



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A LA  
RESPUESTA FARMACOLÓGICA DE CICLOSPORINA EN  
PACIENTES TRASPLANTADOS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**  
**STEPHANIA NICHOLS CONTRERAS CASTILLO**

**PATROCINANTE**

Prof. Dra. QF. María Nella Gai

**DIRECTOR**

Prof. Dr. BQ. Luis Quiñones

**Santiago, Chile**

**2014**

Esta memoria fue desarrollada en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética del Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile en colaboración con el Hospital San Juan de Dios.

## **AGRADECIMIENTOS**

Debo comenzar agradeciendo a mi familia, quienes han sido un pilar fundamental en mi desarrollo académico y personal. Gracias por el apoyo incondicional que me han otorgado el cual ha permitido cumplir mis metas y sueños.

A mi gran amigo Álvaro Cárcamo, por estar siempre presente y dispuesto a escuchar mis ñoñerías, experiencias, frustraciones y también alegrías que ha significado la realización de esta memoria.

Josefa Martínez, por la confianza, compañía y amistad, que hicieron que los días de laboratorio siempre fueran distintos cuando estabas presente.

A todos los que participaron en este proyecto, en especial Dra. Rodriguez, Gabriel y Alejandro, por brindarme el tiempo y la ayuda necesaria para lograr los objetivos de esta investigación.

Muchísimas gracias Profesor Luis Quiñones, por la confianza depositada en mi y por todas las oportunidades otorgadas. Gracias por compartir conmigo experiencias de vida y dar el ejemplo para ser una mejor persona y sobretodo una mejor profesional.

Gracias Matías por acompañarme en la vida, alegrar y completar mis días.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1. 1. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA .....	11
1. 2. TRASPLANTE RENAL .....	12
1. 2. 1. <i>Manejo de pacientes</i> .....	13
1. 2. 2. <i>Terapia farmacológica de inmunosupresión</i> .....	13
1. 2. 3. <i>Ciclosporina</i> .....	14
1. 3. FARMACOGENÓMICA.....	17
1. 3. 1. <i>Sistema citocromo P450</i> .....	18
1. 3. 2. <i>Proteína de resistencia múltiple a drogas</i> .....	20
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>22</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
5. 1. MATERIALES .....	23
5. 2. MÉTODOS.....	24
5. 2. 1. <i>Pacientes</i> .....	24
5. 2. 2. <i>Concentración de ciclosporina</i> .....	24
5. 2. 3. <i>Extracción y purificación de DNA</i> .....	25

5. 2. 4. <i>Análisis genotípico</i> .....	25
5. 2. 5. <i>Aspectos éticos</i> .....	30
5. 2. 6. <i>Análisis estadístico</i> .....	30
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
6. 1. PACIENTES.....	31
6. 1. 1. <i>Terapia farmacológica</i> .....	35
6. 2. ANÁLISIS GENOTÍPICO.....	38
6. 3. RELACIÓN ENTRE GENOTIPOS, EFECTOS ADVERSOS Y SOSPECHA DE RECHAZO. ....	41
6. 4. INFLUENCIA GENOTIPOS EN CICLOSPORINA C <sub>2</sub> AJUSTADA. ....	43
6. 5. GENOTIPOS ASOCIADOS Y SU INFLUENCIA EN CICLOSPORINA C <sub>2</sub> AJUSTADA.....	47
6. 6. CORRELACIÓN ENTRE CREATININA Y CICLOSPORINA C <sub>2</sub> AJUSTADA. ....	49
6. 7. INFLUENCIA DE LOS GENOTIPOS ESTUDIADOS EN NIVELES DE CREATININA .....	50
<b>7. DISCUSIÓN</b> .....	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>9. PROYECCIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>69</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>70</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>76</b>
<b>ANEXO 4</b> .....	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Mecanismo de acción de ciclosporina.....	14
<b>FIGURA 2.</b> Producto PCR y patrones de corte con enzima <i>MbolI</i> para polimorfismo <i>CYP3A4*1B</i> .....	27
<b>FIGURA 3.</b> Producto PCR y patrones de corte con enzima <i>BseMII</i> para polimorfismo <i>CYP3A5*3</i> .....	28
<b>FIGURA 4.</b> Producto PCR y patrones de corte con enzima <i>Sau3AI</i> para polimorfismo <i>MDR1 3435 C&gt;T</i> .....	29
<b>FIGURA 5.</b> Producto PCR y patrones de corte con enzima <i>NheI</i> para polimorfismo <i>MDR1 2677 G&gt;T/A</i> .....	30
<b>FIGURA 6.</b> Efectos adversos registrados.....	36
<b>FIGURA 7 A)</b> Producto PCR para detección de polimorfismo <i>CYP3A4*1B</i> en gel de agarosa. <b>B)</b> Producto de digestión con enzima <i>MbolI</i> en gel de poliacrilamida 18%.....	38
<b>FIGURA 8. A)</b> Producto PCR para detección de polimorfismo <i>CYP3A5*3</i> en gel de agarosa. <b>B)</b> Producto de digestión con enzima <i>BseMII</i> en gel de poliacrilamida 18%..	38
<b>FIGURA 9. A)</b> Producto PCR para la detección de polimorfismo <i>MDR1 3435 C&gt;T</i> en gel de agarosa.....	39
<b>FIGURA 10. A)</b> Producto PCR para la detección de polimorfismo <i>MDR1 2677 G&gt;T/A</i> en gel de poliacrilamida 18%.....	39
<b>FIGURA 11.</b> Comparación de los genotipos analizados a través de concentración $C_2$ de ciclosporina ajustada y dosis diaria en un año post-trasplante.....	46
<b>FIGURA 12.</b> Comportamiento de concentración $C_2$ ajustada y dosis en genotipos <i>CYP3A</i> asociados en un año.....	48
<b>FIGURA 13.</b> Comportamiento de concentración $C_2$ ajustada y dosis en genotipos <i>MDR1</i> asociados en un año.....	49
<b>FIGURA 14.</b> Niveles de creatinina y concentraciones $C_2$ a través del tiempo para cada genotipo.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Etapas de la IRC.....	11
<b>TABLA 2.</b> Protocolo de fármacos inmunosupresores utilizados en inducción y mantención en pacientes trasplantados renales.....	13
<b>TABLA 3.</b> Características de los pacientes .....	32
<b>TABLA 4.</b> Promedio de concentraciones de creatinina.....	34
<b>TABLA 5.</b> Promedio de concentraciones de ciclosporina C <sub>2</sub> .....	34
<b>TABLA 6.</b> Promedio de dosis diaria administrada.....	35
<b>TABLA 7.</b> Frecuencia genotípica y alélica de los pacientes trasplantados renales estudiados para los polimorfismos genéticos de <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> y <i>MDR1</i> .....	40
<b>TABLA 8.</b> Asociaciones entre genotipo y reacciones adversas.....	41
<b>TABLA 9.</b> Asociaciones entre genotipo y episodio de rechazo.....	43
<b>TABLA 10.</b> Estudio de asociación entre genotipos y concentraciones C <sub>2</sub> ajustadas de ciclosporina.....	44
<b>TABLA 11.</b> Promedio total de concentraciones C <sub>2</sub> ajustadas y dosis en genotipos asociados para <i>CYP3A</i> .....	47
<b>TABLA 12.</b> Promedio total de concentraciones C <sub>2</sub> ajustada y dosis en genotipos asociados para <i>MDR1</i> .....	49
<b>TABLA 13.</b> Creatinina promedio según el tiempo post-trasplante.....	50
<b>TABLA 14.</b> Correlación entre creatinina y ciclosporina C <sub>2</sub> , separada por genotipo.....	51

## ABREVIATURAS

**CsA:** Ciclosporina

**CYP:** Citocromo P450 (del inglés *Cytochrome P450*)

**MDR1:** *Multidrug Resistance Protein 1*

**PCR-RFLP:** Reacción en cadena de la Polimerasa - Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (del inglés *Polymerase Chain Reaction – Restriction fragment length polymorphism*)

**C<sub>2</sub>:** Concentración a las 2 horas

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido simple (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*)

**VFG:** Velocidad de Filtración Glomerular

**IRC:** Insuficiencia Renal Crónica

**IRCT:** Insuficiencia Renal Terminal

**RCT:** Receptor de Célula T

**NFAT:** *Nuclear Factor of Activated T-Cells*

## RESUMEN

### POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA DE CICLOSPORINA EN PACIENTES TRASPLANTADOS.

Ciclosporina (CsA) es un fármaco inmunosupresor utilizado para prevenir el rechazo de órganos en pacientes trasplantados. Sin embargo, esta droga se caracteriza por poseer un rango terapéutico estrecho y una alta variación farmacocinética inter- e intra-individual por lo cual se recomienda monitorear este medicamento constantemente para prevenir efectos adversos. Por lo tanto, entender la variabilidad farmacocinética de CsA es de crucial importancia para maximizar los resultados clínicos de los pacientes trasplantados de órganos.

En este estudio se investigaron variantes genéticas involucradas en la metabolización y transporte de CsA que pueden afectar la farmacocinética de este fármaco. Para esto, pacientes trasplantados renales fueron genotipificados para *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435 C>T* y *MDR1 2677 G>T/A* mediante *PCR-RFLP*. Los genotipos obtenidos fueron relacionados con efectos adversos, episodios de rechazo y concentraciones  $C_2$  ajustadas de CsA. También se estudió la influencia de estos genotipos en la dosis administrada diaria de CsA y los niveles de creatinina.

Los resultados mostraron una asociación entre el polimorfismo *CYP3A5\*3* y las concentraciones  $C_2$  ajustadas en los primeros días del tratamiento. Sin embargo, con el resto de los polimorfismos no se observaron asociaciones estadísticas significativas. Similarmente, al evaluar la influencia de los genotipos en la dosis diaria de CsA, sólo *CYP3A5\*3* demostró asociación. En cuanto a los episodios de rechazo se encontraron asociaciones en el gen *MDR1*, en el cual la variante alélica corresponde a un factor de riesgo ante estos episodios. Para los análisis de los efectos adversos y creatinina, no se encontraron asociaciones para ningún polimorfismo.

En conclusión, en este estudio se encontró que posiblemente el polimorfismo *CYP3A5\*3* estaría relacionado a la respuesta farmacocinética de CsA, y el gen *MDR1* estaría ligado al rechazo del órgano. Mientras tanto, como proyección se propone investigar polimorfismos adicionales que puedan clarificar el aporte de los otros genes. Además, aumentar el número de pacientes e incluir factores no genéticos y/o epigenéticos nos entregaría una respuesta más completa a la variabilidad farmacocinética de este inmunosupresor.

## SUMMARY

### GENETIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED TO THE PHARMACOLOGICAL RESPONSE TO CYCLOSPORINE IN TRANSPLANTED PATIENTS

Cyclosporine (CsA) is an immunosuppressive drug used to prevent allograft rejection. However, it is characterized by a narrow therapeutic index and high inter and intra individual pharmacokinetics variations. Thus, monitoring of this drug is highly recommended in order to prevent adverse effects. Therefore, understanding the pharmacokinetic variations of CsA is a crucial to maximize clinical outcomes in transplanted patients.

In this study we investigated genetics variants involved in the metabolism and transport of CsA which could affect the pharmacokinetics of the drug. For this purpose, renal transplanted patients were genotyped for *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435 C>T* and *MDR1 2677 G>T/A* genes through PCR-RFLP. Afterwards, genotypes were correlated with adverse effects, rejection episodes and dose-adjusted C<sub>2</sub> CsA levels in order to establish potential associations. Also, was studied the influence of this genotypes on the daily dose of CsA and creatinine levels.

The results showed statistical association between *CYP3A5\*3* polymorphism and dose-adjusted C<sub>2</sub> CsA levels at the first post-transplant days, whereas no association were observed for *CYP3A4\*1B*, *MDR1 3435 C>T* and *MDR1 2677 G>T/A*. Similarly, only *CYP3A5\*3* showed association with daily dose of CsA. Regarding to rejection episodes, the allelic variant of *MDR1* gen was observed as a risk factor. On the other hand, when adverse effects and creatinine levels were analyzed no correlations were observed for any polymorphisms.

In conclusion, in this study was found that *CYP3A5\*3* is possibly associated to CsA pharmacokinetics variation and *MDR1* gen is related to rejection episodes. However, it is proposed to investigate additional polymorphisms which could clarify the contribution of other genes besides *CYP3A5*. Additionally, the number of patients needs to be increased to have higher statistical power. Finally, non- genetic and/or epigenetic factors must be incorporated to the study in order to have a more complete response on the variability of CsA..

# 1. INTRODUCCIÓN

Una de las funciones más importantes de los riñones es que poseen el rol de regular la concentración de agua, la composición iónica y el volumen del medio interno. Además, excretan desechos metabólicos en la orina y actúan como glándulas endocrinas. Las subunidades encargadas de cumplir estas funciones son los nefrones, los cuales filtran la sangre mediante capilares interconectados, glomérulos, y que forman el filtrado glomerular el cual posteriormente es procesado para formar la orina<sup>1</sup>.

El volumen de fluido filtrado en el glomérulo por unidad de tiempo se conoce como Velocidad de Filtración Glomerular (VFG) y se utiliza clínicamente para obtener información sobre qué tan bien están filtrado los riñones la sangre. Los valores normales de VFG van de 90 a 120 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. Sin embargo, hay personas que reducen progresivamente los valores de VFG, principalmente por daño en los nefrones<sup>2</sup>.

## 1. 1. Insuficiencia renal crónica

En la mayoría de las enfermedades renales se reduce notablemente el número de nefrones funcionales llevando a la pérdida progresiva, permanente e irreversible de VFG a lo largo de un tiempo variable y el cual puede llegar a ser asintomático por años. Esto lleva a lo que se conoce como Insuficiencia Renal Crónica (IRC)<sup>3</sup>.

La *National Kidney Foundation* define la IRC en pacientes con una VFG <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> mantenida por 3 meses mínimo y la clasifica en cinco etapas (**TABLA 1**). En su última etapa se encuentra la Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT) que se caracteriza por una VFG <15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>. Además, la “Guía Clínica: Insuficiencia Renal Crónica Terminal” propone que los pacientes con presencia de síndrome urémico y ecografía que demuestra daño parenquimatoso requieren tratamiento de sustitución renal por diálisis o trasplante.<sup>3</sup>

**TABLA 1.** Etapas de la IRC.

Etapa	Descripción	VFG (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )
1	Riñón dañado con VFG normal o aumentada	≤ 90
2	Riñón dañado con leve disminución de VFG	60-89
3	Moderada disminución de VFG	30-59
4	Severa disminución de VFG	15-29
5	Insuficiencia Renal Crónica Terminal	<15 (diálisis)

Extraído de *KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification*.

La IRCT es un problema de salud pública mundial con una creciente incidencia y prevalencia con un diagnóstico pobre y de alto costo<sup>4</sup>.

En Chile las etiologías más frecuentes de esta enfermedad corresponden principalmente a enfermedades sistémicas como diabetes I o II (30,4%) e hipertensión arterial (11,4%). En menor medida es producida por enfermedades renales como glomerulonefritis crónica (10,2%). Sin embargo, en su etapa terminal generalmente la etiología es desconocida (24,4%)<sup>5</sup>.

Para los pacientes afectados por IRCT el trasplante renal constituye el tratamiento de elección, ya que mejora su sobrevida y calidad de vida.

## 1. 2. Trasplante renal

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico para situar un riñón funcional desde un donante en reemplazo a un riñón que no funciona correctamente en un paciente con patología renal severa.

En Chile, en el año 2013 la tasa de trasplante renal fue de 13,8 trasplantes por millón de habitantes y hasta ese mismo año en nuestro país se han realizado 7.001 trasplantes renales, sin embargo, 1.540 pacientes se encuentran aún en espera de un riñón<sup>6</sup>.

### **1. 2. 1. Manejo de pacientes**

Los pacientes candidatos a trasplante antes del procedimiento quirúrgico son sometidos a diversos tipos de exámenes con el fin de evaluar el estado completo de salud y además tratar y controlar enfermedades tales como diabetes, hipertensión, anemia y otros. Entre éstos se incluyen exámenes inmunológicos, cardíacos, sanguíneos, ginecológicos y urológicos. Además se realizan interconsultas dentales, otorrinas y oftalmológicas para descartar cualquier tipo de infección en los órganos asociados<sup>5</sup>.

Los exámenes son evaluados por el equipo médico, quienes deciden si el paciente es apto para recibir un nuevo órgano.

### **1. 2. 2. Terapia farmacológica de inmunosupresión**

Uno de los principales problemas de los trasplantes en general, es que el sistema inmune reconoce el órgano trasplantado como foráneo y por lo tanto, lo ataca conduciendo al rechazo del órgano. Eso se evita mediante inmunosupresión farmacológica, tratamiento que debe ser permanente y mantenerse hasta que el órgano continúe funcionando, aun cuando éste haya sufrido daño<sup>7</sup>.

Todos los pacientes necesitan tratamiento inmunosupresor, sin embargo, no todos necesitan el mismo tratamiento por lo que se debe individualizar según riesgos de toxicidad y la reactividad inmunológica del receptor. Para esto se emplean distintos fármacos que disminuyen la actividad del sistema inmune. El uso de estos medicamentos se divide en dos etapas:

*Inducción:* Se realiza en el periodo pre-trasplante o en el momento del trasplante. Su objetivo es establecer un nivel adecuado de inmunosupresión en el menor tiempo posible utilizando dosis altas de inmunosupresores<sup>7</sup>.

*Mantención:* En esta etapa se utilizan dosis decrecientes de los distintos agentes en la medida en que la etapa de mayor riesgo de rechazo (primeros 3 meses) se supera.

En la **TABLA 2** se puede apreciar un listado de los fármacos inmunosupresores frecuentemente utilizados tanto para inducción como mantención. En este caso, ciclosporina se ha convertido en el fármaco de primera elección en el tratamiento inmunosupresor.

