 Legrue S J, Friedman A W, And Kahan B D : Binding Of Cyclosporine By Human Lymphocytes And Phospholipid Vesicles. *J. Immunol*. 1983; 131: 712 - 718.
- 62 Merker M M, And Handschumacher R E : Uptake And Nature Of The Intracellular Binding Of Cyclosporin A In Murine Thymoma Cell Line, Bw5147. *J. Immunol*. 1984; 132: 3064 - 3070.
- 63 Van Wauweij P, De Mey J R, And Goossens J G : Okt3: A Monoclonal Anti-Human T Lymphocyte Antibody With Potent Mitogenic Properties. *J. Immunol*. 1980; 124: 2708 - 2710.
- 64 Palacios R : Mechanism Of T Cell Activation: Role And Functional Relationship Of Hla-Dr Antigens. *Immunol. Rev.* 1982; 63: 19 - 22.
- 65 Handschumacher E, Harding M W, Rice J, et al ... : Cyclophilin: A Specific Cytosolic Binding Protein For Cyclosporin A. *Science*. 1984; 226: 544 - 546.

- 66 Harding M W, Handsshumacher R E, Speicher D W : Isolation And Amino Acid Sequence Of Cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 8547 - 8550.
- 67 Harding M W, And Handsshumacher R E : Cyclophilin, A Primary Molecular Target For Cyclosporine. *Transplantation.* 1988; 46: 29 -35.
- 68 Quesniaux V J, Wenger M H, Hiestand P C, et al : Cyclosporin Binds To The Region Of Cyclosporine Involved In Its Immunosuppressive Activity. *Eur. J. Immunol.* 1987; 17: 1359 - 1365.
- 69 Quesniaux V J, Wenger M H, Hiestand P C, et al : Molecular Characteristics Of Cyclophili-Cyclosporine Interaccion. *Transplantation.* 1988; 46: 23 - 28.
- 70 Agarwal R P, Mcperson R A, And Threatte G A : Evidence Of Cyclosporin-Binding Protein In Human Erythrocytes. *Transplantation.* 1986; 42: 627 - 632.
- 71 Klee C B, Crouch T H, And Krinks M H : Calcineurin: A Calcium- And Calmoduling-Binding Proteing Of The Nervous System. *Proc. Natl.Acad. Sci. Usa.* 1979; 76: 6270 - 6273.

- 72 Colombani P M, Robb A, Hess A D : Cyclosporin A Binding To Calmodulin: A Possible Site Of Action On Y Lymphocytes. *Science*. 1985; 228: 337 - 339.
- 73 Legrue S J, Turner R, Weisbrodt N, Dedman J R : Does The Binding Of Cyclosporine To Calmodulin Result In Immunosuppression ?. *Science*. 1986; 234: 68 - 71.
- 74 Hait W N, Harding M W, Handchumacher R E : Calmodulin, Cyclophilin, And Cyclosporin A. *Science*. 1986; 233: 987 - 988.
- 75 Foxwell B M J, Hiestand P C, Wenger R, And Ryffel B : A Comparison Of Cyclosporine Binding By Cyclophilin And Calmodulin And The Identification Of A Novel 45 Kd Cyclosporine-Binding Phosphoprotein In Jurkat Cells. *Transplantation*. 1988; 46: 35 - 40.
- 76 Ryffel B, Woerly G, Greiner B, et al : Distribution Of The Cyclosporine Binding Protein Cyclophilin In Human Tissues. *Immunology*. 1991; 72: 399 - 404.
- 77 Koletsky A J, Harding M W, And Handchumacher R E : Cyclophilin: Distribution And Variant Properties In Normal And Neoplastic Tissues. *J. Immunol.* 1986; 137: 1054 - 1059.

- 78 Tropshung M, Barthelmess I B, And Neupert W : Sensitivity To Cyclosporin A Is Mediated By Cyclophilin In Neurospora Crassa And Saccharomyces Cerevisiae. *Nature*. 1989; 342: 953 - 955.
- 79 Lang K, Schmid F X, And Fischer G : Catalysis Of Protein Folding By Prolyl Isomerase. *Nature*. 1987; 329: 268 - 270.
- 80 Takahashi N, Hayano T, And Suzuki M : Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerasa Is The Cyclosporin A-Biding Protein Cyclophilin. *Nature*. 1989; 337: 473 - 475.
- 81 Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, et al : Cyclophilin And Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerasa Are Probably Identical Protein. *Nature*. 1989; 337: 476 - 478.
- 82 Ptachcinski P J, Venkataramanan R, Rosenthal J T, et al .. : Cyclosporine Kinetics In Renal Transplantation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1985; 38: 296 - 300.
- 83 Beveridge T, Gratwohl A, Michot F, et al ... : Cyclosporin A: Pharmacokinetics After A Single Dose In Man Serum Levels After Multiple Dosing In Recipients Of allogenic Bone Marrow Grafts. *Current. Therapeutic. Research*. 1981; 30: 5 - 17.
- 84 Newberger J, Kahan B D : Cyclosporine Pharmacokinetic In Man. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2413 - 2415.

- 85 Phillips T M, Karmi S A, Frantz S C, And Henriques H F :
Absorption Profiles Of Renal allograft Recipients Receiving Oral
Doses Of Cyclosporine: A Pharmrcokinrtic Study. Transplant.
Proc. 1988; 20 (Supple-4): 457 - 461.
- 86 Ptachcinski R,J, Burckart G J, Rosenthal J T, et al :
Cyclosporine Pharmacokinetics In Children Following Cadaveric
Renal Transplantation. Transplant. Proc.1986; 18: 766 - 767.
- 87 Wood A J, Maurer G, Niederberger W, et al.... : Cyclosporine:
Pharmacokinetics, Metabolims, And Drug Interactions. Transplant.
Proc. 1983; 15 (Supple-1): 2409 - 2412.
- 88 Venkataramanan R, Burckart G J, Ptachcinski R,J, et al .. :
Cyclosporine Pharmacokinetics In Heart Transplant Patiens.
Transplant. Proc.1986; 18: 768 - 770.
- 89 Burkart G, Starzl T, Williams L, et al : Cyclosporine Monitoring
And Pharmacokinetics In Pediatric Liver Transplant Patiens.
Transplant. Proc.1985; 17: 1172 - 1175.
- 90 Burckart G J, Venkataramanan R, Ptachinski R,J, et al :
Cyclosporine Absortion Following Orthotopic Liver
Transplantation. J. Clin. Pharmacol. 1986; 26: 647 - 651.

