

METABOLÓMICA APLICADA A LA DOSIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

Oihane Elena Alboniga, María Encarnación Blanco, Oskar González, Rosa María Alonso

^aDepartamento de Química Analítica, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Barrio de Sarriena, s/n, 48940 Leioa, Spain.

PROBLEMÁTICA: DOSIFICACIÓN DE FÁRMACOS EN NIÑOS

En la actualidad, la dosificación personalizada de fármacos se considera un objetivo terapéutico en poblaciones especiales como pacientes con patologías renales, hepáticas, ancianos y, especialmente en niños [1,2].

La población pediátrica no está incluida en los ensayos pre-comercialización de un fármaco, lo que lleva a que la variabilidad interindividual en la relación dosis-respuesta en este grupo de población sea muchas veces ignorada.

La falta de ensayos clínicos en menores de edad hace que tan sólo un pequeño porcentaje de fármacos obtenga la autorización necesaria para su administración pediátrica. Esta situación provoca que un gran número de fármacos con estrecho margen terapéutico, empleados para tratar a los niños, se utilicen de forma "off label". En ocasiones, no están indicados para la patología tratada, han de ser modificados, son administrados por vías no autorizadas o se emplean en dosis inadecuadas [3].

La falta de información sobre la dosificación correcta en este tipo de pacientes hace que, en muchos casos, esta se realice en base a cálculos empíricos extrapolados de las dosis administradas a adultos, mediante la relación con el peso corporal (mg fármaco/kg), o con el área superficial, asumiendo una linealidad entre estos parámetros y la dosis necesaria [4].

Otras metodologías de dosificación emplean la edad postnatal como un factor de escalamiento, dividiendo la población pediátrica en subcategorías (recién nacidos pretérmino, recién nacidos a término, lactantes y niños pequeños, niños y adolescentes). Sin embargo, no siempre da lugar a resultados adecuados, ya que las diferencias en el grado de maduración de los órganos hacen que niños de igual edad cronológica puedan tener diferente edad biológica, mostrando una importante variabilidad interindividual en los procesos farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD) responsables de la disposición del fármaco y su respuesta terapéutica. Esto se debe a que durante los primeros años del niño órganos como los riñones o el hígado continúan formándose hasta alcanzar su total maduración. Las funciones renales y hepáticas, implicadas ambas en la disponibilidad del fármaco, varían con la maduración, lo cual unido a las variaciones en la expresión y función de receptores y proteínas, dan lugar a cambios en la relación dosis-respuesta [5].

Estos hechos dejan patente la necesidad de estudios más

profundos sobre la relación dosis-efecto de los fármacos con el grado de maduración. Dado que la maduración es, por lo general, un proceso dinámico no lineal dependiente de las rutas metabólicas y de la expresión de las dianas farmacológicas, la determinación de biomarcadores relacionados con la maduración de los órganos y el conocimiento de su evolución en las diferentes edades, permitiría predecir mejor la variabilidad interindividual asociada a los procesos (FC-FD), responsables de la relación dosis-respuesta.

En los últimos años la metabolómica ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad en pediatría, como lo demuestra el incremento del número de artículos publicados sobre la determinación de perfiles metabólicos en población infantil. Sin embargo, la mayoría de estos estudios están dirigidos a la diferenciación de niños con patologías concretas (fenilcetonuria, labio leporino, obesidad, diabetes,...) [6-8] de los perfiles de niños sanos, buscando biomarcadores relacionados con la enfermedad estudiada [9-11].

Existen algunos trabajos sobre la determinación de biomarcadores de envejecimiento dirigidos a poblaciones adultas [12-14], sin embargo son escasos los realizados sobre la maduración propia de la población pediátrica. Cabe destacar entre estos últimos los estudios metabolómicos realizados por Gu y col. [15], Fanos y col. [16-18] y Chiu y col. [19] en muestras de orina de niños, empleando la resonancia magnética nuclear (RMN).