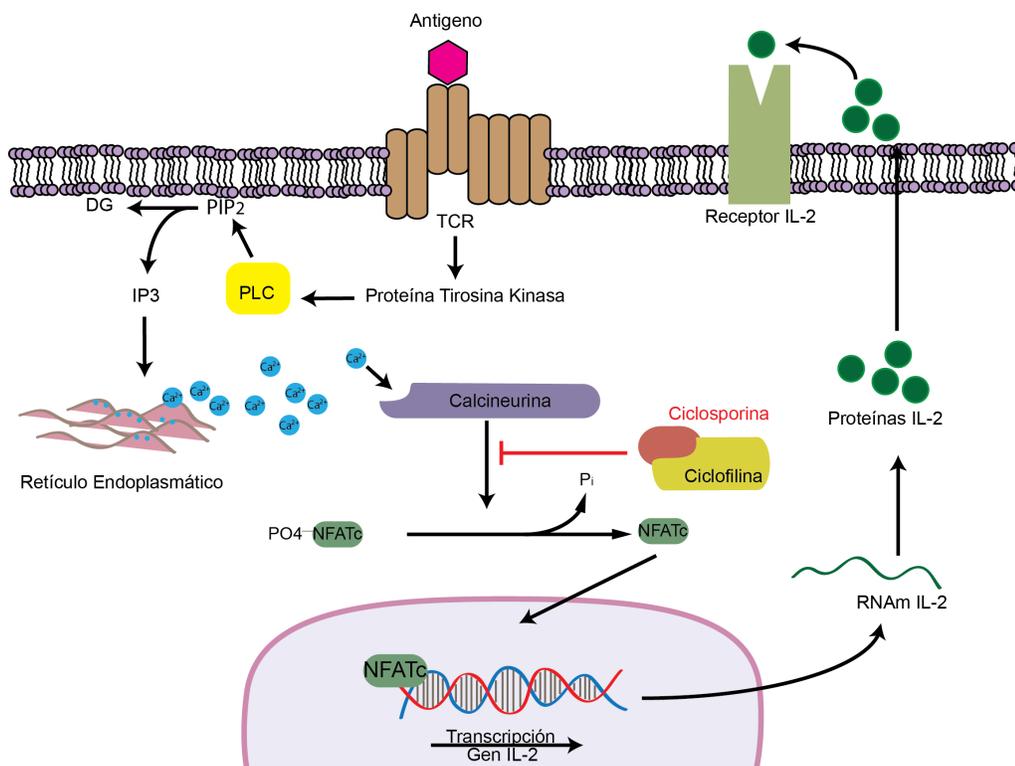
**TABLA 2.** Protocolo de fármacos inmunosupresores utilizados en inducción y mantención en pacientes trasplantados renales<sup>6</sup>.

Tipo de paciente	Protocolo	Inducción	Mantención
Trasplantados antes de 1995	1	Solumedrol®	Prednisona Azatioprina
Sin riesgo inmunológico	2	Solumedrol®	Prednisona Azatioprina Ciclosporina
Con riesgo inmunológicos, menores 15 años, retrasplantes, PRA > 50%	3.1	Solumedrol® Anti CD25 /Timoglobulina	Prednisona Azatioprina Tacrolimus
	3.2	Solumedrol® Anti CD25 /Timoglobulina	Prednisona Ciclosporina Micofenolato Mofetil
	3.3	Solumedrol® Anti CD25 /Timoglobulina	Prednisona Ciclosporina Rapamicina

### 1. 2. 3. Ciclosporina

La ciclosporina es un polipéptido cíclico, lipofílico producido por distintas cepas de hongos. Es una de las drogas más efectivas utilizadas para reducir el rechazo de órganos ya que posee una alta actividad inmunosupresora. Su efecto inmunosupresor se debe a la habilidad de bloquear la activación temprana de linfocitos T para inhibir la síntesis de citoquinas y en particular interleuquina-2 (IL-2).<sup>8</sup>

Las células T poseen un receptor llamado Receptor de Linfocito T (*T cell receptor*; TCR) el cual al activarse eleva el calcio intracelular y activa la subunidad catalítica de calcineurina. Una vez activada, ésta defosforila un factor de transcripción, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*), y causa su translocación al núcleo donde regula la expresión de múltiples citoquinas y otras moléculas necesarias para la activación completa de las células T (**FIGURA 1**). En este punto actúa ciclosporina, la cual se une a proteínas intracelulares llamadas inmunofilinas, específicamente ciclofilina, formando un complejo proteico. Este complejo se une a calcineurina inhibiendo su actividad y por lo tanto la activación de las células T<sup>9</sup>. (**FIGURA 1**)



**FIGURA 1. Mecanismo de acción de ciclosporina.** (Figura adaptada de *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 12th Edition*. 2011)

#### **1. 2. 3. 4. Propiedades farmacocinéticas de ciclosporina**

La ciclosporina posee una absorción errática e incompleta y ocurre principalmente en el intestino delgado. El pico de concentración se ha observado entre 1 a 6 horas luego de la administración oral. La vida media varía entre 5 a 18 horas, con un promedio de 8,4 horas. Tiene una biodisponibilidad promedio de 23% y puede estar afectada por múltiples variables tales como el consumo de alimentos y la cantidad de bilis secretada, dentro de las más importantes. Su volumen de distribución varía entre 4 a 6 L/kg. El 90 al 98% se une a proteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas. Se metaboliza principalmente en el hígado (>99%) vía el sistema citocromo P450 (CYP), principalmente por la enzima *CYP3A4* y además es sustrato de glicoproteína-P. Finalmente, su eliminación es principalmente biliar y menos del 1% de la dosis administrada es excretada sin cambios en la orina<sup>10</sup>.

#### **1. 2. 3. 5. Posología**

La ciclosporina es un fármaco de uso crónico y debe ser administrado en dos dosis divididas por un intervalo de 12 horas (mañana y tarde). El método más utilizado y respaldado por estudio farmacocinéticos para determinar la dosis de inicio de ciclosporina es mediante el peso<sup>11</sup>, el cual usualmente se encuentra en un rango de 7 a 8 mg/kg/día en pacientes adultos. A largo plazo la dosis se va disminuyendo a un ritmo que depende de la respuesta de cada paciente.

#### **1. 2. 3. 6. Reacciones adversas**

Una serie de reacciones adversas pueden ocurrir en pacientes tratados con ciclosporina, lo que hace indispensable una personalización de la dosis. A continuación se describen las principales reacciones adversas.

Nefrotoxicidad (10 al 38%): Puede ocurrir nefrotoxicidad aguda, la cual es caracterizada por ser dosis dependiente y es causada principalmente por efectos tóxicos en la vasculatura renal y efectos sistémicos de ciclosporina. Ocurre en la etapa temprana post-trasplante presentándose con aumentos de niveles de creatinina e hipertensión arterial en la mayoría de los casos, ambos de los cuales son normalizados al reducir la dosis de ciclosporina. La nefrotoxicidad crónica no es dosis dependiente, por lo tanto, en pacientes trasplantados renales se requiere una biopsia para diferenciar entre el rechazo y nefrotoxicidad por ciclosporina. La hipertensión puede ocurrir aproximadamente entre un 8 al 53% de los pacientes; náusea (23%); edema (5 al 14%); hirsutismo (21 al 45%); hipertrichosis (5 al 19%); hiperplasia gingival, aparece entre un 4 y 15%<sup>10,12,13</sup>.

### **1. 2. 3. 7. Monitorización de ciclosporina**

Los pacientes se monitorizan periódicamente en cuanto a las concentraciones de ciclosporina en sangre completa. Varios estudios farmacocinéticos han sugerido que la concentración de ciclosporina en sangre total a las 2 horas luego de su administración ( $C_2$ ) es el punto más efectivo para predecir el Área Bajo la Curva (ABC) en pacientes trasplantados<sup>15</sup>; sin embargo, no existe un rango terapéutico establecido en sangre debido a la complejidad del estado clínico del paciente y la farmacocinética característica de esta droga<sup>16, 17</sup>.

### **1. 3. Farmacogenómica**

La terapia farmacológica presenta respuestas variables ante un determinado medicamento de una población dada o de cierto grupo étnico. En este aspecto, se estima que la genética da cuenta entre el 20 y el 95% de variabilidad en la disposición de la droga y sus efectos, dependiendo del medicamento<sup>18</sup>. Por lo tanto, la farmacogenómica investiga los factores genéticos que pueden influenciar la respuesta variable de los individuos a la droga. Esta variabilidad de respuesta de los pacientes

ante un determinado medicamento se debe, al menos en parte, fundamentalmente a polimorfismos genéticos, que se producen por la variación en la secuencia de ADN, definidos como una característica mendeliana que se expresa en la población en al menos dos fenotipos, donde ninguno de ellos es muy raro y, por lo tanto ninguno de ellos ocurre con una frecuencia menor al 1% a diferencia de una mutación. Los polimorfismos pueden ser de varios tipos:

1. Sustitución de una única base, lo que da origen a lo que se conoce como SNP (Polimorfismo de un nucleótido).
2. Inserción o deleción de una base en el ADN.
3. Inserción o deleción de un conjunto de bases, en número de cientos a miles.
4. Inserción o deleción, repetidas veces, de una o más bases, constituyendo los microsatélites<sup>19</sup>.

Los polimorfismos genéticos farmacocinéticos y farmacodinámicos (mutaciones puntuales de un sólo nucleótido, SNP) afectan la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos. En este aspecto, es necesario destacar que un 70 al 80% del metabolismo de fase I de los fármacos es realizado por enzimas polimórficas<sup>20</sup>. De acuerdo a estos antecedentes, las enzimas de fase I, citocromo P450 (CYP) representan un foco de estudio muy relevante. Es por esto que, algunos estudios señalan que *CYP3A4*, *CYP3A5* y glicoproteína-P en el intestino e hígado pueden contribuir a la diferencia farmacocinética inter- e intra-individual de la ciclosporina<sup>21</sup>.

### **1. 3. 1. Sistema citocromo P450**

Como fue anteriormente mencionado las enzimas más importantes que metabolizan medicamentos son las que pertenecen al Sistema citocromo P450 la cual es una superfamilia de isoenzimas clasificada en familias, subfamilias y enzimas específicas. Las CYPs son las enzimas metabolizadoras de drogas más importantes de Fase I, responsables de aproximadamente el 50% de sustancias endógenas y

exógenas. Hay tres familias que son las principales contribuyentes al metabolismo oxidativo, estas son CYP1, CYP2 y CYP3<sup>22</sup>.

Ciclosporina, en particular, es sustrato metabólico de la subfamilia de enzimas 3A, en este caso *CYP3A4* y *CYP3A5*<sup>23</sup>.

Las diferentes variantes genéticas de *CYP3A4*, *CYP3A5* causan una variación en el metabolismo y distribución de ciclosporina. Esto puede conducir a diferentes concentraciones de la droga dentro del sistema circulatorio y en los sitios blancos, influenciando tanto la eficacia del fármaco como la susceptibilidad del individuo ante las interacciones del medicamento o la toxicidad de éste<sup>24</sup>.

### **1. 3. 1. 1. Polimorfismos genéticos de *CYP3A4* y *CYP3A5***

El gen *CYP3A4* está localizado en el cromosoma 7q22.1 y tiene 27kb de largo aproximadamente y consiste en 13 exones y 12 intrones. Han sido identificados hasta la fecha más de 23 SNP de *CYP3A4* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm> 8 abril 2014). La variante *CYP3A4\*1A* se ha referido como silvestre, ya que fue la primera en ser descubierta, es mas frecuente y presenta una actividad enzimática considerada normal. *CYP3A4\*1B* (rs2740574) es el SNP mas estudiado, el cual posee una transición de A a G en la posición -392 en la región promotora 5' del gen *CYP3A4*. El efecto de este polimorfismo es controversial. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que su expresión lleva a un aumento en la actividad de transcripción de *CYP3A4*, mientras que otros estudios, no han mostrado efectos funcionales en el metabolismo de algunas drogas<sup>25</sup>.

La frecuencia del polimorfismo varía dependiendo del grupo étnico. *CYP3A4\*1B* está presente en aproximadamente en el 2 a 9,6% de los caucásicos, 35 a 76% de los africanos, 9,3 a 11% de los hispánicos y 0% en los asiáticos<sup>26</sup>. En la población Chilena, la frecuencia es de 5% (Roco *et al.*, 2012)<sup>27</sup>.

Por su parte, el gen *CYP3A5* está localizado en el cromosoma 7q21-q22.1 y contiene 13 exones. Hasta la fecha se han identificado 11 SNPs siendo el más estudiado una transición de G a A en la posición 6986 en el intrón 3 del gen *CYP3A5*, llamado también *CYP3A5\*1* (Kuehl *et al.*, 2001)<sup>28</sup>, el cual codifica una proteína activa responsable de un aumento en el metabolismo de las drogas. El alelo variante es *CYP3A5\*3* (rs776746) y codifica una proteína no funcional, debido a un *splicing* alternativo que lleva a un truncamiento de la proteína y por lo tanto, ausencia de expresión.

La frecuencia de *CYP3A5\*1* también depende de la etnia. Está presente en aproximadamente el 5 a 15% de los caucásicos, 45 a 73% de los afroamericanos, 15 a 35% de los asiáticos y 25% de los mexicanos<sup>29</sup>. En la población Chilena la frecuencia de esta variante es de 24% (Roco *et al.*, 2012)

### **1. 3. 2. Proteína de resistencia múltiple a drogas**

Ciclosporina es transportada fuera de la célula por la bomba de eflujo, glicoproteína-P (P-gp) la cual es producto del gen de Multi-resistencia a Drogas (*MDR-1* o *ABCB1 ATP-binding cassette 1*), que constituye una gran familia de proteínas que transportan una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos a través de la membrana en contra de la gradiente de concentración mediante la utilización de ATP por lo tanto, reducen la carga de sustancias potencialmente dañinas en el cuerpo, causando resistencia a las drogas. La familia ABC está compuesta por subfamilias, las cuales son *ABCB1* (*MDR1*/glicoproteína-P de la subfamilia *ABCB*), subfamilia *ABCC* (*MRPs*), y *ABCG2* (*BCRP* de subfamilia *ABCG*), y que son expresados en varios órganos<sup>30,31</sup>.

La proteína de *ABCB1* (*MDR1* o P-gp), se encuentra en el epitelio del intestino, hígado, riñón, barrera hemato-encefálica, testículos, placenta y pulmones. La ciclosporina es un sustrato de *ABCB1* por lo que P-gp intestinal puede ser la responsable de la reducida absorción de ciclosporina en el intestino<sup>32,33</sup>. Además las

variaciones interindividuales en su expresión y función pueden deberse a factores genéticos. Varios SNPs han sido identificados para *MDR1*<sup>34,35</sup>.

El polimorfismo *3435 C>T* (rs1045642) produce un cambio de nucleótido de citocina a timina el cual corresponde a un cambio sinónimo, es decir que no lleva a cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína; sin embargo, puede reducir la estabilidad del ARNm de ABCB1 en el hígado, como también cambiar el doblamiento de la proteína y su actividad. El homocigoto para el alelo T ha resultado en una reducción de dos veces de la expresión de P-gp en el estómago<sup>36</sup>. Otro polimorfismo estudiado es el *2677 G>T/A* (rs2032582) y corresponde a un cambio del nucleótido guanina a timina o adenina que deriva en un cambio aminoacídico de alanina a serina o treonina, respectivamente. Similarmente a *3435 C>T*, el homocigoto para el alelo T o A se ha encontrado con una menor actividad<sup>37</sup>.

Por lo tanto, las variaciones en la expresión y función de *CYP3A4*, *CYP3A5* y P-gp pueden constituirse en factores genéticos que condicionan la farmacocinética de ciclosporina en los pacientes con trasplante renal.

De acuerdo con todos los antecedentes bibliográficos anteriormente expuestos, el presente trabajo de tesis plantea la siguiente hipótesis:

## **2. Hipótesis**

“Existe una relación entre las variantes genéticas de *CYP3A4*, *CYP3A5* y glicoproteína-P y la variación farmacocinética de ciclosporina en los pacientes trasplantados renales, lo que condiciona su respuesta clínica”.

Esta hipótesis fue abordada mediante los siguientes objetivos de trabajo:

## **3. Objetivo general**

Determinar la asociación entre presencia de las variantes genéticas de *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3* y glicoproteína-P (*2677G>T/A*, *3435C>T*) y la respuesta a ciclosporina en pacientes con trasplante renal.

## **4. Objetivos específicos**

1. Determinar la presencia de las variantes *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435C>T* y *MDR1 2677 G>T/A* en pacientes trasplantados renales.
2. Establecer asociaciones entre la presencia de las variantes genéticas individuales o combinadas y la eficacia del tratamiento con ciclosporina, mediante seguimiento clínico de cada paciente, y el uso de métodos estadísticos apropiados.
3. Establecer asociaciones entre la presencia de las variantes genéticas individuales o combinadas y la seguridad del tratamiento con ciclosporina, mediante la observación y registro de efectos adversos, y el uso de métodos estadísticos apropiados.
4. Establecer asociaciones entre la presencia de las variantes genéticas individuales o combinadas y los niveles plasmáticos de ciclosporina.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5. 1. MATERIALES

Para la extracción de sangre periférica se utilizaron tubos con EDTA como anticoagulante (BD *vacutainer*, EE.UU.). Para la purificación del DNA se utilizó un sistema comercial de purificación de DNA genómico de sangre periférica (High Pure PCR *Template Preparation* Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania).

Para las PCRs se utilizaron partidores específicos indicados en la **TABLA 10 (ANEXO 1)** (sintetizados por Invitrogen, Brasil), PCR *Water* (Bioline, Taunton, MA, EE.UU), dNTP Mix 100 mM (mezcla de dATP, dTTP, dGTP y dCTP) (Bioline, Taunton, MA, EE.UU), DNA polimerasa *Taq* recombinante (Biotools, Madrid, España) con tampón de reacción 10X (Tris-HCl 200 mM (pH 8), KCl 500 mM), MgCl<sub>2</sub> 500 mM.

En el estudio de la PCR-RFLP se utilizaron las enzimas de restricción *MbolI*, *BseMII*, *Sau3AI*, *NheI*, *XbaI* y *RsaI* (Thermo Scientific, Lithuania, EE.UU). Para la visualización de los fragmentos de restricción se utilizaron los marcadores de peso molecular de 100-1000 pb *Hyperladder* IV y de 50- 2000 pb *Hyperladder* II (Bioline, Taunton, MA, EE.UU.) en geles de agarosa y poliacrilamida (Bioline, Taunton, MA, EE.UU.) con bromuro de etidio (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil). Para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó el tampón Tris- borato (TBE) 1X (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 0,5 M pH 8 y para la electroforesis vertical se utilizó gel de poliacrilamida (30%), Tris 1,5 M pH 8, persulfato de amonio (Winkler, Santiago, Chile) y TEMED (Merck, Darmstadt, Alemania). Como tampón se usó Tris 25 mM (Merck, Darmstadt, Alemania) – glicina 192 mM pH 8 (Merck, Darmstadt, Alemania).