- 91 Keown P A, Stiller C R, Stawecki M, et al ... : Pharmacokinetics Of Cyclosporine In Solid Organ Transplantation. *Transplant. Proc.* 1986; 18 (Supple-5): 160 - 164.
- 92 Yee G C, Mcguire T R, Gmur D J, et al : Blood Cyclosporine Pharmacokinetics In Patients Undergoins Marrow Transplantation. *Transplantation* 1988; 46: 399 - 402.
- 93 Yee G C, Lennon T P, Gmur D J, et al : Age-Dependen Cyclosporine: Pharmakinetics In Marrow Transplant Recipients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1986; 40: 438 - 443.
- 94 Atkinson K, Biggs J C, Britton K, et al ... : Oral Administration Of Cyclosporin A For Recipients Of allogenic Marrow Transplant: Implications Of Clinical Gut Dysfuntion. *B. J. Haematol.* 1984; 56: 223 - 231.
- 95 Ptachcinski R J, Venkataramanan R, And Burckart G J : Clinical Pharmacokinetics Of Cyclosporin. *Clin. Pharmacol.* 1986; 11: 107 - 132.
- 96 Burckart G J, Venkataramanan R, Ptachcinski R J, et al .. : Cyclosporine Pharmacokinetic Profiles In Liver, Heart, And Kidney Transplant Patients As Determined By Hihg-Performance Liquid Chromatography. *Transplant. Proc.* 1986; 18 (Supple-5): 129 - 136.

- 97 Kahan B D, And Grevel J : Optimization Of Cyclosporine Therapy In Renal Transplantation By A Pharmacokinetic Strategy. Transplantation. 1988; 46: 631 - 644.
- 98 Wandstrar L T, Schroeder T J, And Myre S A : Cyclosporine Pharmacokinetics In Pediatric Transplant Recipients. Ther. Drug. Monit. 1989; 11: 493 - 496.
- 99 Keown P A, Stiller C R, Laupacis A L, et al : The Effects And Side Effects Of Cyclosporine: Relationship To Drug Pharmacokinetics. Transplant. Proc. 1982; 14: 659 - 661.
- 100 Keown P A, Stiller C R, Sinclair N R, et al ... : The Clinical Relevance Of Cyclosporine Blood Levels As Measured By Radioimmunoassay. Transplant. Proc. 1983; 15: 2438 - 2441.
- 101 Ptachcinski R J, Venkataramanan R, Rosenthal J T, et al .. : The Effect Of Food On Cyclosporine Absorption. Transplantation 1985; 40: 174 - 176.
- 102 Wood A J, And Lemaire M : Pharmacologic Aspects Of Cyclosporine Therapy: Pharmacokinetics. Transplant. Proc. 1985; 17 (Supple-1): 27 - 32.
- 103 Johnston A, Marsden J T, Hla K K, et al : The Effect Of Vehicle On The Oral Absorption Of Cyclosporin. Br J. Clin. Pharmac. 1986; 21: 331 - 333.

- 104 Gupta S K, Bakran A, Solomon L R, et al : How Reliable Is Cyclosporin A Absorption ?. *Biophar. Pharmacol. Proc.* 1987; 3: 418 - 424.
- 105 Mehta M U, Venkataramanan R, Burkart B J, et al : Effect Of Bile On Cyclosporine Absorption In Liver Transplant Patients. *Br. J. Pharmac.* 1988; 25: 579 - 584.
- 106 Andrews W, Iwatsuki S, Shaw J R :Letter To Editor. *Transplantation* 1985; 39: 338 - 338.
- 107 Venkataramanan R, Ptachcinski R J, Burkart G J, et al ... : Cyclosporine Bioavailability In Liver Disease. *Drug. Intell. Clin. Pharm.* 1985; 19: 451 - 453.
- 108 Venkataramanan R, Starzl T E, Yang S, et al ... : Biliary Excretion Of Cyclosporine In Liver Transplant Patients. *Transplant. Proc.* 1985; 17: 286 - 289.
- 109 Busuttil R W, Goldstein L I, Danovitch M, et al : Liver Transplant Today. *Annals Of Internal Medicine* 1986; 104: 337 - 389.
- 110 Rodighiero V :Therapeutic Drug Monitoring Of Cyclosporin: Practical Applications And Limitations. *Clin. Pharmacol.* 1989; 16: 27 - 37.

- 111 Atkinson K, Britton K, Paull P, et al : Detrimental Effect Of Intestinal Disease On Absorption Of Orally Administered Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 2446 - 2449.
- 112 Andrews W, Fyock B, Gray S, et al : Pediatric Liver Transplantation: The Dallas Experience. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 3267 - 3276.
- 113 Kahan B D, Kramer W G, Wideman C, et al : Demographic Factors Affecting The Pharmacokinetics Of Cyclosporine Estimated By Radioimmunoassay. *Transplantation* 1986; 41: 459 - 464.
- 114 Kahan B D, Kramer W G, Wideman C, et al : Pharmacokinetics Of Cyclosporine In Human Renal Transplant. *Transplant. Proc.* 1983; 15: 446 - 453
- 115 Odland B, Lindberg A, Tufveson G, et al : Longitudinal Study Of The Pharmacokinetics Of Cyclosporine Before And After Renal Transplantation. *Transplant. Proc.* 1986; 18: 47 - 49.
- 116 Keown P A, Stiller C R, Unlan R A, et al ... : Immunological And Pharmacological Monitoring In The Clinical Use Of Cyclosporin A. *Lancet* 1981; 1: 686 - 689.
- 117 Follath F, Wenk M, Vozeh S, et al : Intravenous Cyclosporine Kinetics In Renal Failure. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1983; 34: 641 - 643.