Nuestro grupo de investigación se planteó aplicar la metabolómica no dirigida haciendo uso de la plataforma analítica de cromatografía líquida-espectrometría de masas a la problemática descrita, con el fin de buscar biomarcadores (metabolitos) asociados a la edad, que pudieran estar relacionados con la maduración de los órganos. Los resultados obtenidos podrían ser extrapolados a la población infantil para una correcta dosificación de los fármacos.

DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS

La dificultad que supone la obtención de muestras biológicas de niños desde un punto de vista ético, así como las dificultades técnicas para obtener un número importante de muestras, hace necesario el uso de modelos animales.

En este trabajo se utilizó como modelo animal el cerdo dada la semejanza de su metabolismo con el de los humanos. La Unidad Experimental de Fisiología Neonatal del Instituto de Investigación BioCruces (Hospital

Universitario de Cruces, Bizkaia, España), de acuerdo con los protocolos aprobados por su Comité de Ética, fueron los encargados de la toma de muestra. En base a un estudio piloto previo [20], se recogieron muestras de tres grupos de cerdos de edades menores a 1 semana, 2 semanas y 4 semanas, que corresponden a recién nacidos (grupo A), neonatos (grupo B) e infantes (grupo C) en edad humana. Cada grupo estaba constituido por 12 animales, 50 % de hembras y 50% de machos. Se seleccionaron como matrices el plasma y el hígado. La anestesia empleada fue una mezcla de ketamina, diazepam y sevoflurano. El punto de extracción fue la vena femoral y la toma de muestra se llevó a cabo a la misma hora por la mañana.

TOMA, ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO DE MUESTRA

Las muestras de plasma se obtuvieron después de centrifugación de la sangre, recogida en tubos de K₂EDTA, a 950 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras de tejido hepático se recogieron en nitrógeno líquido. Ambos tipos de muestra se almacenaron a -80°C. El tratamiento de las muestras de plasma consistió en una precipitación de proteínas con metanol en proporción 1:2 plasma:MeOH [21]. En el caso del hígado fue necesario un proceso de homogenización previo a la extracción de los metabolitos.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

La obtención de los perfiles metabólicos de plasma e hígado se llevó a cabo mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas con un analizador de tiempo de vuelo (HPLC-TOF-MS) en modo de ionización positivo y negativo. La inyección de las muestras se efectuó de forma aleatoria.

Para asegurar la calidad de los datos del estudio metabolómico y controlar el adecuado funcionamiento del sistema HPLC-TOF-MS se empleó una disolución multicomponente (SST), compuesta de nueve compuestos de diferentes polaridades y pesos moleculares, que se inyectó al inicio, en el medio y al final de cada secuencia de análisis.

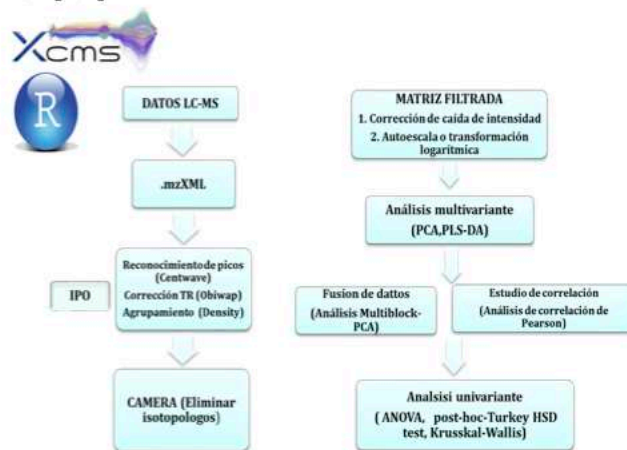
Las muestras de control de calidad (QC), preparadas a partir de alícuotas de cada muestra de plasma y en el caso del hígado de los extractos obtenidos de cada muestra, se inyectaron al inicio del barrido para acondicionar el sistema cromatográfico y después de la inyección de seis muestras de plasma o hígado. Estas QCs se utilizan con el fin de asegurar la reproducibilidad de los perfiles metabólicos y cuando sea necesario para la corrección de la señal dentro de la secuencia. Se inyectaron así mismo muestras blanco compuestas por los agentes extractantes finales de las muestras.