## 5. 2. MÉTODOS

### 5. 2. 1. Pacientes

Se invitaron a participar al estudio pacientes que fueron sometidos a un trasplante renal entre los años 2004 y 2013 en el Hospital San Juan de Dios en base al siguiente criterio de inclusión: pacientes hombres y mujeres, mayores a 18 años al recibir el injerto y tratados con ciclosporina genérica.

Todos los pacientes fueron informados a través de su médico tratante sobre el estudio en cuanto a los riesgos y beneficios, mediante un consentimiento informado **(ANEXO 2)**. De los 67 pacientes seleccionados, 39 son hombres y 28 son mujeres y en el momento del trasplante poseían una edad promedio de  $43,2 \pm 12,8$  años, un peso de  $64,3 \pm 11,3$  kg e IMC  $24,37 \pm 3,7$  kg/m<sup>2</sup>.

Posterior a la aceptación del consentimiento informado por parte de cada paciente, se accedió a sus fichas clínicas correspondientes con el fin de analizar la evolución clínica posterior al trasplante renal y la obtención de datos relevantes para el estudio hasta un año después del procedimiento.

### 5. 2. 2. Concentración de ciclosporina

La medición de ciclosporina se llevó a cabo en el Hospital San Juan de Dios mediante un sistema de inmunoensayo homogéneo, *CEDIA® Cyclosporine PLUS* en sangre completa. Desde el sistema informático del Hospital San Juan de Dios, se obtuvieron todas las concentraciones de ciclosporina disponibles en el periodo de un año post-trasplante por paciente. Estos niveles corresponden a la concentración encontrada en sangre a las 2 horas luego de la administración de ciclosporina (C<sub>2</sub>) en la madrugada.

Se debe destacar, que las concentraciones C<sub>2</sub> que se utilizaron en esta investigación están ajustada a dosis y peso (ng/mL por mg/kg) de cada día en que se registran niveles, por cada paciente (Concentraciones C<sub>2</sub> ajustada).

Además, para asegurar que las concentraciones  $C_2$  ajustada de ciclosporina se encontraran en estado estacionario, se consideró la vida media máxima de ciclosporina (18 horas) y se utilizaron cinco vidas medias para el cálculo; por lo tanto, desde el día 3,75 (~4 días), se comenzaron los análisis.

### **5. 2. 3. Extracción y purificación de DNA**

A los pacientes seleccionados, un profesional capacitado les extrajo sangre en tubos con EDTA como anticoagulante en la unidad de toma de muestra en el Hospital San Juan de Dios y posteriormente las muestras fueron transportadas en una nevera al laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF), donde se realizó este trabajo, las cuales una vez recibidas se centrifugaron a 2500 r.p.m. por 25 minutos a 10 °C con el fin de obtener una concentración de células blancas y plaquetas (*Buffy Coat*). Posteriormente se extrajeron 400 µL de *buffy coat* y se aisló el DNA en duplicado con el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Una vez extraído el DNA de cada paciente se almacenó a -20°C.

### **5. 2. 4. Análisis genotípico**

Los pacientes fueron genotipificados para *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435 C>T* (exón 26), *MDR1 2677 G>T/A* (exón 21) mediante una amplificación por *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) en un termociclador G-STORM y una digestión con enzimas de restricción específicas para cada variante. Los partidores y enzimas utilizados para cada polimorfismo se encuentran en **ANEXO 1**.

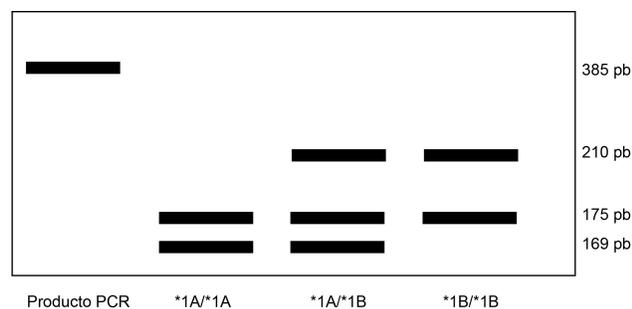
Los productos de PCR se sometieron a digestión en una placa termoreguladora Major Science MD – 01N (Major Science, Saratoga, CA, EE.UU.) con la enzima de restricción correspondiente.

### 5. 2. 4. 1. Identificación del alelo *CYP3A4\*1B*

Se utilizó una adaptación del método descrito por Cavalli *et al.*, (2001)<sup>38</sup> en el que se amplifica la región promotora 5' del gen humano *CYP3A4* desde los nucleótidos -318 a +67 el cual contiene un cambio en la posición -290 de adenina a guanina (Rebbeck *et al.*). La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL compuesto por 5 µL de DNA, 0,25 µL de cada partidor, 2 U de DNA Polimerasa y 2,5 µL tampón 10x, 2,5 µL dNTP, 3 µL de MgCl<sub>2</sub> y 11,1 µL de agua.

Las condiciones de PCR consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 63 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto, seguido de un paso de extensión final de 72 °C por 7 minutos. La secuencia amplificada se sometió a digestión con la enzima de restricción *MbolI* a 37 °C durante 2 horas. El producto digerido fue analizado por separación en electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida 16%.

Los patrones de corte se visualizaron en un transiluminador UV (Vilbert-Loumart, Deutschland, Alemania), estos son: para el genotipo homocigoto silvestre (\*1/\*1) se obtiene un patrón de restricción bandas de 175 y 168 pb; para el genotipo heterocigoto (\*1/\*1B), bandas de 210, 175 y 168 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (\*1B/\*1B), una banda de 210 y 175 pb (**Figura 2**).



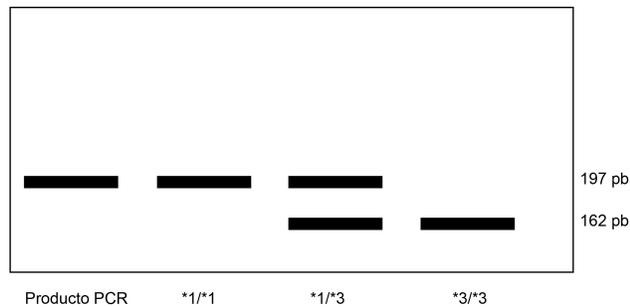
**FIGURA 2.** Producto PCR y patrones de corte con enzima *MbolI* para polimorfismo *CYP3A4\*1B*.

#### 5. 2. 4. 2. Identificación del alelo CYP3A5\*3

Se utilizó una adaptación del método propuesto por Lee *et al.* (2005)<sup>39</sup> en el cual se amplifica parte del intrón 3 que contiene un cambio de nucleótido en la posición 6986 de adenina a guanina. En la secuencia de partidor directo se usó un nucleótido no concordante a cuatro bases del extremo 3', para introducir un sitio de restricción específico para la enzima *BseMII*. La reacción se realizó en un volumen total de 25  $\mu$ L compuesto por 5  $\mu$ L de DNA, 0,20  $\mu$ L de cada partidor, 2 U de DNA Polimerasa y 2,5  $\mu$ L tampón 10x, 2,5  $\mu$ L dNTP 2,0  $\mu$ L de  $MgCl_2$  y 12,2  $\mu$ L de agua.

Las condiciones de amplificación constaron de una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 54,5 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y una etapa de extensión final a 72 °C por 5 minutos. La secuencia amplificada se sometió a digestión con la enzima de restricción *BseMII* a 55 °C por 2 horas. El producto digerido fue analizado por separación en electroforesis horizontal en un gel de agarosa 2,2 %.

Los patrones de corte se visualizaron en un transiluminador UV (Vilbert-Loumart, Deutschland, Alemania), estos son: para el genotipo homocigoto silvestre (\*1/\*1) se obtiene un patrón de restricción bandas de 197 pb; para el genotipo heterocigoto (\*1/\*3), bandas de 197 y 162 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (\*3/\*3), una banda 162 pb (**Figura 3**).



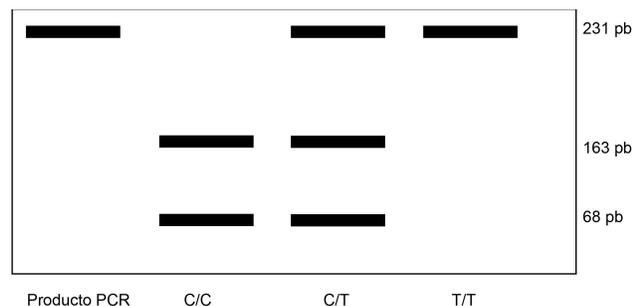
**FIGURA 3.** Producto PCR y patrones de corte con enzima *BseMII* para polimorfismo CYP3A5\*3.

### 5. 2. 4. 3. Identificación del alelo *MDR1* 3435 C>T

Se llevó a cabo mediante una adaptación del método propuesto por Samar *et al.* (2002)<sup>40</sup> en el cual se amplifica un fragmento de 231 pb del exón 26, que contiene un cambio de nucleótido en la posición 3435 de citosina a timina. La reacción se realizó en un volumen total de 25 µL compuesto por 5 µL de DNA, 0,25 µL de cada partidor, 2 U de DNA Polimerasa y 2,5 µL tampón 10x, 2,5 µL dNTP 3 µL de MgCl<sub>2</sub> y 11,1 µL de agua.

La amplificación por PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 54,6 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos y una etapa de extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto de PCR se sometió a una digestión por 2 horas con la enzima de restricción *Sau3AI* y se separaron los fragmentos mediante una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2,2%.

Los patrones de corte se visualizaron en un transiluminador UV (Vilbert-Loumart, Deutschland, Alemania), estos son: para el genotipo homocigoto silvestre (C/C) se obtiene un patrón de restricción bandas de 163 y 68 pb; para el genotipo heterocigoto (C/T), bandas de 231, 163 y 68 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (T/T), bandas de 231 pb (**Figura 4**).



**FIGURA 4.** Producto PCR y patrones de corte con enzima *Sau3AI* para polimorfismo *MDR1* 3435 C>T

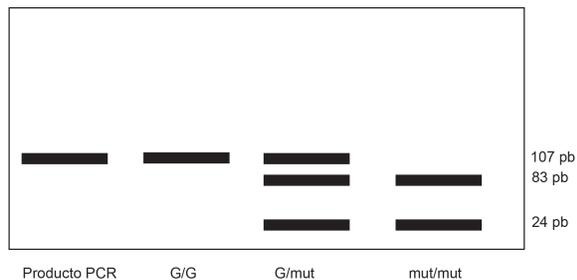
#### 5. 2. 4. 4. Identificación del alelo *MDR1* 2677 G>T/A

Se realizó mediante una adaptación del método propuesto por Tanabe *et al.*, (2001)<sup>41</sup> que consiste en una amplificación del exón 21, el cual contiene un cambio nucleotídico en la posición 2677 de guanina a timina o adenina. Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25  $\mu$ L compuesto por 5  $\mu$ L de DNA, 0,25  $\mu$ L de cada partidor, 2 U de DNA Polimerasa y 2,5  $\mu$ L tampón 10x, 2,5  $\mu$ L dNTP 3  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> y 11,1  $\mu$ L de agua.

Para la identificación del alelo silvestre (G) se utilizó un partidor inverso que contiene dos nucleótidos no concordantes, a tres y cinco bases del extremo 3' que entregan un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NheI*.

La amplificación por PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 51,3 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una etapa de extensión final a 72 °C por 5 minutos. El producto se sometió a una digestión por 2 horas con la enzima de restricción *NheI* a 37 °C y se observaron las bandas mediante electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida 18%.

Los patrones de corte se visualizaron en un transiluminador UV (Vilbert-Loumart, Deutschland, Alemania), estos son: para el genotipo homocigoto silvestre (G/G) se obtiene un patrón de restricción con bandas de 83 y 24 pb; para el genotipo heterocigoto (G/mut), bandas de 107, 83, 24 pb, y para el genotipo homocigoto mutado (mut/mut), una banda de 107 pb (**Figura 5**).



**FIGURA 5.** Producto PCR y patrones de corte con enzima *NheI* para polimorfismo *MDR1* 2677 G>T/A.

### **5. 2. 5. Aspectos éticos**

El protocolo de este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Evaluación Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con la autorización del Hospital San Juan de Dios, bajo la supervisión de la Dra. María Soledad Rodríguez, Jefa de Unidad de Nefrología y Trasplante.

En todos los procedimientos se respetaron rigurosamente las normativas nacionales e internacionales, que incluyen la Ley 20.120 que versa sobre la investigación científica en el ser humano y su genoma, las buenas prácticas clínica (GCP) y la Ley de derechos y deberes del paciente (Ley 20.584).

### **5. 2. 6. Análisis estadístico**

Se utilizó estadística descriptiva para calcular medidas de tendencia central y dispersión de datos para características antropométricas. Para comparar promedios entre grupos en un solo punto en el tiempo se utilizó *t* de *student*. Además, se buscó relación entre dos parámetros utilizando correlación *Spearson*. Para evaluar el riesgo de la presencia de efectos adversos y episodios de rechazo asociados a los genotipos de cada paciente, se utilizó un cálculo de *odd ratios* (OR), utilizando tablas de cálculo de 2x2. Los análisis se realizaron con el programa STATA 12.0 y se utilizó como criterio de significancia un *p value* de 0,05.

## 6. RESULTADOS

### 6. 1. Pacientes

Posterior a la autorización mediante la firma de un consentimiento informado y el procedimiento normado de acuerdo a la Ley 20.584, se pudo acceder a las fichas clínicas de los 67 pacientes de las cuales se recopiló información desde el primer día post-trasplante hasta el año. La información extraída corresponde a características mórbidas y clínicas, como también los niveles de Ciclosporina y creatinina, terapias farmacológicas indicadas en el periodo y efectos adversos registrados.

Los pacientes estudiados, poseían una edad promedio de  $43,2 \pm 12,8$  años, un peso de  $64,3 \pm 11,3$  kg e IMC  $24,37 \pm 3,7$  kg/m<sup>2</sup>, en la fecha del trasplante. El 75% éstos tiene IRCT por causa desconocida, para el 97% corresponde a su primer trasplante y el 99% recibió un injerto de donante cadavérico. **(TABLA 3)**

**TABLA 3.** Características de los pacientes

<b>Género (hombres/mujeres)</b>	<b>39/28</b>
Edad (años)*	43,2 ± 12,8
Peso (kg)	64,3 ± 11,3
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24,37 ± 3,7
Ciclosporina (Equoral/Gengraf)	53 (79%)/14 (21%)
Primer/Segundo trasplante	65 (97%)/2 (3%)
Donante Cadáver/vivo	66 (99%)/1 (1%)
Etiología de la IRCT	N (%)
Pielonefritis Crónica	5 (7%)
Nefrosclerosis	4 (6%)
Riñón Poliquístico	2 (3%)
Nefropatía Diabética	1 (1%)
Glomerulopatía	1 (1%)
Malformación renal	2 (3%)
Glomerulonefritis	2 (3%)
Desconocida	50 (75%)
Enfermedades secundarias	
Diabetes	3 (4%)
Hipertensión	11 (16%)
Otras	9 (13%)

\*Promedio ± desviación estándar

Dentro de los parámetros clínicos analizados, los valores de creatinina y ciclosporina  $C_2$  reportados corresponden a mediciones realizadas el mismo día para ambos parámetros.

La creatinina promedio en sangre fue de  $2,47 \pm 1,58$  ng/mL, la cual varía según en el periodo en que se encuentra el paciente. Como se observa en la **TABLA 4**, en los primeros días post-trasplante, la creatinina se ve elevada ( $4,53 \pm 3,22$  ng/mL), para luego descender hasta niveles más estables, sin embargo existe una gran variabilidad, que depende de la respuesta de cada paciente al tratamiento.

En cuanto a las concentraciones de ciclosporina  $C_2$  ajustada, son bajas en el inicio de la terapia hasta la segunda semana post-trasplante, luego se mantiene a pesar de que las dosis disminuyen periódicamente. (**TABLA 5**)

Sobre las dosis diaria administrada, se observa que en promedio la dosis de inicio alcanza  $457,24 \pm 67,26$  mg/día y se disminuye periódicamente hasta alcanzar los  $111,20 \pm 62,04$  mg/día en el mes 11. (**TABLA 6**)

Para estos datos, creatinina, ciclosporina  $C_2$  y dosis diaria, la cantidad de pacientes incluidos disminuye progresivamente, debido a que la frecuencia de controles disminuye. Por lo tanto, se ha indicado la cantidad de pacientes (N) a los cuales se les obtuvieron los datos mencionados de un total de 67 pacientes.

**TABLA 4.** Promedio de concentraciones de creatinina.

<i>Tiempo post-trasplante</i>	<i>N</i>	<i>Creatinina (mg/dL)</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
Día 4	38	4,53	3,22	0,71
Día 7	49	3,90	3,08	0,79
Día 14	47	2,27	1,83	0,81
Mes 1	55	1,57	1,10	0,70
Mes 1,5	26	1,57	0,83	0,53
Mes 2	37	1,52	0,60	0,39
Mes 3	23	1,58	0,67	0,43
Mes 4	12	1,80	0,48	0,26
Mes 5	14	1,59	0,70	0,44
Mes 6	7	2,53	2,69	1,06
Mes 7	5	1,72	0,59	0,34
Mes 8	4	1,89	0,48	0,25
Mes 9	4	1,51	0,33	0,22
Mes 10	5	1,47	0,38	0,26
Mes 11	6	2,40	1,16	0,48
Promedio	63	2,47	1,58	0,64

N: número de pacientes SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

**TABLA 5.** Promedio de concentraciones de ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada.

<i>Tiempo post-trasplante</i>	<i>N</i>	<i>Promedio (ng/mL por mg/kg)</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
Día 4	40	141,57	53,13	0,38
Día 7	53	162,32	57,36	0,35
Día 14	52	181,46	72,60	0,40
Mes 1	60	244,43	79,89	0,33
Mes 1,5	28	285,44	97,19	0,34
Mes 2	39	290,44	107,07	0,37
Mes 3	25	279,31	69,82	0,25
Mes 4	13	276,01	108,75	0,39
Mes 5	16	258,02	77,68	0,30
Mes 6	8	288,00	130,78	0,45
Mes 7	5	267,60	82,08	0,31
Mes 8	4	303,78	122,45	0,40
Mes 9	4	279,66	86,05	0,31
Mes 10	5	216,23	121,43	0,56
Mes 11	7	357,03	125,15	0,35
Promedio	67	220,62	47,62	0,22

N: número de pacientes SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

**TABLA 6.** Promedio de dosis diaria administrada

<i>Tiempo post-trasplante</i>	<i>N</i>	<i>Promedio (mg/día)</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
Día 4	38	457,24	67,26	0,15
Día 7	54	411,11	65,46	0,16
Día 14	51	369,61	59,02	0,16
Mes 1	60	313,18	85,44	0,27
Mes 1,5	28	259,82	45,31	0,17
Mes 2	39	258,97	47,12	0,18
Mes 3	26	240,38	40,05	0,17
Mes 4	13	221,15	45,47	0,21
Mes 5	16	212,50	38,73	0,18
Mes 6	9	205,56	30,05	0,15
Mes 7	5	200,00	0,00	0,00
Mes 8	4	200,00	40,82	0,20
Mes 9	5	190,00	54,77	0,29
Mes 10	5	220,00	27,39	0,12
Mes 11	5	177,20	62,04	0,35
Promedio	67	320,51	57,67	0,18

N: número de pacientes SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

### 6. 1. 1. Terapia farmacológica

Los pacientes, en el periodo de inducción recibieron una terapia inmunosupresora que consistió en azatioprina, metilprednisolona y ciclosporina. La dosis inicial de ciclosporina fue ajustada al peso de cada paciente ( $7,14 \pm 0,9$  mg/día) y luego según la evolución clínica fue disminuyendo. En el periodo de mantenimiento, la metilprednisolona fue reemplazada por dosis decrecientes de prednisona.