- 118 Ptachcinski R J, Venkataramanan R, Burkart G J, et al ... :
Cyclosporine Kinetics In Normal Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*
1987; 27: 243 - 248.
- 119 Beveridge T, Gratwohl A, Michot F, et al : Cyclosporin
A: Pharmacokinetics After A Single Dose In Man And Serum Levels
After Multiple Dosing In Recipients Of allogenic Bone Marrow
Grafts. *Curr. Ther. Res.* 1981; 30: 5 - 18.
- 120 Niederberger W, Lemaire M, Maurer G, et al : Distribution And
Binding Of Cyclosporine In Blood And Tissues. *Transplant. Proc.*
1983; 15 (Supple-1): 2419 - 2421.
- 121 Atkinson K, Boland J, Britton K, And Biggs J : Blood And Tissue
Distribution Of Cyclosporine In Humans And Mice. *Transplant.*
Proc. 1983; 15 (Supple-1): 2430 : 2433.
- 122 Ried M, Gibbons S, Kwok D, et al : Cyclosporine Levels In
Human Tissues Of Patients Treated For One Week To One Year.
Transpl. Proc. 1983; 15 (Supple-1): 2434 - 2437
- 123 Kahan Bd, Van Burren Ct, Boileau M, et al : Levels In
Cadaveric Renal allograft Recipient. *Transplantation* 1983; 35: 96
- 99.
- 124 Fazakorley J K, Webb H E : Cyclosporin, Blood Brain Barrier, And
Multiple Sclerosis. *Lancet* 1985; 2: 889 - 890.

- 125 Boland J, Atkinson K, Britton K, et al ... : Tissues Distribution And Toxicity Of Cyclosporine A In Mouse. *Pathology* 1984; 16: 117-123.
- 126 Flecher S M, Katz A R, Rogers A J, et al : The Presence Of Cyclosporine In Body Tissues And Fluids During Pregnancy. *Am. J. Kidney. Dis.* 1985; 5: 60 - 63.
- 127 Venkataramanan R, Koneru B, Wang C P, et al ... : Cyclosporine And Its Metabolites In Mother And Baby. *Transplantation* 1988; 5: 468 - 469.
- 128 Britton K, Atkinson K, And Biggs J : Distribution Of Cyclosporine A In Human Blood. *Transplant. Proc.* 1984; 16: 961 - 962.
- 129 Lemaire M, And Tillement J P : Role Of Lipoproteins And Erythrocytes In The In Vitro Binding And Distributions Of Cyclosporin A In The Blood. *J. Pharm. Pharmacol.* 1982; 34: 715 - 718.
- 130 Atkinson K, Britton K, Biggs J : Distribution And Concentration Of Cyclosporine A In Human Blood. *J. Clin. Pathol.* 1984; 37: 1167 - 1171.
- 131 Hamberger C, Urien S, Barre J, et al : Distribution Of Cyclosporin A Between Blood Cells And Plasma Of Cardiac And

- Renal Transplant Recipients. *Ther. Drug. Monit.* 1988; 10: 28 - 33.
- 132 Mraz W, Reble B, Kemkes B M, Knedel M : The Role Of Lipoproteins In Exchange And Transfer Of Cyclosporine; Results From In Vitro Investigations. *Transplant. Proc.* 1986; 18: 1281 - 1284.
- 133 Yatscoff R W, Rush D N, And Jeffery J R : Effects Of Sample Preparation On Concentrations Of Cyclosporin A Measured In Plasma. *Clin. Chem.* 1984; 30: 1812 - 1814.
- 134 Rosano T G : Effects Of Hematocrit On Cyclosporine (Cyclosporin A) In Whole Blood And Plasma Of Renal-Transplant Patients. *Clin. Chem.* 1985; 31: 410 - 412.
- 135 Johnston A, Marsden J T, Holt D W : The Influence Of Hematocrit On Blood Cyclosporin Measurements In Vivo. *Br. J. Pharmac.* 1988; 25: 509 - 513.
- 136 Agarwal R P, Mcphearson R A, And Threatte G A : Assessment Of Cyclosporin A In Whole Blood And Plasma In Five Patients With Different Hematocrits. *Ther. Drug. Monit.* 1985; 7: 61 - 65.
- 137 Agarwal R P, Threatte G A, And Mcphearson R A : Temperature-Dependent Binding Of Cyclosporine To And Erythrocyte Protein. *Clin. Chem.* 1987; 33: 481- 485.

- 138 Legg B, Gupta S K, And Rowland M : A Model To Account For The Variation In Cyclosporin Binding To Plasma Lipids In Transplant Patiens. *Ther. Drug. Monit.* 1988; 10: 20 - 27.
- 139 Sgoutas D, Macmahon W, Jerkunica L : Interaction Of Cyclosporin A With Human Lipoproteins. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986; 38: 583 - 588.
- 140 Mraz W, Zink R A, Graf A, et al ... : Distribution And Transfer Of Cyclosporine Amongthe Varius The Human Lipoprotein Classes. *Transplant. Proc.* 1983; 15 (Supple-1): 2426 - 2429.
- 141 Gurecki J, Warty V, Sanghvi A : The Transport Of Cyclosporine In Association With Plasma Lipoproteins In Heart And Liver Transplant Patiens. *Transplant. Proc.* 1985; 17 (Supple-4): 1997 - 2002.
- 142 Hughes T A, Gaber A O, And Montgomery C E : Plasma Distribution Of Cyclosporine Within Lipoproteins And "In Vitro" Transfer Betwenen Very-Low-Density Lipoproteins, Low-Density Lipoproteins, And High-Density Lipoproteins. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13: 289 - 295.
- 143 Legg B, And Rowland M : Cyclosporin: Erytrocite Binding And An Examination Of Its Use To Estimate Ubound Concentration. *Ther. Drug. Monit.* 1988; 10 : 16 - 19.