PRE-PROCESADO Y TRATAMIENTO QUIMIOMÉTRICO DE LOS DATOS

En la actualidad existen una serie de softwares diseñados para el procesado de datos, como el MarkerLnx o el XCMS, cuya función consiste en detectar picos

cromatográficos, alinear los tiempos de retención y establecer posibles aductos e isótopos [22]. Como resultado se obtiene una matriz de datos que será tratada posteriormente con softwares quimiométricos como el Simca o Matlab. Durante el tratamiento quimiométrico se corrige la caída de intensidad producida por el sistema LC-MS empleando las QCs y se realizan análisis estadísticos multivariantes como el análisis de componentes principales (PCA), mínimos cuadrados parciales (PLS-DA y OPLS-DA), entre otros. Los modelos obtenidos serán validados mediante validación cruzada. Posteriormente, se aplicarán análisis estadísticos univariantes (ANOVA y/o Kruskal-Wallis) para establecer los metabolitos (biomarcadores) significativamente diferentes entre los grupos estudiados.

En el Esquema 1 se recoge el tratamiento de los datos de los perfiles metabólicos de plasma e hígado en modelo animal que se ha empleado en este trabajo. Es de reseñar la utilización dentro del análisis multivariante de métodos de fusión de datos como el Análisis Multiblock-PCA [23].



Esquema 1. Pre-tratamiento y análisis estadístico aplicado a los datos de los perfiles metabólicos de plasma e hígado.

Perfiles metabólicos de hígado y plasma en cerdos de diferentes edades como modelos animales de población pediátrica

En las Tablas 1 y 2 se recogen los features obtenidos y los pares correlacionados después de realizar el análisis multivariante y univariante a los datos correspondientes a los perfiles metabólicos de plasma e hígado. Se observaron diferencias significativas en los perfiles de ambas matrices entre los tres grupos de cerdos de diferentes edades (Figura 1).

Con el objetivo de determinar si el plasma es un fluido representativo de lo que ocurre en el hígado, se compararon los perfiles obtenidos en ambas matrices. Al número de features totales obtenidos en ambas matrices y modos de ionización se les aplicó el análisis multivariante Multiblock-PCA (MBA-PCA), que como se observa en las Figuras 1 y 2 proporciona una mejora en el agrupamiento de los diferentes grupos de edad.

Además, este tratamiento tiene la ventaja de considerar la relación entre las muestras de hígado y plasma, así como revelar la tendencia y correlación entre el fluido biológico y el tejido hepático

Tabla 1. Número de features de interés y pares correlacionados en los datos obtenidos de los perfiles metabólicos de plasma.

	Plasma ESI+	Plasma ESI-	Correlación de Pearson
Número total de features	2207	1855	365 pares
Features significativos totales (p-value < 0,001, A≠B≠C)	27	74	110 pares
Picos reales MS/MS	13	21	16 pares

Tabla 2. Número de features de interés y pares correlacionados en los datos obtenidos de los perfiles metabólicos de hígado.