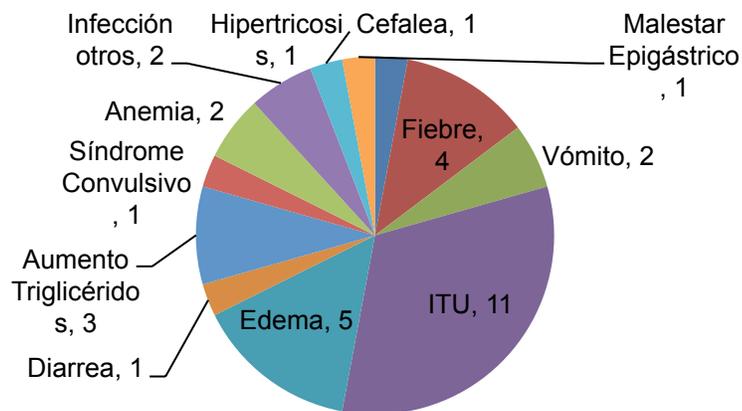
En ambos periodos se observaron fármacos indicados para el tratamiento y profilaxis de las principales reacciones adversas de la terapia de inmunosupresión con ciclosporina. La hipertensión y las infecciones orales son unas de estas, por lo tanto todos los pacientes reciben tratamientos que están indicados por protocolo para estas enfermedades.

De acuerdo a lo mencionado, la totalidad de los pacientes estudiados recibió terapia farmacológica de antihipertensivos como: nitrendipino, nifedipino, furosemida, metildopa, atenolol y propanolol. El tratamiento tiene como objetivo mantener la presión

arterial <140/90 mmHg y <130/80 mmHg en pacientes con diabetes<sup>42</sup>. Sin embargo, existen pacientes que tienen descompensada esta condición a pesar del tratamiento farmacológico y corresponde al 26,9% de los pacientes estudiados.

Sobre las infecciones orales, se les indica a todos los pacientes tratamiento con enjuagues de nistatina como profilaxis con una frecuencia de 4 veces al día por alrededor de 3 meses dependiendo de los síntomas de cada paciente.

Además, se registró que el 44,8% de los pacientes presentaron efectos adversos los cuales han sido asociados a ciclosporina y se pueden observar a continuación:



**FIGURA 6.** Efectos adversos registrados. ITU: Infección del Tracto Urinario

La presencia de ITU es lo más frecuente en estos pacientes, reflejo del estado de inmunosupresión. Es seguido en frecuencia por edemas debido a una mala función del riñón y que ocurre generalmente en las piernas y brazos.

También se registró que el 20,9% de los pacientes tuvo sospecha de episodio de rechazo, por lo cual se les administraron inmunosupresores adicionales. Algunos de estos episodios se confirmaron con ecografía o biopsia.

Otros fármacos administrados corresponden a antimicóticos (ketoconazol, fluconazol), antibacterianos (cotrimoxazol, ciprofloxacino, gentamicina, amikacina, metronidazol),

antivirales (aciclovir, ganciclovir, valganciclovir), los cuales son indicados para el tratamiento de patologías oportunistas por la condición de inmunosupresión de los pacientes. Adicionalmente, agentes gastrointestinales (omeprazol, ranitidina), son prescritos frecuentemente.

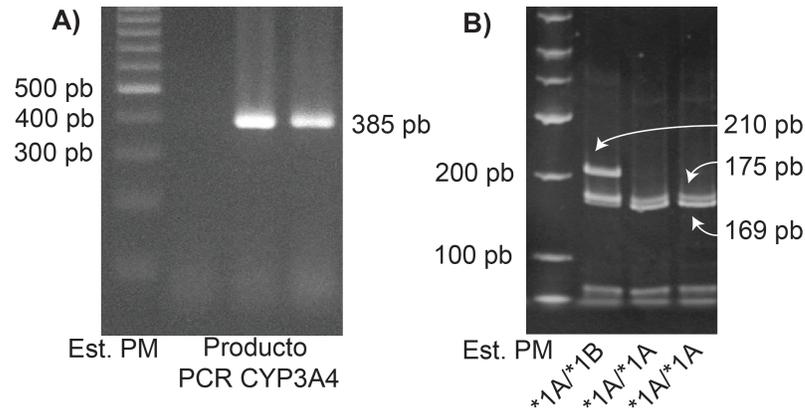
Todos los fármacos mencionados fueron analizados en la búsqueda de interacciones farmacocinéticas, es decir drogas que afecten las vías de metabolización de ciclosporina. Para esto, se realizó una búsqueda bibliográfica y de esta forma se detectó que los principales fármacos que pueden afectar la farmacocinética de ciclosporina son fluconazol, corticoides (prednisona, metilprednisolona) y antagonistas de canales de calcio.

Fluconazol es un inhibidor moderado de *CYP3A4*, de este modo puede aumentar las concentraciones plasmáticas de la ciclosporina<sup>43</sup>. Sin embargo, la bibliografía consultada señala que esta interacción puede ser dependiente de la dosis administrada, ya que a bajas dosis hay consistencia de que no habrá alteraciones en la concentración de la ciclosporina, no así a dosis más elevadas donde la interacción se vuelve relevante, por lo tanto en caso de sospecha se deberá evaluar este parámetro<sup>44,45,46</sup>.

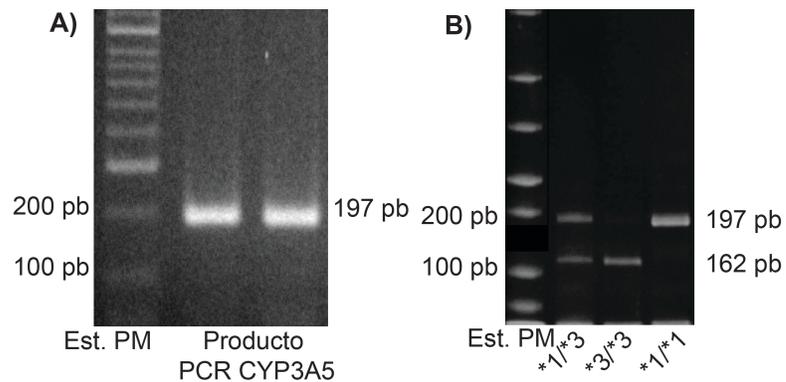
Tanto los antagonistas de los canales de calcio como los corticoesteroides son sustratos de *CYP3A4* y se comportan como inhibidores de esta isoenzima, conduciendo a elevaciones de los niveles plasmáticos de la ciclosporina<sup>47,43</sup>. Aun así, no hay certeza acerca de si esta inhibición efectivamente afecta la concentración de la ciclosporina, ya que la literatura científica consultada muestra resultados contradictorios<sup>44,47</sup>.

## 6. 2. Análisis genotípico

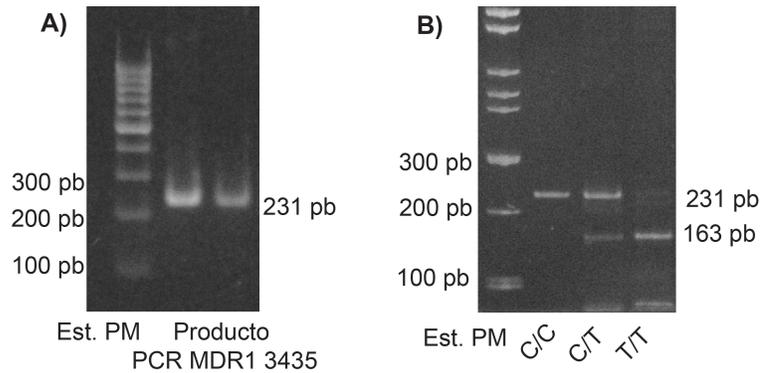
Luego de la extracción de DNA de cada muestra de sangre, se procedió a realizar la genotipificación de *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435 C>T* y *MDR1 2677 C>T*, de la forma en que se describió anteriormente, tal y como se muestra en las Figuras 7, 8, 9 y 10, a continuación:



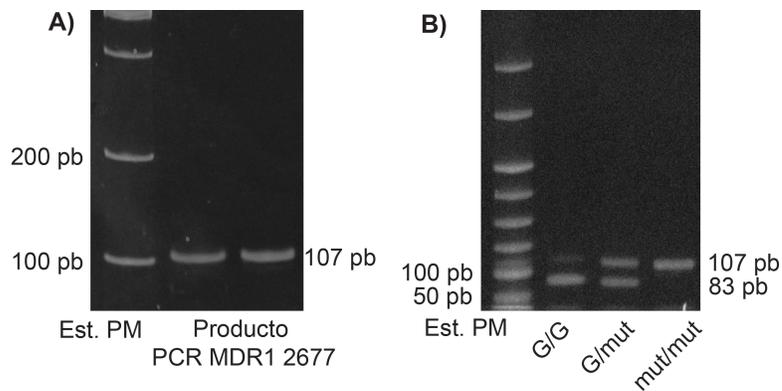
**FIGURA 7. A)** Producto PCR para detección de polimorfismo *CYP3A4\*1B* en gel de agarosa. **B)** Producto de digestión con enzima *MbolI* en gel de poliacrilamida 18%.



**FIGURA 8. A)** Producto PCR para detección de polimorfismo *CYP3A5\*3* en gel de agarosa. **B)** Producto de digestión con enzima *BseMII* en gel de poliacrilamida 18%.



**FIGURA 9. A)** Producto PCR para la detección de polimorfismo *MDR1* 3435 C>T en gel de agarosa. **B)** Producto de digestión con enzima *Sau3AI* en gel de poliacrilamida 18%.



**FIGURA 10. A)** Producto PCR para la detección de polimorfismo *MDR1* 2677 G>T/A en gel de poliacrilamida 18%. **B)** Producto de digestión con enzima *NheI* en gel de poliacrilamida 18%.

La **Tabla 7**, muestra las frecuencias genóticas y alélicas para los polimorfismos analizados en los 67 pacientes trasplantados renales.

Se puede apreciar que para el polimorfismo *CYP3A4\*1B*, 58 pacientes resultaron ser homocigotos silvestres (\*1A/\*1A) mientras que 9 pacientes son heterocigotos (\*1A/\*1B) y no se hallaron pacientes homocigotos mutados (\*1B/\*1B). Por otra parte, para el polimorfismo *CYP3A5\*3* se identificaron, 45 pacientes homocigotos mutado (\*3/\*3) y 19 corresponden a heterocigotos (\*1/\*3) y 3 pacientes a homocigoto silvestre (\*1/\*1). En este caso, se agruparon estos dos últimos genotipos

con el fin de estudiar la influencia de la presencia del alelo silvestre (\*1). Por otro lado, para el polimorfismo *MDR1* 3435 C>T, se encontraron 21 pacientes homocigoto silvestres (C/C), 32 heterocigotos (C/T) y 14 homocigoto mutado (T/T). Para *MDR1* 2677 G>T/A, 13 pacientes presentan el genotipo homocigoto silvestre (G/G) mientras que 47 pacientes resultaron heterocigotos (G/mut) y 7 homocigoto mutado (mut/mut).

**TABLA 7.** Frecuencia genotípica y alélica de los pacientes trasplantados renales estudiados para los polimorfismos genéticos de *CYP3A4*, *CYP3A5* y *MDR1*.

<i>Frecuencia Genotípica n (%)</i>			<i>Frecuencia Alélica n (%)</i>	
<i>CYP3A4</i>				
<b>*1A/*1A</b> 58 (86,6%)	<b>*1A/*1B</b> 9 (13,4%)	<b>*1B/*1B</b> 0	<b>*1A</b> 125 (93,3%)	<b>*1B</b> 9 (6,7%)
<i>CYP3A5</i>				
<b>*1/*1</b> 3 (4,5%)	<b>*1/*3</b> 19 (28,3%)	<b>*3/*3</b> 45 (67,2%)	<b>*1</b> 25 (18,7%)	<b>*3</b> 109 (81,3%)
<i>MDR1 3435</i>				
<b>C/C</b> 21 (31,3%)	<b>C/T</b> 32 (47,8%)	<b>T/T</b> 14 (20,9%)	<b>C</b> 74 (55,2%)	<b>T</b> 60 (44,8%)
<i>MDR1 2677</i>				
<b>G/G</b> 13 (19,4%)	<b>G/mut</b> 47 (70,1%)	<b>mut/mut</b> 7 (10,5%)	<b>G</b> 73 (54,5%)	<b>mut</b> 61 (45,5%)

**\*1A:** Alelo silvestre, **\*1B:** alelo mutado. **\*1A/\*1A:** homocigoto silvestre, **\*1A/\*1B:** heterocigoto, **\*1B/\*1B:** homocigoto mutado. **\*1:** alelo silvestre, **\*3:** alelo mutado. **\*1/\*1:** homocigoto silvestre, **\*1/\*3:** heterocigoto, **\*3/\*3:** homocigoto mutado. **C:** Alelo silvestre, **T:** alelo mutado. **C/C:** homocigoto silvestre, **C/T:** heterocigoto, **T/T:** homocigoto mutado. **G:** Alelo silvestre, **mut:** alelo mutado. **C/C:** homocigoto silvestre, **C/mut:** heterocigoto, **mut/mut:** homocigoto mutado.

### 6. 3. Relación entre genotipos, efectos adversos y sospecha de rechazo.

Como se señaló anteriormente, el 44,8% de los pacientes presentaron efectos adversos, por lo tanto se analizó si estos pacientes poseen una característica genotípica que los predisponga a estas reacciones.

Como se observa en la **Tabla 8**, no se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de efectos adversos y los genotipos analizados.

**TABLA 8.** Asociaciones entre genotipo y reacciones adversas.

<b>Genotipo</b>	<i>Sin reacción adversa</i>	<i>Con reacción adversa</i>	<i>Odd Ratio</i>	<i>[95% IC]</i>	<i>P-value (Test Chi<sup>2</sup>)</i>
<b>CYP3A4</b>					
*1A/*1A	32 (55,2%)	26 (44,8%)	Ref	Ref	Ref
*1A/*1B	4 (44,4%)	5 (55,6%)	1,54	0,30 – 8,54	0,5481
<b>CYP3A5</b>					
*1/*1 + *1/*3	11 (50%)	11 (50%)	Ref	Ref	Ref
*3/*3	25 (55,6%)	20 (64,5%)	0,8	0,25 – 2,51	0,6684
<b>MDR1 3435</b>					
C/C	9 (42,9%)	12 (57,1%)	Ref	Ref	Ref
C/T	19 (59,4%)	13 (40,6%)	1,95	0,54 – 1,80	0,2387
T/T	8 (57,1%)	6 (42,9%)	0,56	0,11 – 2,69	0,4074
C/T vs T/T			1,10	0,25 – 4,64	0,8875
<b>MDR1 2677</b>					
G/G	6 (48,2%)	7 (53,9%)	Ref	Ref	Ref
G/mut	26 (55,3%)	21 (44,7%)	1,44	0,35 – 6,05	0,5577
mut/mut	4 (57,14%)	3 (42,86%)	1,56	0,17 – 15,02	0,6392
G/mut vs mut/mut			1,08	0,162 – 8,17	0,9278
<b>MDR1 AGRUPADOS</b>					
<b>MDR1 3435</b>					
C/C	9 (42,9%)	12 (57,1%)	Ref	Ref	Ref
C/T + T/T	27 (55,1%)	19 (44,9%)	0,53	0,16 – 1,69	0,2278
<b>MDR1 2677</b>					
C/C + C/T	28 (52,8%)	25 (47,1%)	Ref	Ref	Ref
T/T	8 (57,1%)	6 (42,9%)	0,84	0,21 – 3,21	0,7735
<b>MDR1 2677</b>					
G/G	6 (46,2%)	7 (53,8%)	Ref	Ref	Ref
G/mut + mut/mut	30 (55,6%)	24 (44,4%)	0,69	0,17 – 2,76	0,5416
G/G + G/mut	32 (53,3%)	28 (46,7%)	Ref	Ref	Ref
mut/mut	4 (57,14%)	3 (42,86%)	0,85	0,12 – 5,56	0,8483

Adicionalmente, se realizó una evaluación de los episodios de rechazo y su potencial asociación a los genotipos de las variantes polimórficas estudiadas con objeto de evaluar de manera indirecta la eficiencia del tratamiento inmunosupresor. Se catalogaron como pacientes con rechazo agudo a quienes se les administraron inmunosupresores adicionales en altas dosis, en un periodo corto de tiempo y/o fueron diagnosticados como tal en la ficha clínica. De los pacientes analizados, 14 (20,9%) fueron catalogados con rechazo agudo.