- 144 Legg B, And Rowland M : Cyclosporin: Measurement Of Fraction Unbound In Plasma. *J. Pharm. Pharmacol.* 1987; 39: 599 - 603.
- 145 Henricsson S : A New Method For Measuring The Free Fraction Of Cyclosporin In Plasma By Equilibrium Dialysis. *J. Pharm. Pharmacol.* 1986; 39: 384 -385.
- 146 Lindholm A, And Henricsson S : Intra-And Interindividual Variability In The Free Fraction Of Cyclosporine In Plasma In Recipients Of Renal Transplants. *Ther. Drug Monit.* 1989; 11: 623 - 630.
- 147 Awni Wm, Kasiske Bl, Heim-Duthoy K, et al :Long-Term Cyclosporine Pharmacokinetic Change In Renal Transplant Recipients: Effects Of Binding And Metabolism. *Clin. Pharmacol.Ther.* 1989; 45: 41 - 48
- 148 Rosano Tg, Freed Bm, Cerilli J, And Lempert N.: Immunosuppressive Metabolites Of Cyclosporine In The Blood Of Renal allograft Recipients. *Transplantation.* 1986; 42: 262 - 267
- 149 Freed B M, Rosano T G, And Lempert N : In Vitro Immunosuppressive Properties Of Cyclosporine Metabolites. *Transplantation.* 1987; 43: 123 - 127.

- 150 Rosano T G, Freed B M, Pell M A, And Lempert N : Cyclosporine Metabolites In Human Blood And Renal Tissue. *Transplant. Proc.* 1986; 18 (Supple-5): 35 - 40.
- 151 Lensmeyer G L, Wiebe D A, And Carison L H : Distribution Of Cyclosporine A Metaolites Among Plasma And Cells In Whole Blood: Effect Of Temperature, Hematocrit, And Metabolite Concentration. *Clin. Chem.* 1989; 35: 56 - 63.
- 152 Freemand Dj, Laupacis A, Keown Pa , et al : Evaluation Of Cyclosporine-Phenytoin Interaction With Observations On Cyclosporine Metabolites. *Br.. J. Clin. Pharmacol.* 1984; 18: 887-889.
- 153 Lindholm A.: Factors Inluencing The Pharmacokinetics Of Cyclosporine In Man (Rewiew). *Ther .Drug. Monit.* 1991; 17:197 - 207.
- 154 Moochhala S M, Renton K W: Inhibition Of Hepatic Microsomal Drug Metabolism By The Immunosupressive Agents Cyclosporine A. *Biochem. Pharmacol.* 1986; 35: 1499 - 1503.
- 155 Bertault-Peres P, Bonfils C, Fabre G, et al .. : Metabolism Of Cyclosporin A. Ii. Implication Of The Macrolide Antibiotic Cytocrome P-450 3c From Rabbit Liver Microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* 1987; 15: 391 - 398.

- 156 Kronbach T, Ficher V, Meyer U A. : Cyclosporine Metabolism In Human Liver: Identification Of Cytochrome P-450iii Gene Family As The Major Cyclosporine-Metabolizing Enzyme Explains Interactions Of Cyclosporine With Other Drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 1988; 43: 630 - 635
- 157 Combalbert J, Fabre I, Fabre G, et al : Metabolism Cyclosporine A.Iv. Purification And Identification Of The Rifampicin-Inducible Human Liver Cytochrome P-450 (Cyclosporin A Oxidase) As A Product Of P450iii Gene Subfamily. Drug. Metab. Dispos. 1989; 17:197 - 207.
- 158 Gupta Sk, Legg B, Solomon Lr, et al ...: Pharmacokinetics Of Cyclosporin: Influence Of Rate Of Constant Intravenous Infusion In Renal Transplant Patients. Br. J. Clin. Pharmac. 1987; 24: 519 - 526.
- 159 Gupta S K, Bakran A, Johnson R W G, et al .. : Pharmacokinetics Of Cyclosporin: Influence Of Rate-Duration Profile Of An Intravenous Infusion In Renal Transplant Patients. Br. J. Clin. Pharmac. 1989; 27: 353 - 357.
- 160 Grevel J, Welsh Ms, Kahan Bd, et al: Linear Cyclosporine Pharmacokinetics. Clin. Pharmacol. Ther. 1988; 43: 175 - 180.

- 161 Ventakataramanan R, Gray J, Ptachinski Rj. et al :
Cyclosporine Kinetics In Liver Disease. Clin. Pharmacol. Ther.
1985; 37: 234 - 236.
- 162 Yee G C, Kennedy M S, Storb R, et al: Effect Of Hepatic
Dysfunction On Oral Cyclosporine Pharmacokinetics In Marrow
Transplant Patients. Blood 1984; 64: 1277 - 1279.
- 163 Burckart G J, Fricker F J, Ventakataramanan R, et al :
Cyclosporine Kinetics In Pediatric Patients With Congestive Heart
Failure. Transplant. Proc. 1987; 19: 1528 - 1529.
- 164 Burkart G J, Starzl T E, Venkataramanan R, et al .. : Excretion Of
Cyclosporine And Its Metabolites In Human Bile. Transplant. Proc.
1986; 18 (Supple-5): 46 - 49.
- 165 Thomas S E, And Gordon M D. : Cyclosporine. Sth. Med. J.
1986; 79: 205 - 214.
- 166 Kivisto K T. : A Review Of Assay Method For Cyclosporin.
Clinical Implications. Clin. Pharmacokinet. 1992; 23: 173 - 190.
- 167 Tsunoda S M, And Aweeka F T : The Use Of Therapeutic Drug
Monitoring To Optimise Immunosuppressive Therapy. Clin.
Pharmacokinet. 1996; 30:107 - 140.

- 168 Shaw L M, Yatscoff R W, Bower L D, et al ... : Canadian Concensus Meeting On Cyclosporine Monitoring: Report Of The Concensus Panel. Clin. Chem.1990; 36: 1841 - 1846.
- 169 Kahan B D, Shaw L M, Holt D, et al ... : Concensus Document: Hawk's Cay Meeting On Therapeutic Drug Monitoring Of Cyclosporine. Clin. Chem.1990; 36: 1510 - 1516.
- 170 Morris R G, Tett S E, And Ray J E : Cyclosporin A Monitoring In Australia: Concensus Recomendations. Ther. Drug Monit. 1994; 16: 570 - 576.
- 171 Oellerich M, Armstrong V W, Kahan B, et al ... : Lake Louise Concensus Conference On Cyclosporin Monitoring In Organ Transplantation: Report Of The Consensus Panel. Ther. Drug Monit. 1995; 17: 642 - 645.
- 172 Awni W M, Maloney J A : Optimized High-Performance Liquid Cromatographic Method For The Analysis Of Cyclosporine And Tree Of Ist Metabolites In Blood And Urine. J. Cromatogr. 1988; 425: 233 - 236.
- 173 Christians U, Zimmer K O, Wonigeit K, et al : Liquid-Chromatographic Measurement Of Cyclosporin A And Ist Metabolites In Blood, Bile, And Urine. Clin. Chem.1988; 34: 34 - 39.