	Hígado ESI+	Hígado ESI-	Correlación de Pearson
Número total de features	5603	2242	190 pares
Features significativos totales (p-value < 0.001, A≠B≠C)	90	44	11 pares
Picos reales MS/MS	36	12	3 pares

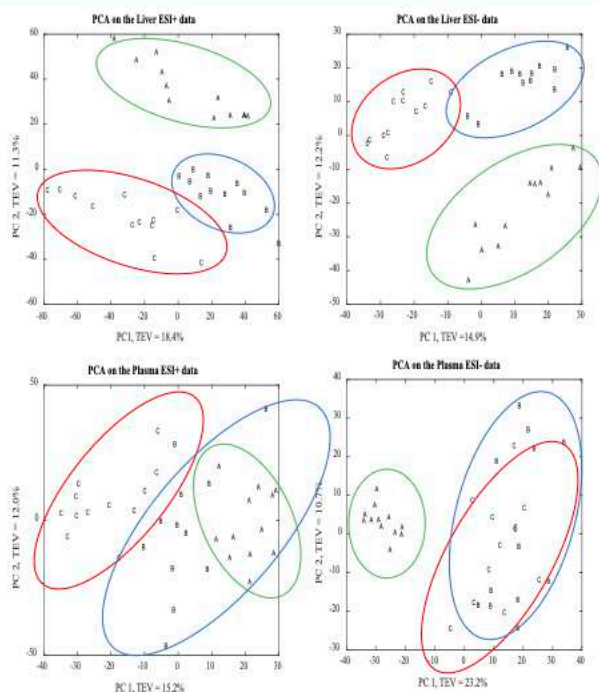


Figura 1. PCA scores para hígado y plasma en ambos modos de ionización. Grupos de cerdos: recién nacidos (A), neonatos (B) e infantes (C). TEV: varianza total explicada.

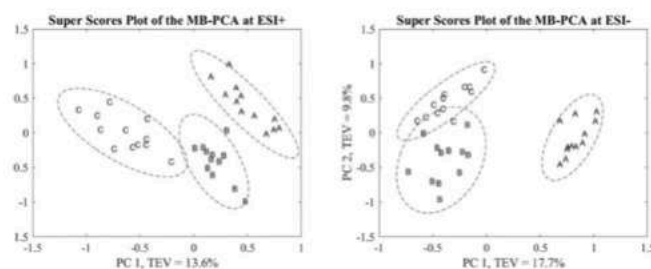


Figura 2. MB-PCA super scores de datos combinados (hígado y plasma) en modo de ionización positiva (ESI+) y negativa (ESI-). Grupos de cerditos: recién nacidos (A), neonatos (B) e infantes (C). TEV: varianza total explicada. [24].

Se realizaron a continuación estudios de correlación de Pearson para encontrar aquellos features en hígado que estaban más correlacionados con los de plasma (coeficientes de correlación superiores a 0,8 en valor absoluto). Con posterioridad se llevó a cabo el análisis univariante y después se aplicó el análisis Procrustes con el fin de asegurar si la distribución de los dos conjuntos de puntos tenían similitudes estadísticamente significativas y seguían un comportamiento similar (disimilitud de Procrustes). Finalmente se aplicó un test de permutación para determinar la probabilidad de que la similitud de las matrices ocurriera por azar. Los resultados obtenidos indican la similitud entre hígado y plasma en ambos modos de ionización.

Este hallazgo es uno de los hitos más importantes conseguidos en este trabajo, ya que demuestra que el plasma es una matriz adecuada para investigar el estado de maduración del hígado y por tanto abre un camino para la extrapolación de estos resultados a la población pediátrica, evitando el uso de una matriz tan invasiva como el hígado.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS

Una vez finalizado el tratamiento estadístico, se obtuvieron los cromatogramas de los features significativos para determinar si eran picos cromatográficos reales o artefactos. Se obtuvieron los patrones de fragmentación de aquellos que resultaron ser picos reales. La masa experimental y los patrones isotópicos se compararon con los disponibles en las bases de datos Metlin, HMDB, mzCloud or Lipid Maps. Se aceptó una tolerancia de masas inferior a 5 ppm. Otra herramienta utilizada para el proceso de anotación de metabolitos fue el algoritmo MFE incorporado en el software Mass Hunter Qualitative, que genera posibles fórmulas teniendo en cuenta la exactitud de masas, el patrón isotópico y las abundancias relativas; lo que proporciona un punto de partida para la anotación de metabolitos. En el caso de que ninguno de los criterios previos fuera suficiente, se hizo uso de la bibliografía.