Los resultados obtenidos no mostraron relaciones estadísticamente significativas para *CYP3A4* y *CYP3A5*. Sin embargo, se observa que los pacientes con el genotipo heterocigoto para *MDR1 3435* y *MDR1 2677* (C/T y G/mut, respectivamente) presentan menos riesgo de episodios de rechazo cuando son comparados contra homocigoto mutado (OR: 7,25; $p=0,0084$  para *MDR1 3435* y OR: 9,11; $p=0,0048$  para *MDR1 2677*; **Tabla 9**). De forma similar, cuando *MDR1* se agrupa entre heterocigoto y homocigoto silvestre, la tendencia se mantiene al compararse a homocigoto mutado y se observa que los datos agrupados poseen un riesgo de cuatro veces menor y seis veces menor de presentar rechazo al compararse *MDR1 3435* y *MDR1 2677* al homocigoto mutado, respectivamente.

**TABLA 9.** Asociaciones entre genotipo y episodios de rechazo.

<i>Genotipo</i>	<i>Sin Rechazo</i>	<i>Con Rechazo</i>	<i>Odd Ratio</i>	<i>[95% IC]</i>	<i>P-value (Test Chi<sup>2</sup>)</i>
<b>CYP3A4</b>					
<i>*1A/*1A</i>	46 (79,3%)	12 (20,7%)	Ref	Ref	Ref
<i>*1A/*1B</i>	7 (77,8%)	2 (22,2%)	1,10	0,10 – 6,84	0,9162
<b>CYP3A5</b>					
<i>*1/*1 + *1/*3</i>	17 (77,7%)	5 (22,7%)	Ref	Ref	Ref
<i>*3/*3</i>	36 (80%)	9 (20%)	0,85	0,21 – 3,75	0,7965
<b>MDR1 3435</b>					
<i>C/C</i>	16 (76,2%)	5 (23,8%)	Ref	Ref	Ref
<i>C/T</i>	29 (90,6%)	3 (9,4%)	0,33	0,04 – 2,00	0,1511
<i>T/T</i>	8 (57,1%)	6 (42,9%)	2,40	0,44 – 13,22	0,2344
<i>C/T vs T/T</i>			7,25	1,16 – 52,27	0,0084
<b>MDR1 2677</b>					
<i>G/G</i>	9 (69,2%)	4 (30,8%)	Ref	Ref	Ref
<i>G/mut</i>	41 (87,2%)	6 (12,8%)	0,39	0,06 – 1,96	0,1232
<i>mut/mut</i>	3 (48,9%)	4 (57,1%)	2,00	0,19 – 21,63	0,4858
<i>G/mut vs mut/mut</i>			9,11	1,15 – 74,14	0,0048
<b>MDR1 AGRUPADOS</b>					
<b>MDR1 3435</b>					
<i>C/C</i>	16 (76,2%)	5 (23,8%)	Ref	Ref	Ref
<i>C/T + T/T</i>	37 (80,4%)	9 (19,6%)	0,78	0,20 – 3,45	0,6918
<b>MDR1 2677</b>					
<i>C/C + C/T</i>	45 (84,9%)	8 (15,1%)	Ref	Ref	Ref
<i>T/T</i>	8 (57,1%)	6 (42,9%)	4,22	0,92 – 18,37	0,0231
<b>MDR1 2677</b>					
<i>G/G</i>	9 (69,2%)	4 (30,8%)	Ref	Ref	Ref
<i>G/mut + mut/mut</i>	44 (81,5%)	10 (18,5%)	0,51	0,11 – 2,76	0,3294
<i>G/G + mut/G</i>	50 (83,3%)	10 (16,7%)	Ref	Ref	Ref
<i>mut/mut</i>	3 (42,9%)	4 (57,1%)	6,67	0,93 – 50,79	0,0127

#### 6. 4. Influencia genotipos en ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada.

Los pacientes que presentaron polimorfismos iguales se agruparon para luego ser comparados mediante las ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada y dosis diaria correspondientes durante el primer año post-trasplante. (**Figura 11**)

Adicionalmente, se determinaron los promedios de todos los datos de ciclosporina C<sub>2</sub> existentes en cada paciente durante el año, se ajustaron y se compararon entre quienes poseían distintos polimorfismos. Como se observa en la

**Tabla 10**, no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada y los polimorfismos genéticos.

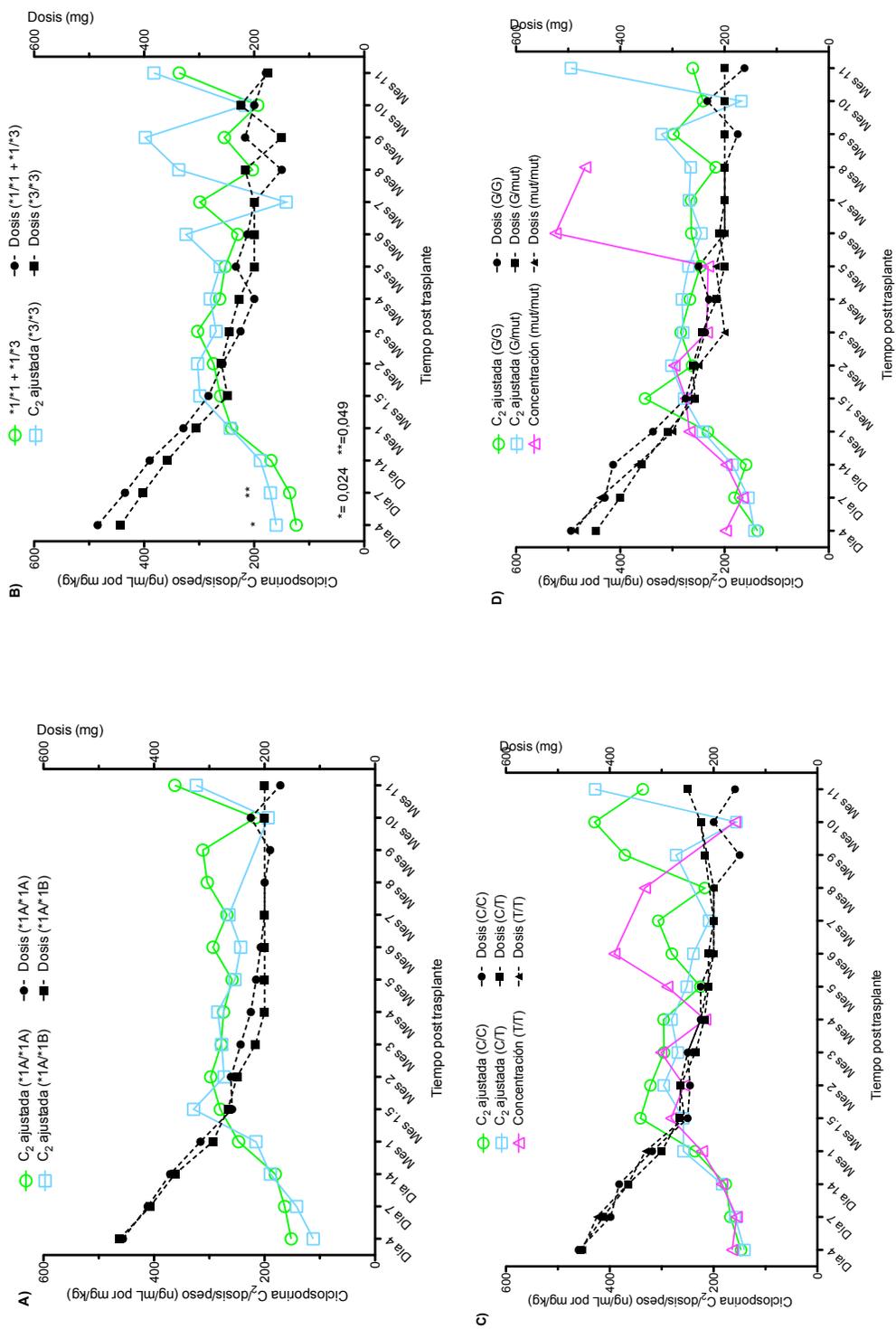
**TABLA 10.** Estudio de asociación entre genotipos y promedio de concentraciones C<sub>2</sub> ajustadas de ciclosporina.

<i>Genotipo</i>	<i>N</i>	<i>Promedio (ng/mL por mg/kg)</i>	<i>P-value</i>
<b>CYP3A4</b>			
*1A/*1A	58	220,72±47,94	Ref
*1A/*1B	9	220,01±48,33	0,968
<b>CYP3A5</b>			
*1/*1 + *1/*3	22	211,54±49,25	Ref
*3/*3	45	225,16±46,69	0,146
<b>MDR1 3435</b>			
C/C	21	217,28±44,16	Ref
C/T	32	225,16±47,89	0,551
T/T	14	215,57±54,31	0,919
<b>MDR1 2677</b>			
G/G	13	214,52±56,63	Ref
G/mut	47	219,99±45,59	0,725
mut/mut	7	235,28±49,19	0,431

Se graficaron los datos correspondientes a ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada y las dosis recibidas para los días en que hubo medición de niveles. En la **Figura 11**, es posible observar que los pacientes inician el periodo de inducción con altas dosis de ciclosporina. En este periodo se aprecia que a pesar que la dosis diaria es alta las concentraciones de ciclosporina ajustada son bajas respecto al resto del periodo. Cuando las dosis diaria de ciclosporina comienzan a disminuir, en el periodo de mantenimiento, las concentraciones de ciclosporina comienzan a aumentar y parecen mantenerse a pesar de la disminución periódica de la dosis.

Específicamente, para *CYP3A4*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las concentraciones C<sub>2</sub> ajustadas y dosis diaria. (**Figuras 11A**). En cambio, para *CYP3A5* se obtuvieron diferencias significativas entre los genotipos heterocigoto y homocigoto mutado (\*1/\*1 + \*1/\*3) y homocigoto

mutado (\*3/\*3) a los días 4 ( $p=0,024$ ) y 7 ( $p =0,049$ ) post-trasplante. Sin embargo, para el resto del periodo y en promedio no se observaron diferencias significativas. **(Figura 11B)**. En las dosis diarias no se presentaron valores significativos, sin embargo se observa que los pacientes homocigoto mutados, recibieron menos dosis de ciclosporina comparado a quienes poseen el alelo silvestre ( $p =0,055$ ) **(ANEXO 3)**. Para el gen *MDR1*, al comparar los pacientes entre cada polimorfismo, no se encontraron diferencias significativas en concentraciones  $C_2$  ajustadas y dosis diarias administrada. **(Figuras 11C y D)**.



**FIGURA 11.** Comparación de los genotipos analizados a través de concentración C<sub>2</sub> de ciclosporina ajustada y dosis diaria en un año post-trasplante. **A)** CYP3A4 **B)** CYP3A5, **C)** MDR1 3435 **D)** MDR1 2677

## 6. 5. Genotipos asociados y su influencia en ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada.

Con el fin de analizar los efectos combinados de los genotipos CYP3A se agruparon los pacientes de la siguiente manera:

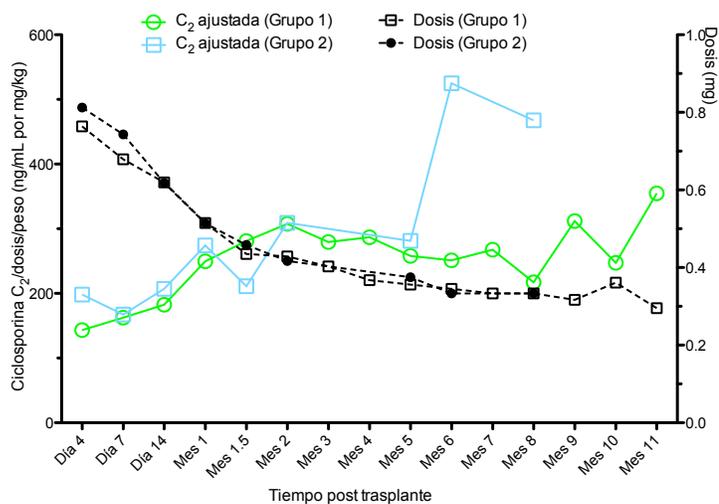
Grupo 1 de baja actividad enzimática: alelos sin actividad de CYP3A5 (\*3/\*3) y alelos sin actividad de CYP3A4 (\*1A/\*1A).

Grupo 2 de moderada actividad enzimática: al menos un alelo con actividad de CYP3A5 (\*1/\*1 o \*1/\*3) y al menos un alelo con actividad de CYP3A4 (\*1A/\*1B).

Según las condiciones descritas, el Grupo 1 quedó conformado por 42 pacientes y el Grupo 2 por 6 pacientes (**Tabla 11**), al compararse ambos, se encontraron diferencias significativas en las concentraciones C<sub>2</sub> ajustadas sólo en el día 4 ( $p=0,048$ ) (**ANEXO 4**). Respecto a las dosis diarias administradas, no hubo diferencias significativas. (**Figura 12**)

**TABLA 11.** Promedio total de concentraciones C<sub>2</sub> ajustadas y dosis en genotipos asociados para CYP3A.

Grupo 1			Grupo 2			P-value
<b>Concentración C2 ajustada (ng/mL por mg/kg)</b>						
<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	0,233
42	196,838	44,79	6	166,493	51,28	
<b>Dosis diaria (mg)</b>						
<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	0,659
42	313,3321	52,29	6	323,314	44,08	



**FIGURA 12.** Comportamiento de concentración C<sub>2</sub> ajustada y dosis en genotipos CYP3A asociados en un año.

Similarmente, se analizaron los genotipos combinados respecto a *MDR1*, los grupos formados se distribuyeron de tal manera:

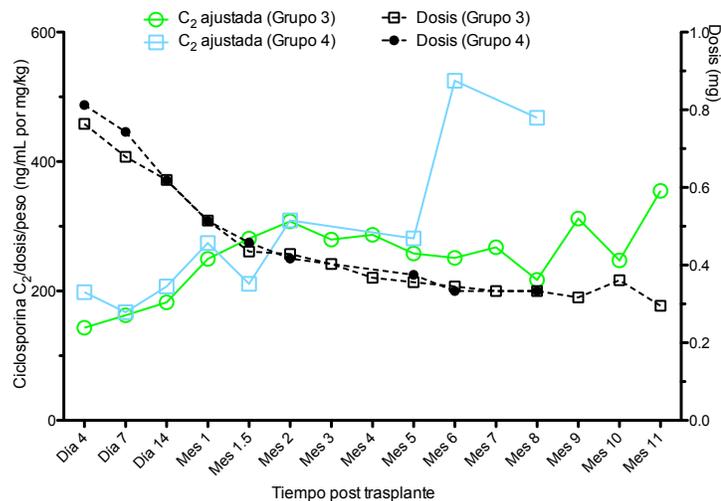
Grupo 3 transportador de alta actividad: al menos un alelo que posea alta actividad para *MDR1* 3435 (*C/C* y *C/T*) y al menos un alelo que posea alta actividad para *MDR1* 2677 (*G/G* y *G/mut*)

Grupo 4 transportador de baja actividad: genotipo de baja actividad para *MDR1* 3435 (*T/T*) y genotipo de baja actividad para *MDR1* 2677 (*mut/mut*).

El grupo 3, quedó conformado por 51 pacientes y el grupo 2 por 6 pacientes (**Tabla 12**). En este caso, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones C<sub>2</sub> ajustadas como tampoco en las dosis diarias administradas (**ANEXO 4**).

**TABLA 12.** Promedio total de concentraciones C<sub>2</sub> ajustada y dosis en genotipos asociados para *MDR1*

Grupo 3			Grupo 4			P-value
<b>Concentración C<sub>2</sub> ajustada (ng/mL por mg/kg)</b>						
N	Promedio	SD	N	Promedio	SD	0,075
52	217,57	48,59	6	263,46	28,79	
<b>Dosis diaria (mg)</b>						
N	Promedio	SD	N	Promedio	SD	1
52	320,73	61,93	6	320,59	36,93	



**FIGURA 13.** Comportamiento de concentración C<sub>2</sub> ajustada y dosis en genotipos *MDR1* asociados en un año.

## 6. 6. Correlación entre creatinina y ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada.

La creatinina en sangre es un parámetro fundamental en los pacientes trasplantados renales, sobretodo porque sus valores han sido utilizados clínicamente para determinar la presencia de toxicidad a ciclosporina o rechazo del injerto. Es por esto, que se evaluaron los valores de creatinina y niveles de ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada con el fin de determinar si existe una relación entre ambas.