- 174 Gmur D J, Meier P, Yee G C : Hig-Performance Liquid Chromatographic Column-Switching Method For Two Cyclosporine Metabolites In Blood. J. Cromatogr. 1988; 425: 343 - 352.
- 175 Niederberger W, Scshaub P, And Beveridge T : High-Performance-Liquid-Chromatographic Determination Of Cyclosporin A In Human Plasma And Serum. J. Cromatograf. 1980; 182: 454 - 458.
- 176 Carruthers S G , Freeman D J, Koegler J C, et al.... : Simplified Liquid-Chormatographic Analysis For Cyclosporin A, And Compararison With Radioimmunoassay. Clin. Chem. 1983; 29: 180 - 183.
- 177 Hoffman N E, Rustum A M , Quebbeman E J, et al ... : Hplc Determination Of Cyclosporine In Whole Blood. J. Cromatogr. 1985; 8: 2511 - 2520.
- 178 Annesley T, Matz K, Balogh L, et al : Liquid Chromatographic Analysis Of Cyclosporine Utilizing A Microbore Column And Reduced Specimen Requirement. Clin. Chem. 1986; 32: 1407 - 1409.

- 179 Sawchuk R J, Cartier L L : Liquid Chromatographic Determination Of Cyclosporin A In Blood And Plasma. Clin. Chem. 1981; 27: 1368 - 1371.
- 180 Kahan G C, Shaw L M, Kane M D : Routine Monitoring Of Cyclosporine In Whole Blood And Kidney Tissue Using High-Performance Liquid Chromatography. J. Anal. Toxicol. 1986;10: 28 - 34.
- 181 Yee G C, Gmur D J, And Kennedy M S : Liquid-Chromatographic Determination Of Cyclosporine In Serum With Use Of Rapid Extraction Procedure. Clin. Chem. 1982, 28: 2269 - 2271.
- 182 Leyland-Jones B, Clark A, Kreis W, et al : High Pressure Liquid Chromatographic Determination Of Cyclosporin A In Human Plasma. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 1982; 37: 431 - 444.
- 183 Holt D W, Marsden J T, And Johnston A: Measurement Of Cyclosporine: Metodological Problems. Transplant. Proc. 1986; 18 (Suppl-5): 101 - 110.
- 184 Nussbaumer K, Niederberger W, And Keller H P : Determination Of Cyclosporin A In Blood And Plasma By Column Switching-Hplc After Rapid Sample Preparation. J. High Resol. Cromatogr. And Cromatogr. Commun. 1982; 5: 424 - 427.

- 185 Smith H, Robinson W : Semi-Automated High Performance Liquid Chromatographic Method For The Determination Of Cyclosporin In Plasma And Blood Using Column Switching. *J. Chromatogr.* 1984; 305: 353 - 362.
- 186 Gmur D J, Yee G C, Kennedy M S : Modified Column-Switching High-Performance Liquid Chromatographic Method For The Measurement Of Cyclosporine In Serum. *J. Chromatogr.* 1985; 344: 422 - 427.
- 187 Holt D W, Marsden J T, And Johnston A: Quality Assessment Of Cyclosporine Measurement. Comparison Of Current Methods. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 1234 - 1239.
- 188 Rosenthaler J, Keller H P : Comment On Cyclosporine Assay Techniques: An Attempt For Recommendations. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 1160 - 1165.
- 189 Donatsch P, Abisch E, Homberger M, et al ... : A Radioimmunoassay To Measure Cyclosporin A In Plasma And Serum Samples. *J. Immunoassay.* 1981; 2: 19 - 32.
- 190 Mahoney W C, And Orf J W : Derivatives Of Cyclosporin Compatible With Antibody-Based Assays: I. Generation Of [125-I]-Labeled Cyclosporin. *Clin. Chem.* 1985; 31: 459 - 462.

- 191 Wong P Y, Cheung M, Yip T K, And Mee A V : Use Of [125i]-
Labeled-Histamine-Cyclosporin C For Monitoring Serun
Cyclosporine In Concentration Patients. Clin. Chem. 1986; 32: 492
- 495.
- 192 Strassman M J, Lensmeyer G L, Donald A : Three Commercial
Policlonal Immunoassays For Cyclosporine In Whole Blood
Compared: 1. Results Wiyh Patiens' Specimens. Clin. Chem.
1990; 36: 115 - 118.
- 193 Lensmeyer G L, Donald A, Carison I H, et al .. : Three
Commercial Policlonal Immunoassays For Cyclosporine In Whole
Blood Compared: 2. Cross-Reactivity Of The Antisera With
Cyclosporine Metabolites. Clin. Chem. 1990; 36: 119 - 123.
- 194 Hirvisalo E L, Kivisto K T, Neuvonen P J : Therapeutic
Cyclosporine Monitoring Comparison Of Radioimmunoassay And
High-Performance Liquid Cromatography Methods In Organ
Transplant Recipients. Ther. Drug Monit. 1990; 12: 353 - 358.
- 195 Subbarao M N, Swanson J R, Mueggler P A : Cyclosporine
Determinations In Heart And Kidney Transplant Patiens:
Comparison Of High-Performance Liquid Cromatography,
Policlonal, And Monoclonal Methods. Ther. Drug Monit. 1989;
11: 53 - 56.