Los features significativos encontrados en plasma pertenecen a clases de lípidos, lisofosfatidilcolinas (LPCs) y lisofosfatidiletalomaninas (LPEs), que están relacionados con el estado de maduración biológica y la edad. Este hallazgo tiene especial relevancia ya que,

según nuestro conocimiento, es la primera vez que estos lípidos han sido relacionados con la edad en población pediátrica.

Las acilcarnitinas son otros metabolitos anotados que podrían ser responsables de las diferencias observadas en los perfiles metabólicos en hígado y que podrían estar conectadas con la madurez de este órgano.

REFERENCIAS

1. GT. Tucker. Personalized drug dosage-closing the loop. *Pharm. Res.*, **34**, 1539-1543(2017)
2. Zhao W, Leroux S, Jacqz-Aigrain E. Dosage individualization in children: integration of pharmacometrics in clinical practice. *World. J. Pediatr.*, 2014, **10**(3), 197-203.
3. E. Kimland and V. Odland, Off-label drug use in pediatric patients. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, **91**(5), 796-801.
4. T. Kuhara, M. Ohse, Y. Inoue, T. Shinka, Y. Okano, H. Shintaku, K. Hongou, T. Miyawaki, W. Morinobu, H. Tamai, K. Omura. Urinary metabolic profile of phenylketonuria in patients receiving total parenteral nutrition and medication. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2009, **23**(19), 3167-3172.
5. R. H. Leach and B. S. Wood, Drug dosage for children, *Lancet*, 1967, **2**(7530), 1350-1351.
6. S. Wahl, Z. Yu, M. Kleber, P. Singmann, C. Holzapfel, Y. He, K. Mittelstrass, A. Polonikov, C. Prehn, W. Römisch-Margl, J. Adamski, K. Suhre, H. Grallert, T. Illig, R. Wang-Sattler, T. Reinehr. Childhood obesity is associated with changes in the serum metabolite profile. *Obes Facts*, 2012, **5**, 660-70.
7. J. Davidson, S. Tong, A. Hauck, DS Lawson, Ed Cruz, J. Kaufman Kinetics of procalcitonin and C-reactive protein and the relationship to postoperative infection in young infants undergoing cardiovascular surgery. *Pediatr Res.*, 2013, **74**(4):413-9.
8. K.G. Sylvester, X.B. Ling, G.Y. Liu, Z.J. Kastenber, J. Ji, Z. Hu, S. Peng, K. Lau, F. Abdullah, M.L. Brandt, RA Ehrenkranz, MC. Harris, T.C. Lee, J. Simpson, C. Bowers, R.L. Moss. A novel urine peptide biomarker-based algorithm for the prognosis of necrotising enterocolitis in human infants. *Gut*, 2013, **63**(8), 1284-1292.
9. M. Ağırbaşlı, A. Ündar. Monitoring biomarkers after pediatric heart surgery: a new paradigm on the horizon. *Artif Organs*, 2013, **37**(1), 10-509. M. Ağırbaşlı, A. Ündar. Monitoring biomarkers after pediatric heart surgery: a new paradigm on the horizon. *Artif Organs*, 2013, **37**(1), 10-50.
10. C. Menni, G. Kastenmueller, A. K. Petersen, J. T. Bell, M. Psatha, P. C. Tsai, C. Gieger, H. Schulz, I. Erte, S. John, M. J. Broxnan, S. G. Wilson, L. Tsaprouni, E. M. Lim, B. Stuckey, P. Deloukas, R. Mohny, K. Suhre, T. D. Spector, A. M. Valdes. Metabolomic markers reveal novel pathways of ageing and early development in human populations. *Int J Epidemiol.*, 2013, **42**(4), 1111-1119.