Se realizó un test de correlación entre las concentraciones de ciclosporina C<sub>2</sub> ajustada con los niveles de creatinina para cada medición, en el cual no se encontró correlación. (Tabla 13)

**TABLA 13.** Correlación creatinina y concentraciones C<sub>2</sub> totales.

Tiempo post-trasplante	Concentraciones C <sub>2</sub> (ng/mL por mg/kg)				Creatinina (mg/dL)				Spearman r	p-value
	N	Prom	SD	CV	N	Prom	SD	CV		
Día 4	40	141,5743	53,1	0,38	38	4,529	3,22	0,71	0,2016	0,2249
Día 7	53	162,3217	57,4	0,35	49	3,897	3,08	0,79	0,1380	0,3444
Día 14	52	181,4583	72,6	0,40	47	2,272	1,83	0,81	0,1314	0,3786
Mes 1	60	244,4347	79,9	0,33	55	1,568	1,1	0,7	0,1799	0,1887
Mes 1,5	28	285,4367	97,2	0,34	26	1,572	0,83	0,53	-0,0243	0,9062
Mes 2	39	290,4446	107,1	0,37	37	1,516	0,6	0,39	0,2406	0,1515
Mes 3	25	279,3132	69,8	0,25	23	1,578	0,67	0,43	0,1686	0,4419
Mes 4	13	276,0097	108,7	0,39	12	1,802	0,48	0,26	0,1611	0,6169
Mes 5	16	258,0156	77,7	0,30	14	1,592	0,7	0,44	0,0066	0,9822
Mes 6	8	288,0009	130,8	0,45	7	2,527	2,69	1,06	0,1429	0,7599
Mes 7	5	267,5950	82,1	0,31	5	1,72	0,59	0,35	0,0000	ns
Mes 8	4	303,7768	122,4	0,40	4	1,89	0,48	0,25	-0,6000	0,4167
Mes 9	4	279,6605	86,0	0,31	4	1,51	0,33	0,22	0,0000	10833
Mes 10	5	216,2304	121,4	0,56	5	1,466	0,38	0,26	-0,8000	ns
Mes 11	7	357,0341	125,2	0,35	6	2,397	1,16	0,48	-0,2571	0,6583
Prom	67	220,6197	47,6	0,22	63	2,465	1,58	0,64	0,06595	0,6105

N: Cantidad de pacientes; Prom: Promedio; SD: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación

## 6. 7. Influencia de los genotipos estudiados en niveles de creatinina

Se evaluó a su vez, la influencia de los genotipos y las concentraciones de creatinina y además la correlación entre cada polimorfismo con los niveles de creatinina. (**Figura 14, Tabla 14**)

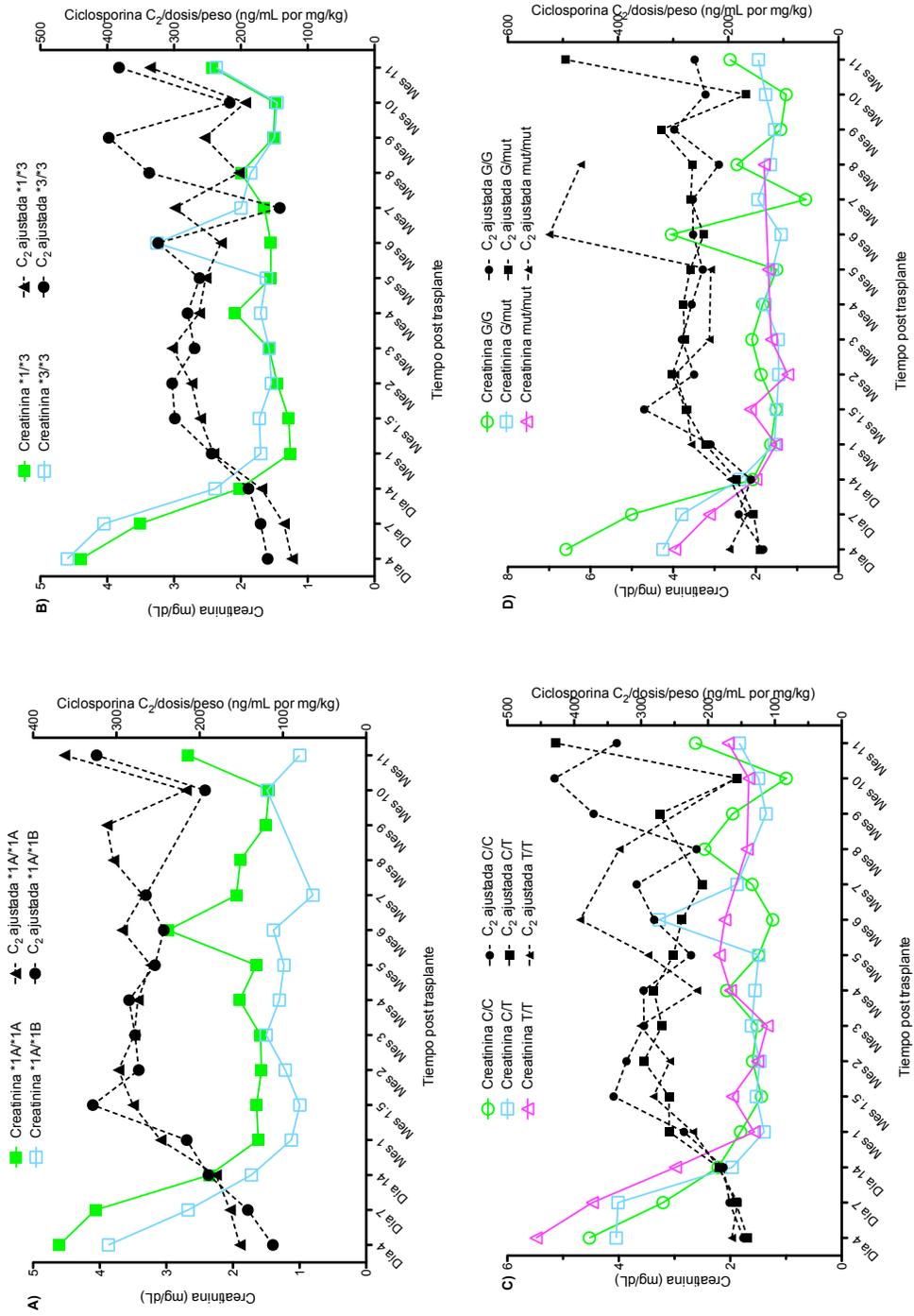
Para *CYP3A4*, en la **Figura 14A** se observa una diferencia entre las concentraciones de creatinina hasta el segundo mes post-trasplante; sin embargo, estas no alcanzan a ser estadísticamente significativas. Tampoco se obtuvo correlación entre las concentraciones de ciclosporina y la creatinina con respecto al polimorfismo del gen *CYP3A4* (**Tabla 14**).

Para *CYP3A5*, se observa una diferencia entre las concentraciones de creatinina, la que no alcanzó a ser estadísticamente significativa (**Figura 14B**). Por lo tanto, no se apreció correlación entre los genotipos de *CYP3A5* y creatinina (**Tabla 14**).

Para las variantes de glicoproteína-P, *MDR1 3435* (Figura 14C) y *MDR1 2677* (Figura 14D), no se observaron diferencias significativas entre los distintos polimorfismos. Tampoco existe correlación con creatinina (Tabla 14).

**TABLA 14.** Correlación entre creatinina y ciclosporina C<sub>2</sub>, separada por genotipo.

<i>Genotipo</i>	<i>Spearman r</i>	<i>P value</i>
<i>CYP3A4*1A/*1A</i>	0,07727	0,5750
<i>CYP3A4*1A/*1B</i>	-0,1429	0,7825
<i>CYP3A5*1/*1 + *1/*3</i>	-0,09298	0,7050
<i>CYP3A5*3/*3</i>	0,09891	0,5280
<i>MDR1 3435 C/C</i>	0,08947	0,7157
<i>MDR1 3435 C/T</i>	0,1680	0,3750
<i>MDR1 3435 T/T</i>	-0,2747	0,3637
<i>MDR1 2677 G/G</i>	0,09790	0,7664
<i>MDR1 2677 G/mut</i>	0,08366	0,5938
<i>MDR1 2677 mut/mut</i>	0,1429	0,7825



**FIGURA 14.** Niveles de creatinina y concentraciones C<sub>2</sub> a través del tiempo para cada genotipo A) CYP3A4 B) CYP3A5, C) MDR1 3435 D) MDR1 2677

## 7. DISCUSIÓN

Ciclosporina ha sido el fármaco inmunosupresor por excelencia a nivel mundial, ya que luego de su introducción en el mercado en 1983, se observó un aumento en la tasa de trasplantes de órganos debido a la disminución de rechazos y aumento de la supervivencia de los pacientes.<sup>48</sup> Sin embargo, debido a su alta variabilidad farmacocinética (inter- e intra-individual) y su estrecho margen terapéutico, la aplicación clínica requiere una constante monitorización de sus concentraciones para asegurar la obtención de una inmunosupresión adecuada evitando nefrotoxicidad y otros efectos adversos.

Diferentes investigaciones han sugerido que la concentración de ciclosporina a las 2 horas ( $C_2$ ), es el punto que mejor revela su concentración máxima alcanzada en los pacientes<sup>15</sup>, es por esto que éste es un parámetro fundamental en el análisis clínico que realizan los nefrólogos para evaluar la inmunosupresión y la toxicidad. Otro parámetro en constante monitorización se refiere a los niveles de creatinina en suero, ya que entrega información sobre una posible nefrotoxicidad o rechazo del injerto, sin embargo, es difícil distinguir entre ambas en un trasplantado renal ya que además pueden coexistir<sup>49</sup>.

El descubrimiento de polimorfismos genéticos que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores ha contribuido significativamente al entendimiento de la variabilidad inter-individual en la relación dosis-concentración y en la respuesta terapéutica de la droga. El conocimiento de SNPs, que pueden alterar la capacidad funcional de enzimas metabólicas y transportadoras, puede ser útil en el diseño de dosificaciones que sean seguras y efectivas<sup>50</sup>.

En base a esto se ha propuesto en este estudio que la variabilidad farmacocinética de ciclosporina puede ser explicada en parte, por factores genéticos, incluyendo polimorfismos en genes que codifican sistemas involucrados en la metabolización y absorción de esta droga.

Como es sabido, ciclosporina se metaboliza principalmente a través del sistema citocromo P-450, específicamente mediante las isoformas *CYP3A4* y *CYP3A5*<sup>51</sup>. Por lo tanto, se analizó el polimorfismo genético *CYP3A4\*1B*, el cual se ha asociado, con controversia, a un aumento de la actividad enzimática *in vivo*<sup>52</sup>, y además el polimorfismo *CYP3A5\*3*, el cual produce una enzima no funcional<sup>28</sup>.

Además, ciclosporina es sustrato del transportador glicoproteína-P (P-gp), una bomba de eflujo que expulsa sustancias endógenas y exógenas de las células. En particular, en este estudio se analizaron dos polimorfismos respecto a este transportador, los SNPs del exón 21 (2677G>T/A) y exón 26 (3435C>T), los cuales son de interés porque poseen efectos farmacológicos significativos y son asociados con la alteración de la expresión P-gp y su función, ya que se ha demostrado *in vivo* que el genotipo homocigoto mutado para ambos SNPs produce una menor expresión de P-gp<sup>53,54</sup>.

Las frecuencias de las variantes de *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3* y *MDR1 (3435 C>T, 2677 G>T/A)* encontradas en este trabajo de tesis fueron generalmente consistentes a lo previamente reportado<sup>27</sup>. Sin embargo, para el polimorfismo *CYP3A5\*3* se encontró una mayor frecuencia del alelo silvestre a lo reportado por Roco *et al.*, (2012). Para los genotipos de *MDR1* se encontró una mayor frecuencia del alelo mutado para *MDR1 3435 C>T* y una menor frecuencia para los alelos mutados en *MDR1 2677 G>T/A* de acuerdo a lo reportado por Wielandt *et al.*, (2004)<sup>55</sup>.

Se registraron las reacciones adversas presentes en el 44,8% de los pacientes, en los cuales la presencia de infección del tracto urinario (ITU) fue la más frecuente a pesar de estar recibiendo fármacos antibacterianos como profilaxis. La frecuencia en este grupo para ITU fue de 32%, seguido por edemas con un 14%, fiebre 12% y aumento de triglicéridos con un 9%. Todas asociadas al tratamiento con ciclosporina. En base a la manifestación o no de reacciones adversas, se estudió la asociación de estas con los distintos genotipos; sin embargo los resultados no mostraron asociaciones entre los genotipos estudiados y el riesgo de presentar reacciones adversas a ciclosporina.

Similarmente, se analizaron los pacientes que registraron episodios de rechazo del nuevo órgano, los cuales fueron identificados por la administración de inmunosupresores adicionales a la terapia, en altas dosis y en un corto periodo de tiempo, además de la observación de las sospechas descrita por el médico. Se encontró que el 20,9% de los pacientes tuvo episodio de rechazo, por lo cual, se agruparon y se asociaron con su genotipo para ser comparados contra pacientes que no presentaron rechazo. Los resultados encontrados indican que los polimorfismos de *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3* no están asociados al riesgo de rechazo. Sin embargo, en los pacientes que presentaron genotipo heterocigoto para *MDR1* se observó que presentan un menor riesgo de sufrir un episodio de rechazo comparado a pacientes homocigotos mutados para cada polimorfismo (OR: 7,25 y 9,11 para *MDR1 3435* y *2677*, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron cuando los genotipos *MDR1* heterocigotos fueron agrupados con homocigoto silvestre y comparados con los homocigotos mutados correspondiente a cada polimorfismo. Los datos agrupados muestran un OR de 4,22 ( $p=0,0231$ ) para *MDR1 3435* y un OR = 6,67 ( $p=0,0127$ ) para *MDR1 2677*, indicando que la presencia del alelo mutado confiere riesgo de sufrir episodios de rechazo. También se realizó un análisis agrupando el genotipo heterocigoto con homocigoto mutado; sin embargo, no se encontraron resultados estadísticamente significativos, por lo que se puede concluir que el genotipo heterocigoto se comporta como un homocigoto silvestre potenciado, señalando que el efecto del alelo silvestre es dominante sobre el alelo mutado. Este hallazgo puede significar que la presencia del alelo silvestre para *MDR1* en los pacientes corresponde a un factor de protección de rechazo. Grinyó *et al.*, (2008)<sup>56</sup> en un estudio realizado a 238 pacientes trasplantados encontró que *MDR1 2677* esta asociado al rechazo agudo con un riesgo de tres veces mayor en pacientes con polimorfismo mutado ( $p=0,003$ ) y de dos veces mayor cuando se analiza *MDR1* como haplotipo ( $p=0,02$ ). Sin embargo, se debe tener en consideración que los episodios de rechazo también pueden significar nefrotoxicidad lo que se puede comprobar sólo mediante la realización de una biopsia. Lamentablemente en este estudio no todos los pacientes que cumplen las condiciones descritas anteriormente se les realizó este examen; sin embargo, sí se tiene certeza que de los 14 pacientes que se catalogaron con rechazo 4 de ellos están confirmados

con este diagnóstico en su ficha clínica por observación del médico o resultado de examen. Por lo tanto, si se considera que investigaciones anteriores han descrito que los polimorfismo mutados de *MDR1* llevan a una disminución de la función de glicoproteína-P, los resultados obtenidos en este estudio pueden significar que la presencia del alelo silvestre de *MDR1* es un factor de protección hacia la nefrotoxicidad más que al rechazo. En este sentido, los resultados observados coincidirían con el estudio realizado por García *et al.*, (2012)<sup>57</sup> en el cual *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3* no demostraron correlación con los efectos adversos, pero sí se encontró influencia de las variantes de *MDR1* en la nefrotoxicidad, aumentando el riesgo en sus polimorfismos mutados. Por lo tanto, según lo expuesto, se necesita analizar los resultados presentados, con el fin de clarificar si los casos pertenecen a nefrotoxicidad y/o rechazo agudo.

Adicionalmente, se analizó la influencia de los polimorfismos genéticos estudiados sobre las concentraciones  $C_2$  de Ciclosporina ajustada a dosis y peso, debido a que cada paciente recibe una dosis distinta, que además es administrada en base al peso en el inicio de la terapia. También, se consideraron los niveles de esta droga desde el cuarto día posterior al trasplante, para asegurar que se encontrara en estado estacionario y así disminuir posibles factores farmacocinéticos que alteren su concentración.

Los resultados para *CYP3A4* demuestran que no existen diferencias significativas entre los pacientes portadores del alelo *CYP3A4\*1B*, lo cual es similar a lo reportado por Singh, R. *et al.*, (2009)<sup>58</sup>, quienes estudiaron 224 pacientes trasplantados y no encontraron una relación con este genotipo, y que además coincide con los estudios realizados por Ahsan *et al.*, (2001)<sup>15</sup>, en 124 pacientes trasplantados renales.

Por otra parte, para *CYP3A5* se encontró que las concentraciones  $C_2$  ajustadas fueron significativamente menores en pacientes portadores del alelo silvestre *CYP3A5\*1* que en los pacientes no portadores, en el inicio del periodo ( $p=0,024$  y  $p=0,049$  a los 4 y 7 días, respectivamente) luego, se observa que existen diferencias en las concentraciones  $C_2$  ajustadas; sin embargo estas no son significativas. En

cuanto a la dosis diaria, los resultados muestran que los pacientes portadores del alelo silvestre recibieron mayor dosis que aquellos no portadores, aunque no se observó una diferencia significativa ( $p=0,055$ ). Singh. R., *et al.*, (2009) demuestra que existe una relación entre la dosis diaria administrada y las concentraciones  $C_2$  de ciclosporina con el genotipo *CYP3A5* a los 3 meses post-trasplante. En su estudio, los pacientes que expresaron *CYP3A5\*1* recibieron una dosis mayor en el primer mes ( $p=0,131$ ) y al tercer mes ( $p=0,003$ ) y subsecuentemente menor concentración  $C_2$  ajustada. Por lo tanto, es probable que la cantidad de individuos analizados no haya sido suficiente, ya que luego del periodo de inicio ocurren menos controles de concentración de ciclosporina lo que disminuye la cantidad de datos a analizar, por lo que ello constituye una limitante de este estudio.

Respecto a la glicoproteína-P, ciclosporina se ha identificado como un sustrato y/o inhibidor de este transportador en varios estudios *in vitro*<sup>59</sup> e incluso ha sido evaluado su uso como droga coadyuvante en terapias antimicrobiales y quimioterapéuticas, con el objetivo de evaluar el aumento de absorción de éstos fármacos<sup>60,61</sup>. Sin embargo, en el presente estudio no se observó una relación entre las concentraciones  $C_2$  ajustadas y la dosis administradas de ciclosporina con respecto a los polimorfismos analizados *MDR1 3435* y *MDR1 2677*. Este hallazgo coincide con otros estudios realizados en los que tampoco han encontrado relación de estos polimorfismos con la concentración de ciclosporina encontrada en sangre<sup>62,63</sup>, por lo que se ha propuesto que la expresión de esta proteína juega un rol significativo en la eliminación por primer paso de ciclosporina<sup>32</sup> más que en la absorción de ésta, por lo que se puede asumir que éstos SNPs tienen poca influencia en la expresión intestinal<sup>64</sup>. Otra posible explicación es que estos SNPs no estén describiendo adecuadamente el efecto sobre el gen, es decir no son los únicos polimorfismos que pueden influenciar la expresión de *MDR1*, por lo que la contribución de estas variantes puede que sean opacadas por otra que podría determinar mejor la expresión<sup>64</sup> como por ejemplo *MDR1 1236 C>T*, la cual ha sido estudiada dentro de un haplotipo de *MDR1*<sup>66</sup>.

Con el fin de analizar si la respuesta de los genotipos podría ser potenciada al

encontrarse éstos asociados, se usaron combinaciones de genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* y combinaciones de *MDR1* 3435 y 2677 y se evaluó su influencia en la concentración  $C_2$  ajustada. Como resultado, se obtuvo que dichas combinaciones tampoco parecen relacionarse con los niveles sanguíneos de ciclosporina. Como se muestra en los resultados, los análisis combinados no aumentaron la identificación de los grupos, ya que al combinarse, el aporte de *CYP3A5* disminuyó obteniéndose una diferencia significativa solo en el día 4 entre los grupos 1 y 2. Además, se observa que la diferencia de dosis diaria que se obtuvo en *CYP3A5* sin combinar, también se pierde, lo que se puede deber a que los pacientes que componen el grupo 2 son heterocigotos para ambos genotipos, por lo tanto éste es un grupo no bien definido. Para *MDR1*, varios estudios demuestran que en ambos polimorfismos el genotipo heterocigoto se comporta como el genotipo homocigoto silvestre, es decir que posee una mayor actividad en comparación al homocigoto mutado<sup>53</sup>. Es por esto que el grupo 3 lo componen genotipos de alta actividad, es decir homocigoto silvestre y heterocigotos, en cambio el grupo 4 siendo definido como de baja actividad, lo compone el genotipo homocigoto mutado. Sin embargo, según los resultados obtenidos no se apreciaron relaciones estadísticas significativas entre estos dos grupos.