- 196 Quesniaux V, Tees R, Scherler M H, et al : Potencial Of Monoclonal Antibodies To Improve Therapeutic Monitoring Of Cyclosporine. Clin. Chem.1987; 33: 32 - 37.
- 197 Ball P E, Munzer H, Keller H P, et al .. : Specific [H3] Radioimmunoassay With A Monoclonal Antibody For Monitoring Cyclosporine In Blood. Clin. Chem.1988; 34: 257 - 260.
- 198 Wolf B A, Daft M C, Koenig J W, et al ... : Measurement Of Cyclosporine Concentrations In Whole Blood: Hplc And Radioimmunoassay With A Specific Monoclonal Antibody And [H3] Or [I-125]-Labelled Ligand Compared. Clin. Chem.1989; 35: 120 - 124.
- 199 Holt D W, Johnston J T, Marsden J T, et al : Monoclonal Antibodies For Radioimmunoassay Of Cyclosporine: A Multicenter Comparison Of Their Performance With The Sandoz Polyclonal Radioimmunoassay Kit. Clin. Chem.1988; 34: 1091 - 1096.
- 200 Tredger J M, Steward C M, Williams R : Cyclosporine Blood Levels An Evaluation Of Radioimmunoassay With Selective Monoclonal Or Polyclonal Antibodies And Hig-Performance Liquid Chromatography In Liver Transplant Recipients. Transplantation 1988; 46: 681 - 686.

- 201 Cooke R, Wilson T, Tisch G, et al .. : Multicentre Comparison Of Monoclonal (Sandimmun) Versus Polyclonal (Cyclosporine-Ria) Radioimmunoassays For Cyclosporine Blood Monitoring. Transplant. Proc.1989; 21: 1478 - 1481.
- 202 Burckart J G, Starzl T, Williams L, et al .. : Cyclosporine Monitoring And Pharmacokinetics In Pediatric Liver Transplant Patiens. Transplant. Proc.1985; 17: 1172 - 1175.
- 203 Schran H F, Rosano T G, Hassell A E, et al ... : Determination Of Cyclosporine Concentrations With Monoclonal Antibodies. Clin. Chem. 1987; 33: 2225 - 2229.
- 204 Holt D W, And Johnston A : Cyclosporin A: Analitical Metodology And Factors Affecting Therapeutic Drug Monitoring. Ther. Drug Monit. 1995; 17: 625 - 630.
- 205 Marty P, Bertault-Peres P, Mucke K, et al ... : Evaluation Of A New Automated Method For Cyclosporine A Therapeutic Monitoring On Tdx Abbott. Analitical Letters 1989; 22: 2717 - 2736.
- 206 Popelka S R, Miller D M, Holen J T, et al : Fpia - Ii - Analyzer For The Rapid And Precise Measurement Of Fluorescence Polarization Using Disposable Cuvettes. Clin. Chem. 1981; 27: 1198 - 1201.

- 207 Plebani M, Paleari C D, Masiero M, et al : Fluorescence Polarization Immunoassay For Cyclosporine A Determination In Whole Blood. *Ther. Drug Monit.* 1990; 12: 284 - 287.
- 208 Kaplan B, Wang Z, T Keilani T, And Kaufman D B : The Specificity Of Monoclonal Fluorescence Polarization Immunassay For Cyclosporine In Recipients Of Simultaneous Pancreas-Kiney Transplants. *Ther. Durg Monit.* 1995; 17: 499 - 503.
- 209 Klotz U : Comparison Of Cyclosporine Blood Levels Measured By Radioimmunoassay And Tdx Assay Using Monoclonal Antibodies. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13: 461 - 463.
- 210 Rondanelli R, Regazzi M B, Gastaldi L, et al : Measurement Of Cyclosporine In Plasma Of Cardiac allograft Recipients By Fluorescence Polarization Immunoassay. *Ther. Drug Monit.* 1990; 12: 182 -186.
- 211 Lindholm A And Henricsson S : Comparative Analyses Of Cyclosporine In Whole Blood And Plasma By Radioimmunoassay, Fluorescence Polarization Immunoassay, And High-Performance Liquid Chromatography. *Ther. Drug Monit.* 1990; 12: 344 - 352.
- 212 Lee S F, Yang W C, Shann T Y, et al : Comparison Of Nonespecific Radioimmunoassay, High-Performance Liquid

- Chromatography, And Fluorescence Polarization Immunoassay For Cyclosporine Monitoring In Renal Transplantations. *Ther. Drug Monit.* 1991; 13: 152 - 156.
- 213 Beresisi M H, Davalian D, alexander S, et al : Evaluations Of Emit Cyclosporine Assay Evaluates. *Clin. Chem.* 1993; 39: 2235 - 2241.
- 214 Rosano T G, Freed B M, Pell M A, And Lemper N : Cyclosporine Metabolites In Human Blood And Renal Tissue. *Transplant. Proc* 1986; 18 (Supple-5): 35 - 40.
- 215 Ryffel B, Foxwell B M, Mihatsch M J, et al .. : Metabolites Of Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1988; 20 (Supple-5): 575 - 584.
- 216 Freed B M, Rosano T G, Quick C, And Lempert N : Effects Of Cyclosporine Metabolites M17 And M18 On Proliferation And Interleukin 2 Production In The Mixed Lymphocytes Culture. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 1223 - 1226.
- 217 Copeland K R, Thiveris J A, And Yatscoff W : Toxicity Of Cyclosporine Metabolites. *Ther. Drug Monit.* 1990; 12: 525 - 532.
- 218 Shaw Lm : Cyclosporine Metabolites: Are They Active?. *Clin. Chem.* 1990; 36: 187.

- 219 Shaw L M : Cyclosporine Monitoring. Clin. Chem. 1989; 35: 5 - 6.
- 220 Ludwin D : Cyclosporine Monitoring In Autoimmune And Other Diseases. Clin. Biochem. 1991; 24: 97 - 99.
- 221 Grevel J : Optimisation Of Immunosuppressive Therapy Using Pharmacokinetic Principles. Clin. Pharmacokinet. 1992; 23: 380 - 390.
- 222 Shaw L M, Andet P R, Grossman R A, et al : Adjustman Of Cyclosporine Dosage In Renal Transplant Patiens Based On Concentration Measured Specifically In Whole Blood: Clinical Outcome Results And Diagnostic Utility. Transplant. Proc. 1990; 22: 1267 - 1273.
- 223 Bowers L D : Therapeutic Monitoring For Cyclosporine: Dificulties In Establishing A Therapeutic Windows. Clin. Biochem. 1991; 24: 81 - 87.
- 224 Keown P A, Stiller C R, Wallace A C, et al ... : Cyclosporine Nefrotoxicity: Exploration Of The Risk Factor And Pronogsis Of The Renal Injury. Transplant. Proc. 1985;17: 247 - 253.
- 225 Fergunson R M, Canafax D M, Sawchuck R T, Simmons R L : Cyclosporine Blood Levels Monitoring The Early Posttransplant Period. Transplant. Proc. 1986; 18 (Supple-1): 113 - 116.