11. S. Bozzetto, P. Pirillo, Silvia Carraro, M. Berardi, Laura Cesca, M. Stocchero, G. Giordano, S. Zanconato, E. Baraldi. Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections, *Pharmacological Research*, 2017, **115**, 162-167.
12. D.K. Ingram, E. Nakamura, D. Smucny, G.S. Roth, M.A. Lane. Strategy for identifying biomarkers of aging in long lived species. *Experimental Gerontology*, 2001, **36**(7), 1025-1034.
13. N. Jiang; X. Yan; W. Zhou, Q. Zhang, H. Chen, Y. Zhang, X. Zhang. NMR-based metabolomic investigations into the metabolic profile of the senescence-accelerated mouse. *J Proteome Res.*, 2008, **7**(9), 3678-3686.
14. R.J. Mishur, S.L. Rea. Applications of mass spectrometry to metabolomics and metabonomics: Detection of biomarkers of aging and of age-related diseases. *Mass Spectrometry Reviews*, 2012, **31**(1), 70-95.
15. H. Gu, Z. Panb, B. Xic, B. E. Hainlined, N. Shanaiahb, V. Asiagob, G. A. N. Gowdab, D. Raftery. 1HNMR metabolomics study of age profiling in children. *NMR in Biomedicine*, 2009, **22**(8), 826-833.
16. V. Fanos, L. Barberini, R. Antonucci, L. Atzori. Metabolomics in neonatology and pediatrics, *Clinical Biochemistry*, 2011, **44**, 452-464.
17. V. Fanos, J. van den Anker, A. Noto, M. Mussap, L. Atzori. Metabolomics in neonatology: Fact or fiction?, *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2013, **18**, 3-12.
18. V. Fanos, N. Iacovidou, M. Puddu, G. Ottonello, A. Noto, L. Atzori. Metabolomics in neonatal life. *Early Human Development*, 2013, **89**, 57-60.
19. C-Y. Chiu, K-W Yeh, G. Lin, M-H Chiang, S-C Yang, W-J Chao, T-C Yao, M-H Tsai, M-C Hua, S-L Liao, S-H. Laiz, M-L. Cheng, J-L. Huang, Metabolomics Reveals Dynamic Metabolic Changes Associated with Age in Early Childhood. *Plos One*, 2016, **25**, 1-14.
20. M.E. Blanco, O. González, O.E. Alboniga, M.L. Alonso, R.M. Alonso. Metabolomic analysis for the study of maturation in paediatrics: effect of confounding factors in a pilot study. *Electrophoresis*, 2017, **38**(18), 2323-2330.
21. E. Rico, M. E. Blanco; O. González; R. M. Alonso.. Evaluation of human plasma sample preparation protocols for untargeted metabolic profiles analyzed by UPLC-TOF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, **406**, 7641-765.
22. O. E. Albóniga, O. González, R. M. Alonso, Y. Xu, R. Goodacre. Optimization of XCMS parameters for LC-MS metabolomics: an assessment of automated versus manual tuning and its effect on the final results. *Metabolomics*, 2020, **16**:14, 1-12.
23. Y. Xu and R. Goodacre, Multiblock principal component analysis: an efficient tool for analyzing metabolomics data which contain two influential factors. *Metabolomics*, 2012, **8**(Suppl. 1), 37-5124.
24. O. E. Albóniga, O. González, R. M. Alonso, Y. Xu, R. Goodacre. Comparison of liver and plasma metabolic profiles in piglets of different ages as animal models for paediatric population. *Analyst*, 2020, **145**, 6859-6867.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Universidad del País Vasco (GIU 16/04) y al Ministerio de Ciencia e Innovación (CTQ2013-46179-R) por la financiación de esta investigación. Además se agradece al Dr. Yun Xu y al Dr. Royston Goodacre por su ayuda en el tratamiento de datos.