Por otra parte, en el presente trabajo también se estudió la correlación entre las concentraciones  $C_2$  ajustadas y los niveles de creatinina sérica; sin embargo, no se encontró correlación al comparar los niveles de ciclosporina medidos el mismo día en que se obtuvieron los niveles de creatinina, lo que puede significar que los niveles de ciclosporina no son reflejados a través de creatinina inmediatamente, sino que posiblemente se debe a una acumulación de éste fármaco que gradualmente produce daño renal.

Respecto a la influencia de los genotipos en los niveles de creatinina, no se observaron diferencias significativas en ninguno de ellos, tampoco hubo correlación con las concentraciones  $C_2$  ajustadas por cada genotipo. Al respecto, similares resultados obtuvieron Bouamar *et al.*, (2011)<sup>66</sup>, quienes estudiaron si los niveles de creatinuria estaban asociados a los polimorfismos de *CYP3A4*, *CYP3A5* y *MDR1* y se

obtuvo tan sólo correlación con el haplotipo de *MDR1*.

Cabe mencionar que los pacientes trasplantados renales reciben múltiples tratamientos farmacológicos en el periodo post-trasplante, ya sea como profilaxis o para tratar enfermedades ya posicionadas. Estos fármacos pueden afectar la farmacocinética de ciclosporina, ya que pueden interactuar con las mismas vías de metabolización y alterarlas, produciendo un aumento o disminución de la actividad metabólica (inductor o inhibidor). Es por esto que se investigaron los fármacos administrados a los pacientes para luego mediante una consulta bibliográfica determinar si existen interacciones con ciclosporina. En este estudio, se encontraron que las principales interacciones están relacionadas a fluconazol, corticoides (prednisolona y prednisona), y los antagonistas de los canales de calcio (nifedipino y nitrendipino). Sin embargo, se encontró que en algunos estudios hay resultados contradictorios y que por otra parte, no se observaron reacciones adversas específicamente a estos medicamentos en las fichas clínicas revisadas.

En cuanto al método de medición de las concentraciones de ciclosporina, *CEDIA® Cyclosporine Plus*, éste se mantuvo constante durante todo el periodo en que se registraron las concentraciones analizadas en este estudio. Se han realizado investigaciones comparativas entre este método de detección y HPLC, y se ha evaluado la cantidad de reacciones cruzadas que posee este sistema con los principales metabolitos de ciclosporina (AM1, AM9 y AM4n). En un estudio realizado por Butch y Fukuchi (2004)<sup>66</sup>, se utilizaron 592 muestras de distintos pacientes trasplantados y se encontró que las concentraciones obtenidas en HPLC resultaron entre 13,0 a 21,2% menor que las concentraciones obtenidas en *CEDIA®*, lo que indica una sobre estimación de la droga primaria cuando se utiliza este método. Por otra parte, Cattaneo *et al.*, (2005)<sup>67</sup> compararon distintos métodos de detección con HPLC utilizando 132 muestras de pacientes trasplantados renales. Los resultados obtenidos de los métodos analizados, en el cual se incluye *CEDIA®*, demostraron una buena correlación ( $r= 0,85$  a  $0,97$ ) con HPLC, pero *CEDIA®* fue el único método que obtuvo una relación lineal con HPLC para las concentraciones  $C_2$ . Por lo tanto, el método de detección utilizado en este estudio, es adecuado para la medición de ciclosporina en

forma rutinaria, sin embargo en la evaluación clínica se debe tener en consideración las limitantes de este método, tales como, la reacción cruzada que posee. Además, se debe considerar que en este estudio, la toma de muestras no fue supervisada y puede que existan resultados alterados debido a la variación farmacocinética de la ciclosporina en el tiempo<sup>68</sup>, y además en el manejo de las muestras debido a que la estabilidad de la ciclosporina en sangre varía con la temperatura y el tiempo<sup>69</sup>.

Otra limitación de este estudio se relaciona con la variabilidad de la absorción de ciclosporina, la cual se ve afectada por la cantidad y tipo de alimentos consumidos al momento de administrar el medicamento, alterando su absorción con la ingesta de alimentos con alto contenido de grasa. Esto no fue posible cuantificar en los pacientes, por no disponerse de dicha información. Para esto se propone realizar una atención farmacéutica a los pacientes con el fin de obtener información sobre las condiciones en que se administra el fármaco (en ayuno, durante o después de comidas), evaluar la adherencia a la farmacoterapia, y el consumo de otros medicamentos o de hierbas medicinales que no estén indicadas por el médico y de esta forma obtener información para educar al paciente respecto a su terapia explicando los riesgos que puede producir el incumplimiento o mal manejo de ésta. De esta forma se aseguraría una respuesta más homogénea al tratamiento y también la detección de factores que la modifican.

Se debe mencionar que otra de las limitaciones tienen que ver con la cantidad de pacientes analizados, ya que no se pudo obtener una cantidad de genotipos que fueran igualmente comparables entre ellos. Además, las concentraciones analizadas, como se pudo observar, a medida que el tiempo transcurre la cantidad de toma de muestras disminuyen, por lo tanto la significancia estadística de los datos se ve afectada, como en el caso de *CYP3A5\*3*, en que sólo se obtuvieron valores significativos al comienzo del tratamiento.

Según lo expuesto, se propone en un trabajo posterior aumentar el número de pacientes, como así también la cantidad de datos a analizar respecto a las concentraciones de ciclosporina. Además investigar otras variantes polimórficas que

puedan expresar de mejor manera la complicada farmacocinética de esta droga, sobretodo de *CYP3A4* el cual es fundamental en la metabolización de esta droga, ya que su aporte es mayor al de *CYP3A5*<sup>70</sup>. Acerca de los polimorfismos de *MDR1*, se debería investigar el tercer polimorfismo (*MDR1 1236 C>T*) y estudiar la influencia de este gen como haplotipo más que polimorfismos por separado. Además, se propone un estudio basado en el genotipo de los donantes del órgano, ya que éste podría estar condicionando la respuesta a las drogas de inmunosupresión en el receptor, sobretodo porque el riñón expresa en abundante cantidad glicoproteína-P y enzimas del sistema citocromo P-450<sup>71,72</sup>. Por otra parte, también se deberían obtener mayores datos acerca del manejo de la terapia por parte del paciente y evaluarlos periódicamente mediante atención farmacéutica para así asegurar el cumplimiento de la terapia y también la validez de las concentraciones obtenidas.

Cabe destacar que de acuerdo a nuestro conocimiento del área, este es el primer estudio farmacogenético realizado en pacientes trasplantados renales en Chile por lo que la continuidad de esta investigación podría entregar herramientas útiles para abordar la alta variabilidad farmacocinética de esta droga, la cual justifica la necesidad de nuevas estrategias de monitorización y ajuste de dosis que maximicen los resultados en la práctica clínica.

## 8. CONCLUSIONES

- Se logró genotipificar con éxito mediante *PCR-RFLP* 67 pacientes trasplantados renales para las variantes genéticas *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435 C>T* y *MDR1 2677 G>T/A*.
- Los polimorfismos genéticos analizados en este estudio no se encontraron asociados a reacciones adversas a ciclosporina.
- Los polimorfismos *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3* no se encuentran asociados a episodios de rechazo.
- Las variantes genotípica doble mutadas de *MDR1* corresponden a factores de riesgo de episodios de rechazo y/o nefrotoxicidad.
- Se encontró que el polimorfismo *CYP3A5\*3* tiene relación con la farmacocinética de ciclosporina reflejada en la concentración  $C_2$  ajustada, para los días 4 y 7 post-trasplante.
- Los polimorfismos *CYP3A4\*1B*, *MDR1 3435 C>T* y *MDR1 2677 G>T/A* no afectan las concentraciones  $C_2$  ajustada de ciclosporina según los datos obtenidos.
- No se encontró correlación estadísticamente significativa entre los niveles de creatinina y ciclosporina  $C_2$  ajustada. Como tampoco se encontró que los polimorfismos influyeran en este parámetro.

## 9. PROYECCIONES

- Se propone aumentar el número de pacientes en estudio, como también la incursión en otros polimorfismos relacionados a los sistemas involucrados en la metabolización y transporte de ciclosporina e incluir factores no genéticos y/o epigenéticos de modo de establecer patrones que puedan proponerse como algoritmos predictivos de la respuesta a ciclosporina.

## 10. REFERENCIAS

1. Vander, A. J. Luciano, D. Sherman J. Human Physiology, The Mechanisms of Body Function 8va Ed. Boston, McGraw–Hill, p. 506 (2001)
2. National Kidney Foundation [en línea]  
<[http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines\\_ckd/p5\\_lab\\_g4.htm](http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guidelines_ckd/p5_lab_g4.htm)>  
[Consulta: 10 abril 2014]
3. Aljama, P.G. *et al.* Guía clínica de la insuficiencia renal en atención primaria. *Nefrología*. Vol. XXI. Suplemento 5. (2001)
4. Kasiske, B. L. *et al.* KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney International* **77**, 299–311 (2010).
5. Ministerio De Salud. Guía Clínica Insuficiencia Renal Cronica Terminal. 1st Ed. Santiago: Minsal, (2005)
6. Instituto de Salud Pública. Registro Nacional de Trasplante Renal: 2013. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile (2013)
7. Troncoso, P. Manual de Urología esencial, Trasplante Renal [en línea]  
<<http://escuela.med.puc.cl/publ/manualurologia/transplanterenal.html>> [consulta: 31 marzo 2014].
8. Bauer, L. A. Applied Clinical Pharmacokinetics, 2da Ed. New York. McGraw–Hill. P. 649 (2008)
9. Azzi, J. R., Sayegh, M. H. & Mallat, S. G. Calcineurin Inhibitors: 40 Years Later, Can't Live Without ... *The Journal of Immunology* **191**, 5785–5791 (2013).
10. Lexi-Comp Online™ , Pediatric & Neonatal Lexi-Drugs Online™ , Hudson, Ohio: Lexi-Comp, Inc.; (2011)
11. Han, K., Pillai, V. C. & Venkataramanan, R. Population Pharmacokinetics of Cyclosporine in Transplant Recipients. *The AAPS Journal* **15**, 901–912 (2013).
12. Busauschina, A., Schnuelle, P. & van der Woude, F. . Cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation Proceedings* **36**, S229–S233 (2004).
13. USP DI. Vol. 1, Drug Information for the Health Care Professional, 22nd Ed., Greenwood Village, CO: Micromedex Thomson Healthcare, 1107-13 (2002)
14. Ahsan, N. *et al.* Randomized trial of tacrolimus plus mycophenolate mofetil or

- azathioprine versus cyclosporine oral solution (modified) plus mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at 2 years. *Transplantation* **72**, 245–250 (2001).
15. Belitsky, P. & Mahalati, K. Recent advances in therapeutic monitoring of cyclosporine: Absorption profiling. *Transplantation Reviews* **15**, 142–155 (2001).
  16. Food and Drug Administration. Guidance Criteria for Cyclosporine PMAs. (1992).
  17. Yatscoff, R. W. Cyclosporine monitoring: consensus recommendations and guidelines. Canadian Consensus Meeting on Cyclosporine Monitoring. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* **144**, 1119 (1991).
  18. Evans, W. E. & McLeod, H. L. Pharmacogenomics — Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med* **348**, 538–549 (2003).
  19. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
  20. Zanger, U. M. & Schwab, M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* **138**, 103–141 (2013).
  21. Hebert, null. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **27**, 201–214 (1997).
  22. Zhou, S.-F., Liu, J.-P. & Chowbay, B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metabolism Reviews* **41**, 89–295 (2009).
  23. Kronbach, T., Fischer, V. & Meyer, U. A. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**, 630–635 (1988).
  24. Thervet, E., Anglicheau, D., Legendre, C. & Beaune, P. Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit* **30**, 143–150 (2008).
  25. Staatz, C. E., Goodman, L. K. & Tett, S. E. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* **49**, 141–175 (2010).
  26. Lamba, J. K., Lin, Y. S., Schuetz, E. G. & Thummel, K. E. Genetic contribution to

- variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1271–1294 (2002).
27. Roco, A. *et al.* Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the chilean population: comparison with caucasian and asian populations. *Front Genet* **3**, 229 (2012).
  28. Kuehl, P. *et al.* Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat. Genet.* **27**, 383–391 (2001).
  29. Schuetz, E. G. *et al.* Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 206–214 (1992).
  30. Brunton, L. L., Chabner, B. A., Knollmann, B. C., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th Edition. (2011)
  31. Choudhuri, S. & Klaassen, C. D. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* **25**, 231–259 (2006).
  32. Lown, K. S. *et al.* Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **62**, 248–260 (1997).
  33. Sakaeda, T., Nakamura, T. & Okumura, K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* **4**, 397–410 (2003).
  34. Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T. & Kim, R. B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**, 13–33 (2004).
  35. Allabi, A. C., Gala, J.-L. & Horsmans, Y. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoin metabolism in a Black Beninese population. *Pharmacogenet. Genomics* **15**, 779–786 (2005).
  36. Hoffmeyer, S. *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 3473–3478 (2000).
  37. Komar, A. A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics* **8**, 1075–1080 (2007).
  38. Cavalli, S. A., Hirata, M. H. & Hirata, R. D. C. Detection of MbolI Polymorphism at

- the 5' Promoter Region of CYP3A4,. *Clinical Chemistry* **47**, 348–351 (2001).
39. Lee, S.-J. & Goldstein, J. A. Functionally defective or altered CYP3A4 and CYP3A5 single nucleotide polymorphisms and their detection with genotyping tests. *Pharmacogenomics* **6**, 357–371 (2005).
  40. Hamdy, S. I. *et al.* Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-1 in the Egyptian population. *British journal of clinical pharmacology* **55**, 560–569 (2003).
  41. Tanabe, M. *et al.* Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 1137–1143 (2001).
  42. Chobanian, A. V. *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA* **289**, 2560–2572 (2003).
  43. Anuario Farmacológico (Chile). Interacciones de los medicamentos y principios activos. *Santiago, Ediciones y comunicaciones*. p.103-105 (1998)
  44. Seifeldin, R. Drug interactions in transplantation. *Clin Ther* **17**, 1043–1061 (1995).
  45. Sud, K. *et al.* Unpredictable cyclosporin--fluconazole interaction in renal transplant recipients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 1698–1703 (1999).
  46. López-Gil, J. A. Fluconazole-cyclosporine interaction: a dose-dependent effect? *Ann Pharmacother* **27**, 427–430 (1993).
  47. Baciewicz, A. M. & Baciewicz Jr, F. A. Cyclosporine pharmacokinetic drug interactions. *The American journal of surgery* **157**, 264–271 (1989).
  48. Therapeutic Drugs. Vol. 2, 2nd Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 38-67. (1999)
  49. Bennett, W. M. & Norman, D. J. Action and toxicity of cyclosporine. *Annual review of medicine* **37**, 215–224 (1986).
  50. Chowbay, B., Cumaraswamy, S., Cheung, Y. B., Zhou, Q. & Lee, E. J. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics and Genomics* **13**, 89–95 (2003).
  51. Murray, B., Hawes, E., Lee, R.-A., Watson, R. & Roederer, M. W. Genes and beans: pharmacogenomics of renal transplant. *Pharmacogenomics* **14**, 783–798

- (2013).
52. Amirimani, B. *et al.* Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ. Mol. Mutagen.* **42**, 299–305 (2003).
  53. Llaudó, I. *et al.* Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl. Int.* **26**, 177–186 (2013).
  54. Hoffmeyer, S. *et al.* Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 3473–3478 (2000).
  55. Weindlant, A. M., Vollrath R, V. & Chianale B, J. Polimorfismos del gen de resistencia a múltiples drogas (MDR1) en poblaciones chilenas: mapuche, mestiza y maorí. *Revista médica de Chile* **132**, 1061–1068 (2004).
  56. Grinyó, J. *et al.* Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl. Int.* **21**, 879–891 (2008).
  57. García, M. *et al.* ABCB1 polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **69**, 385–393 (2013).
  58. Singh, R., Srivastava, A., Kapoor, R., K. Sharma, R. & D. Mittal, R. Impact of CYP3A5 and CYP3A4 gene polymorphisms on dose requirement of calcineurin inhibitors, cyclosporine and tacrolimus, in renal allograft recipients of North India. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **380**, 169–177 (2009).
  59. Yang, C. *et al.* P-glycoprotein is responsible for the poor intestinal absorption and low toxicity of oral aconitine: In vitro, in situ, in vivo and in silico studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* **273**, 561–568 (2013).
  60. Aviv, A., Chubar, E. & Bennett, M. Successful treatment of pure red cell aplasia secondary to chronic lymphocytic leukemia using cyclosporine A. *Isr. Med. Assoc. J.* **16**, 63–65 (2014).
  61. Amin, M. L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* **7**, 27–34 (2013).
  62. Dickens, D., Owen, A., Alfirevic, A. & Pirmohamed, M. ABCB1 single nucleotide polymorphisms (1236C>T, 2677G>T, and 3435C>T) do not affect transport activity

- of human P-glycoprotein. *Pharmacogenet. Genomics* **23**, 314–323 (2013).
63. Zhang, Y. *et al.* ABCB1 polymorphisms may have a minor effect on ciclosporin blood concentrations in myasthenia gravis patients. *Br J Clin Pharmacol* **66**, 240–246 (2008).
64. Jiang, Z.-P. *et al.* Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 433–444 (2008).
65. Bouamar, R. *et al.* Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical endpoints after renal transplantation. *Ther Drug Monit* **33**, 178–184 (2011).
66. Butch, A. W. & Fukuchi, A. M. Analytical performance of the CEDIA cyclosporine PLUS whole blood immunoassay. *J Anal Toxicol* **28**, 204–210 (2004).
67. Cattaneo, D. *et al.* Comparison of different cyclosporine immunoassays to monitor C0 and C2 blood levels from kidney transplant recipients: not simply overestimation. *Clin. Chim. Acta* **355**, 153–164 (2005).
68. Saint-Marcoux, F. *et al.* Influence of Sampling-Time Error on Cyclosporine Measurements Nominally at 2 Hours after Administration. *Clinical Chemistry* **49**, 813–815 (2003).
69. Atkinson, K., Britton, K. & Biggs, J. Distribution and concentration of cyclosporin in human blood. *J Clin Pathol* **37**, 1167–1171 (1984).
70. Dai, Y. *et al.* In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochemical Pharmacology* **68**, 1889–1902 (2004).
71. Woillard, J.-B. *et al.* Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **88**, 95–100 (2010).
72. Hauser, I. A. *et al.* ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1501–1511 (2005).