- 226 Holt D W, Marsdel J T, Johnston A, et al ... : Cyclosporine Concentrations And Renal allograf Dysfuntion. Br. Med.J. 1984; 293: 1057 - 1059.
- 227 Lindholm A : Cyclosporine A: Clinical Experience And Therapeutic Drug Monitoring. Ther. Drug Monit. 1995; 17: 631 - 637.
- 228 Morris R G : Australian Cyclosporin Therapeutic Monitoring Metod Survey: 1993. Ther. Drug Monit. 1994; 16: 564 - 569.
- 229 Moyer T P, Post G R, Sterioff S, et al ... : Cyclosporine Nephrotoxicity Is Minimized By Adjusting Dosage On The Basis Of Drug Coccentration In Blood. Mayo Clinic. Proc. 1988; 63: 241 - 247.
- 230 Humbert H, Vernillet L, Cabiatic M D, et al ... : Influence Of Different Parameters For The Monitoring Of Cyclosporine. Transplant. Proc.1990; 22: 1234 - 1239.
- 231 Grevel J, Napoli K L, Gibbons S, et al ... : Area-Under-The-Curve Monitoring Of Cyclosporine Therapy: Perfomance Of Different Assay Method And Their Target Concentrations. The. Drug Monit. 1990; 12: 8 - 15.
- 232 Grevel J, Welsh M S, Kahan B D :Cyclosporine Monitoring In Renal Transplantation: Area Under The Curve Monitoring Is

- Superior To Trough-Level Monitoring. *Ther. Drug Monit.* 1989; 11: 246.- 248.
- 233 Johnston A, Sketris J, Marsden J T, et al ... : A Limited Sampling Strategy For The Measurement Of Cyclosporine Auc. *Transplant. Proc.* 1990; 22:1354 - 1356.
- 234 Grevel J, Kahan B D: Abbreviated Kinetic Profiles In Area-Under-The-Curve Monitoring Of Cyclosporine Therapy. *Clin. Chem.* 1991; 37: 1905 - 1908.
- 235 Awni W M :Pharmacodynamic Monitoring Of Cyclosporin. *Clin. Pharmacokinet.* 1992; 23: 428 - 448.
- 236 Kahan B D, Pellis N R, Linikki P, et al ... : Pharmacodynamic Assay Of The Immunosuppressive Action Of Cyclosporine Therapye In Transplant Recipients. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 1695 - 1698.
- 237 Mckenna R M, Rush D N, Bakkestad-Legare P, et al ... : Interleukin 2, Interferon, And Lymphotoxin In Renal Transplant Recipients. *Transplantation* 1988; 45: 76 - 81.
- 238 Yoshimura N, Kahan B D :Pharmacodynamic Assessment Of The In Vivo Cyclosporine Effect On Teh Interleukin-2 Production By Lymphocytes In Kidney Trasplant Recipients. *Transplantation* 1985; 40: 661 - 666.

- 239 Cprnaby A J, Simpson M A, Van Rice R, et al ... : Il-2 Production In Plasma And Urine, Plasma Il-2r Levels And Urine Cytology As A Means Of Minitoring Renal allograft Recipients. *Transplant. Proc.* 1988; 20 (Suppl-1): 108 - 110.
- 240 Simpson M A, Young-Fadok T M, Madras P N, et al ... : Sequential Interleukin 2 And Interleukin 2 Receptor Levels Ditinguish Rejection From Cyclosporine Toxicity In Liver allograft Recipients. *Archives Of Surgery.* 1991; 126: 717 - 720.
- 241 Smit A Y, Citterio F, Welsh M, et al ... : Interleukin -2 Receptor As An Immunodiagnostig Tool To Differentiate Rejections From Nefrotoxicity. *Transplant. Proc.* 1989; 21: 1462 - 1464.
- 242 Steiner G, Kullinger B, Mayer G, et al ... : Determination Of Cyclosporine By Competitive Biding Assay With Cyclophilin. *Clin. Chem.* 1991; 37: 403 - 410.
- 243 Lover M I, Paul K, Harding M W, et al ... : Cyclophilin Binding: A Receptor-Mediated Approach To Monitoring Cyclosporine Immunosuppressive Activity Following Organ Transplantation. *Transplant. Proc.* 1990; 22: 1240 - 1244.
- 244 Rowland M, Gupta S K. : Cyclosporin-Phenytoin Interaction: Reevaluación Using Metabolite Data. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1988; 24: 329 - 334.

- 245 Carstensen H, Jacoben N, Dieperink H. : Interaction Between Cyclosporine A And Phenobarbitone [Letter]. Br. J. Clin. Pharmacol. 1986; 21: 550 - 551.
- 246 Daniels N J, Dover J S, Schachter R K. : Interaction Between Cyclosporine A And Rifampicin. Lancet 1984; ii: 639.
- 247 Jarewicz W A, Gunson B K, Ismail T, et al ... : Cyclosporine A And Antituberculous Therapy. Lancet 1985; ii: 1342 - 1343.
- 248 Modry D L, Stinson E B, Oyer P E. et al ... : Acute Rejection And Masive Cyclosporine Requeriments In Heart Transplant Recipients Treated With Rifampin. Trasplantation 1985; 39: 313 - 314.
- 249 Gupta S K, Bakran A, Johnson R W G, et al ... : Erytromycin Enhaces The Absorption Of Cyclosporin. Br. J. Clin. Pharmacol. 1988; 25: 401 - 402.
- 250 Ptachcinski R J, Carpenter B J, Burckart G, et al ... : Effect Of Erytromycin On Cyclosporine Levels. New. Engl. J. Med. 1985; 313: 1416 - 1417.
- 251 Ferrari S L, Goffin E, Mourand M, et al ... : The Interaction Between Clarithromycin And Cyclosporine In Kidney Transplant Recipients. Trasplantation 1994; 58: 725 - 727.

- 252 Anzada J, Catala M, Alvarez P, et al ... : Possible Interaction Between Cyclosporine And Josamycin. *J. Heart Transplant.* 1990; 9: 265 - 266.
- 253 White D J, Blatchford N R, Cauwenbergh G. : Cyclosporine And Ketokonazole. *Transplantation* 1984; 37: 214 - 215.
- 254 Collignon P, Hurley B, Mitchell D. : Interaction Of Fluconazole With Cyclosporin. *Lancet* 1989; I: 1262.
- 255 Kwan J T, Foxall P J, Davison D G, et al .. : Interaction Of Cyclosporine And Intraconazole. *Lancet* 1987; Ii: 282.
- 256 Wadhwa N K, Schroeder T J, O'Flaherty E, et al .. : The Effect Of Oral Metoclopramide On The Absorption Of Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1987; 19: 1730 - 1733.
- 257 Gorrie M, Beaman M, Nicholls A, et al .. : allopurinol Interaction With Cyclosporin. *B. M. J.* 1994; 308: 113.
- 258 Wagner K, Henkel M, Heinemeyer G, et al .. : Interactions Of Calcium Blockers And Cyclosporine. *Transplant. Proc.* 1988; 20 (Supple-2): 561 - 568.
- 259 Moller B B, Ekelund B. : Toxicity Of Cyclosporine During Treatment With Androgens. *New. Engl. J, Med.* 1985; 313: 1416 - 1417.

- 260 Sundararajan V, Cooper D K C, Muchmore J, et al ... : Interaction Of Cyclosporine And Probucol In Heart Transplant Patients. *Transplant. Proc.* 1991; 23: 2028 - 2032.
- 261 Harris K P, Jenkins D, Walls J. : Nonsteroides Antinflammatory Drug And Cyclosporine: A Potentially Serious Adverse Interaction. *Transplantation* 1988; 46: 598 - 599.
- 262 Campana C, Regazi M B, Buggia I, And Molinaro M.: Clinically Significant Drug Interactions With Cyclosporin. *Clin. Pharmacokinet.* 1996; 30: 141 - 179.
- 263 Kovarik J M, Mueller E A, And Niese D. : Clinical Development Of A Cyclosporine Microemulsion In Transplantation. *Ther. Drug. Monit.* 1996; 18: 429 - 434.
- 264 Friman S, And Backman L. : A New Microemulsion Formulation Of Cyclosporin. *Clin. Pharmacokinet.* 1996; 30: 182 - 193.
- 265 Tredger J M. : Using Cyclosporine Neoral Immediately After Liver Transplantation. *Ther. Drug. Monit.* 1995; 17: 638 - 641.
- 266 Freeman D, Grant D, Levy G, et al .. : Pharmacokinetics Of A New Oral Formulation Of Cyclosporine In Liver Transplant Recipients. *Ther. Drug. Monit.* 1995; 17: 213 - 216.

- 267 Holt D W, Marsden J T, Johnson A, et al. ... : Blood Cyclosporin Concentrations And Renal allograft Dysfunction. Br. Med. J. 1986; 293: 1057 - 1059.
- 268 Irschink E, Tilg H, Niederwieser D, et al .. : Ciclosporin Blood Levels Do Correlate With Clinical Complications [Letter]. Lancet 1984; Ii: 692 - 693.
- 269 Rogerson M E, Marsden J T, Reid K E, Bewick M, Holt D W. :Cyclosporine Blood Concentrations In The Management Of Renal Transplant Recipients .Transplantation. 1986; 41: 276-281.
- 270 Rowland M. : Plasma Protein Binding And Therapeutic Drug Monitoring. Ther. Drug. Monit. 1980; 2: 29 - 37.
- 271 Bruner L J, Luke D R, Lautersztain J, et al .. : Single-Dose Cyclosporine Pharmacokinetics In Various Biological Fluidos Of Patiens Receiving allogenic Marrow Transplantation. Ther. Drug. Monit. 1990; 12: 134 - 138.
- 272 Lima J J, Mackichan J J, Libertin N, And Sabino J. : Influence Of Volumen Shifts On Drug Binding During Equilibrium Dialysis: Correction And Attenuation. J. Pharmacokin. Biopharm. 1983; 2: 149 - 160.
- 273 Instrucciones " Tdx Cyclosporine And Metabolites Serum Assay". Abbott Laboratories (U.S), Pg.. 4.

274 Markell M S, Brown C D, Butt K M H, And Friedman E A. :
Prospective Evaluation Of Change In Lipid Profiles In
Cyclosporine-Treated Renal Transplant Patients. Transplant. Proc.
1989; 21: 1497- 1499.

275 Piafsky K M. : Disease-Induce Changes In The Plasma Binding Of
Basic Drugs. Clin. Pharmacol. 1980; 5: 546 - 562.

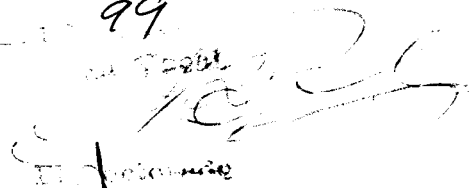
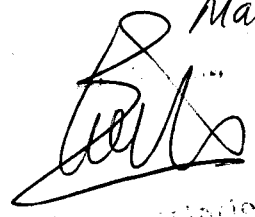
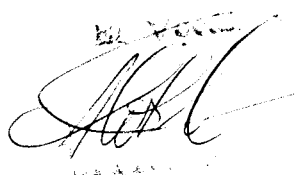
mentos
oral de

Francisco Callejón Linarés
Influencia de las lipoproteínas en la función
plasmática libre de la ciclosporina A
Sotresaliente con

lindell 12

Marzo

99



Adelb Sanchez