## ANEXO 1

**TABLA 15.** Información de partidores, enzimas y puntos de corte para la genotipificación en PCR-RFLP

<i>Polimorfismo</i>	<i>Partidores</i>	<i>Amp</i>	<i>Enz</i>	<i>Fragmentos</i>		
				wt/wt	wt/mut	mut/mut
<i>CYP3A4*1B</i>	F 5'- GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA-3' R 5'- CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG -3'	385 pb	<i>MbolI</i>	175, 169 pb	210, 175, 169 pb	210, 175 pb
<i>CYP3A5*3</i>	F 5'-CTTTAAAGAGCTCTTTTGTCTCTCA-3' R 5'- GAAGCCAGACTTTGATCATTATGTTATG -3'	197 pb	<i>BseMII</i>	197 pb	197, 162 pb	162 pb
<i>MDR1 3435</i> C>T	F 5'-ACTCTTGTTTTTCAGCTGCTTG-3' R 5'- AGAGACTTACATTAGGCAGTGACTC -3'	231 pb	<i>Sau3AI</i>	163, 68 pb	231, 163, 68 pb	231 pb
<i>MDR1 2677</i> G>T/A	F 5'-TACCCATCATTGCAATAGCAG-3' R 5'- TTTAGTTTGACTCACCTTGCTAG -3'	107 pb	<i>NheI</i>	83, 24 pb	107, 83, 24 pb	107 pb

Wt/wt: Homocigoto silvestre; wt/mut: heterocigoto; mut/mut: homocigoto mutado; Amp: amplicón; Enz: enzima

## ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2



### ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 19 JUN 2013

**PROYECTO: POLIMORFISMO GENÉTICO ASOCIADOS A LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA DE CICLOSPORINA EN PACIENTES TRASPLANTADOS**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE: SRTA. STEPHANIA CONTRERAS C.**

**INSTITUCIÓN: PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO QUÍMICO-FARMACÉUTICO, CENTRO DE INVESTIGACIONES FARMACOLÓGICAS Y TOXICOLÓGICAS (IFT), PROGRAMA DE FARMACOLOGÍA MOLECULAR Y CLÍNICA, ICBM, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.**

Con fecha 19 de junio de 2013, el proyecto ha sido analizado a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de la Guía Internacional de Ética para la Investigación Biomédica que involucra sujetos humanos CIOMS 1992, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de la información proporcionada en el texto del proyecto el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada con fecha 13 de junio de 2013. Se adjunta aprobación de los siguientes documentos: Consentimiento Informado.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

*Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl*



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

2/2



19 JUN. 2013

**INTEGRANTES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN  
EN SERES HUMANOS**

<b>NOMBRE</b>	<b>CARGO</b>	<b>RELACIÓN CON LA INSTITUCIÓN</b>
Dr. Manuel Oyarzún	Presidente	Sí
Prof. Gina Raineri	Secretaria Ejecutiva	Sí
Dr. Hugo Amigo	Miembro	Sí
Dr. Leandro Biagini	Miembro	Sí
Dra. Lucia Cifuentes	Miembro	Sí
Sra. Nina Horwitz	Miembro	Sí
Dra. María Eugenia Pinto	Miembro	Sí
Sra. Claudia Marshall	Miembro	No
Dra. Gricel Orellana	Miembro	Sí
Prof. M. Julieta González	Miembro	Sí

Santiago, 19 de junio de 2013.

  
**Prof. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

GRB/mva.  
Proy. N° 028-2013

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

# **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

## **Polimorfismos genéticos asociados a la respuesta farmacológica de Ciclosporina en pacientes trasplantados**

*Luis Quiñones S, Stephanía Contreras, María Soledad Rodríguez, Alejandro Ramírez,  
Gabriel Llull*

**Junio, 2013**

**VERSION 1.0**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado Señor(a/ita)

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación biomédica **“Estudio de asociación entre variantes genéticas del gen MDR1, las enzimas CYP3A4/5 y Polimorfismos (variantes) genéticos asociados a la respuesta farmacoterapéutica a Ciclosporina en pacientes trasplantados”**

### **OBJETIVO**

Este estudio tiene el objetivo de obtener valiosa información que en un futuro permitirá diseñar un perfil genómico (características genéticas) que facilite el tratamiento de los pacientes trasplantados y personalizar su tratamiento a ciclosporina de modo que se obtenga mayor efectividad y menores efectos tóxico

### **PROCEDIMIENTOS**

Su colaboración en este proyecto consiste en la donación voluntaria de una (1) muestra sanguínea o de mucosa oral (hisopado bucal), la que será utilizada para obtener ADN (material genético). La muestra sangre será de aproximadamente 5 cc del antebrazo y por personal calificado, de tal manera de evitar cualquier riesgo.

La muestra de ADN será utilizada para analizar los genes de las enzimas llamadas CYP3A4, CYP3A5 y MDR1, que participan en la respuesta al medicamento ciclosporina. Estas muestras no serán utilizadas para otros estudios.

Además será necesario extraer algunos datos clínicos relevantes desde su ficha clínica, para esto, su identidad será codificada igual que sus muestras sanguíneas. Sólo el equipo investigador tendrá acceso a su ficha clínica.

Los resultados obtenidos en este estudio son absolutamente confidenciales y pueden ser dados a conocer por el laboratorio sólo a usted una vez disponibles. En el caso de publicar los resultados en revistas científicas y presentaciones en congresos científicos, su identidad no será revelada.

Para oficializar su colaboración voluntaria en este tipo de estudio, usted deberá llenar una breve ficha clínica de la investigación que incluye datos de identificación personal y médica a la cual el equipo investigador tendrá acceso.

Estos estudios serán realizados en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF) del Centro IFT, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, a cargo del Dr. Luis Quiñones S.

### **RIESGOS/BENEFICIOS**

La única molestia eventual podría ser la aparición de un pequeño hematoma (moretón) en la zona de toma de muestra, lo cual es infrecuente. Sin perjuicio de lo anterior, si lo desea le tomaremos tan sólo una muestra de la mucosa oral.

No existirá un beneficio directo a su persona, sin embargo, los resultados obtenidos con su muestra podrían permitir a futuro, en pacientes en tratamiento con ciclosporina, utilizar esquemas terapéuticos más personalizados, con menos reacciones adversas y más efectivos.

### **COSTOS**

Este estudio no contempla ningún costo en el que usted tenga que incurrir por su participación.

### **CONFIDENCIALIDAD**

Se le asegura que tanto el investigador principal como los demás integrantes del grupo de investigación garantizarán la privacidad de la información que surja de su examen científico. La muestra será almacenada mediante un código, el cual no revelará información personal y a la cual solo tendrá acceso los investigadores y sólo serán utilizadas para este estudio. Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser dados a conocer a usted, solamente una vez que estos se encuentren disponibles.

Sus muestras serán almacenadas por un periodo de 5 años en el Centro IFT, bajo la responsabilidad del Dr. Luis Quiñones y serán utilizadas exclusivamente para los fines de este estudio.

### **VOLUNTARIEDAD**

Su decisión de participar en el estudio es absolutamente voluntaria, Ud. tiene el derecho de negarse a participar en el estudio o solicitar la destrucción de su muestra de ADN, sin expresar razón ni causa y sin que esto signifique perjuicio alguno para usted.

### **DERECHOS DEL PARTICIPANTE**

Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con el Dr. Luis Quiñones S, investigador científico (F: 6817756, e-mail: [lquinone@med.uchile.cl](mailto:lquinone@med.uchile.cl)), la Dra. María Soledad Rodríguez, Investigador Clínico (F: 25742019 o 25742013, e-mail: [marias.rodriguez@redsalud.gov.cl](mailto:marias.rodriguez@redsalud.gov.cl)) y/o con el comité de ética científica de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Fono: 29786923 o vía email: [mvidela@med.uchile.cl](mailto:mvidela@med.uchile.cl) )

***Nota:*** Este consentimiento informado puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, consulte al médico responsable o a cualquiera de los colaboradores, cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente, antes o durante el estudio.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: ...../...../.....

Yo..... RUT:.....

He sido invitado(a) a participar como voluntario(a) en el proyecto de investigación titulado ““**Estudio de asociación entre variantes genéticas del gen MDR1, las enzimas CYP3A4/5 y Polimorfismos (variantes) genéticos asociados a la respuesta farmacoterapéutica a Ciclosporina en pacientes trasplantados**”, dirigidos por los Drs. Luis Quiñones y María Soledad Rodríguez.

**He leído y comprendido la información entregada para mi consentimiento informado, y se me han explicado todas mis dudas, por lo tanto:**

Indique: SI o NO	Aspectos o ámbitos
	<b>Conozco y entiendo el OBJETIVO del estudio.</b>
	<b>Comprendo y acepto los PROCEDIMIENTOS a los cuales debo someterme.</b>
	<b>Conozco los posibles RIESGOS y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio.</b>
	<b>Acepto los resguardos sobre la CONFIDENCIALIDAD de mis datos personales, resultados médicos, análisis clínicos de laboratorio.</b>
	<b>Estoy totalmente informado sobre la VOLUNTARIEDAD de mi participación en este estudio, y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino.</b>
	<b>He sido instruido sobre mi DERECHO a consultar cualquier duda referente al presente estudio y de retirarme del estudio si yo así lo determino.</b>

Leído y entendido el presente consentimiento, accedo a participar como voluntario en este estudio, firmando el presente documento.

<b>RUT y Firma Voluntario</b>	<b>RUT Y Firma Investigador Responsable o Delegado</b>	<b>RUT y Firma Responsable de la toma del C.I.</b>

*\*Esta investigación fue evaluada y aprobada por el comité de ética en investigación en seres humanos (CEISH), en caso de dudas sobre sus derechos favor consultar al Fono: 29786923 o vía email: mvidela@med.uchile.cl*

### ANEXO 3

**TABLA 16.** Comparación de genotipos de *CYP3A4* en base a Concentración  $C_2$  ajustada y la dosis diaria de ciclosporina

Tiempo Post- Trasplante	<b>CYP3A4</b>							<b>Dosis diaria de Ciclosporina (mg/día)</b>						
	<b>Concentración <math>C_2</math> ajustada (ng/mL por mg/kg)</b>							<b>*1A/*1A</b>			<b>*1A/*1B</b>			
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>P- value</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>P- value</i>
Día 4	34	163,67	46,56	4	112,18	53,52	0,12	34	456,62	69,72	4	462,50	47,87	0,871
Día 7	47	180,64	59,43	7	142,18	52,48	0,37	47	411,70	69,13	7	407,14	34,5	0,865
Día 14	43	247,11	75,18	8	189,54	65,45	0,756	43	370,93	62,66	8	362,50	35,36	0,715
Mes 1	52	280,27	87,52	8	215,74	34,91	0,324	52	316,17	89,66	8	293,75	49,55	0,494
Mes 1,5	25	297,81	96,25	3	328,53	115,05	0,427	25	259,00	47,26	3	266,67	28,87	0,788
Mes 2	32	278,60	114,27	7	273,29	42,26	0,583	32	260,94	50,38	7	250,00	28,87	0,585
Mes 3	23	274,40	91,43	3	277,68	37,52	0,987	23	243,48	40,74	3	216,67	28,87	0,284
Mes 4	11	258,97	111,47	2	284,88	132,21	0,907	11	225,00	48,73	2	200,00	0	0,499
Mes 5	13	293,40	60,87	3	253,90	151,62	0,923	13	215,38	42,74	3	200,00	0	0,554
Mes 6	7	268,33	140,08	2	243,18	21,46	0,644	7	207,14	34,5	2	200,00	0	0,788
Mes 7	4	303,78	94,75	1	264,66		0,975	4	200,00	0	1	200,00	0	
Mes 8	4	311,86	122,45	0				4	200,00	40,82	0			
Mes 9	5	216,76	103,62	0				5	190,00	54,77	0			
Mes 10	4	362,56	143,8	1	193,66		0,895	4	225,00	28,87	1	200,00	0	0,495
Mes 11	4	220,72	163,81	1	323,89		0,846	4	171,50	70,11	1	200,00	0	0,74
Promedio	57	220,72	47,94	9	220,01	48,33	0,968	58	322,33	59,89	9	308,76	41,32	0,515

**TABLA 17.** Comparación de genotipos de CYP3A5 en base a Concentración C<sub>2</sub> ajustada y la dosis diaria de Ciclosporina,

<b>CYP3A5</b>														
<i>Tiempo Post- Trasplante</i>	<i>Concentración C<sub>2</sub> ajustada (ng/mL por mg/kg)</i>							<i>Dosis diaria de Ciclosporina (mg/día)</i>						
	<i>*1/*3</i>			<i>*3/*3</i>			<i>P- value</i>	<i>*1/*3</i>			<i>*3/*3</i>			<i>P- value</i>
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>		<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	
Día 4	13	123,69	52,13	25	160,19	41,72	0,024*	13	484,62	48,45	25	443,00	72,00	0,07*
Día 7	15	135,73	60,35	39	170,56	55,65	0,049*	15	435,00	43,09	39	401,92	70,57	0,097
Día 14	18	169,48	75,73	33	188,88	72,03	0,371	18	390,28	50,83	33	358,33	60,81	0,064
Mes 1	20	241,16	91,80	40	243,82	79,39	0,908	19	328,95	65,23	41	305,88	93,16	0,335
Mes 1,5	10	261,15	118,39	18	298,93	83,92	0,334	9	283,33	35,36	19	248,68	46,00	0,057
Mes 2	13	274,08	40,03	26	303,07	125,29	0,424	13	257,69	40,03	26	259,62	51,03	0,906
Mes 3	7	303,14	44,82	19	269,41	96,86	0,388	6	225,00	27,39	20	245,00	42,61	0,293
Mes 4	3	262,75	154,00	10	279,99	102,09	0,822	3	200,00	0,00	10	227,50	50,62	0,381
Mes 5	7	252,88	53,05	9	262,01	95,71	0,825	6	233,33	40,82	10	200,00	33,33	0,096
Mes 6	4	230,01	24,88	5	324,03	158,60	0,285	4	212,50	25,00	5	200,00	35,36	0,571
Mes 7	4	299,02	48,98	1	141,90		0,064	4	200,00	0,00	1	200,00		
Mes 8	1	203,23		3	337,29	125,50	0,453	1	150,00		3	216,67	28,87	0,184
Mes 9	3	254,45	85,39	2	397,97	60,34	0,137	3	216,67	28,87	2	150,00	70,71	0,219
Mes 10	1	193,66		4	216,76	143,80	0,895	1	200,00		4	225,00	28,87	0,495
Mes 11	3	336,40	86,37	2	382,47	253,44	0,776	3	178,67	84,06	2	175,00	35,36	0,959
Promedio	22	211,54	49,25	44	225,16	46,69	0,146	22	339,77	66,18	45	311,10	51,22	0,055

**TABLA 18.** Comparación genotipos de MDR1 3435 en base a Concentración C<sub>2</sub> ajustada de Ciclosporina

<b>MDR1 3435 - Concentración C<sub>2</sub> ajustada (ng/mL por mg/kg)</b>												
<i>Tiempo Post- Trasplante</i>	<i>C/C</i>			<i>C/T</i>			<i>T/T</i>			<i>P-value</i>		
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>C/C vs C/T</i>	<i>C/C vs T/T</i>	<i>C/T vs T/T</i>
Día 4	12	147,19	49,41	18	140,58	42,33	8	164,50	60,10	0,6982	0,4899	0,2542
Día 7	17	167,80	62,45	25	158,60	61,96	12	155,86	48,64	0,6404	0,5846	0,8940
Día 14	14	176,98	61,97	24	183,74	74,33	13	184,32	86,81	0,7759	0,8014	0,9833
Mes 1	19	236,02	93,21	27	258,26	64,88	14	222,75	98,95	0,3446	0,6964	0,1743
Mes 1,5	8	341,10	99,75	16	258,48	85,13	4	281,93	115,77	0,0456	0,3783	0,6502
Mes 2	11	321,88	147,63	18	296,10	88,68	10	257,23	70,83	0,5599	0,2238	0,2454
Mes 3	8	295,74	85,03	17	269,04	90,73	1	301,31		0,4912		
Mes 4	4	296,48	135,04	7	281,26	108,98	2	216,67	83,85	0,8419	0,4994	0,4711
Mes 5	2	225,43	44,73	10	251,90	73,35	4	289,60	105,82	0,6407	0,4760	0,4557
Mes 6	2	280,62	31,49	5	239,19	114,38	2	391,49	188,81	0,6518	0,4988	0,2283
Mes 7	3	306,83	56,86	2	208,75	94,54	0			0,2307		
Mes 8	1	217,26		0			3	332,62	132,29			
Mes 9	2	371,18	98,24	3	272,31	103,84	0			0,3663		
Mes 10	1	429,52		2	156,24	52,92	2	159,35	24,21			0,9467
Mes 11	4	336,45	158,05	1	428,34		0					
Promedio	21	217,28	44,16	31	225,16	47,89	14	215,57	54,31	0,5507	0,9190	0,5536

**TABLA 19.** Comparación genotipos de MDR1 3435 en base a dosis diaria de Ciclosporina.

<b>MDR1 3435 – Dosis diaria (mg/día)</b>												
<i>Tiempo Post- Trasplante</i>	<i>C/C</i>			<i>C/T</i>			<i>T/T</i>			<i>P-value</i>		
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>C/C vs C/T</i>	<i>C/C vs T/T</i>	<i>C/T vs T/T</i>
Día 4	12	460,42	71,08	18	456,94	67,96	8	453,13	68,71	0,8939	0,8225	0,8962
Día 7	17	398,53	82,19	25	413,00	55,96	12	425,00	59,35	0,5004	0,3495	0,5530
Día 14	14	382,14	60,79	24	364,58	52,09	13	365,38	71,11	0,3521	0,5154	0,9689
Mes 1	19	318,42	76,76	27	300,00	45,99	14	331,50	141,34	0,3148	0,7348	0,2935
Mes 1,5	8	250,00	37,80	16	265,63	43,66	4	256,25	71,81	0,3982	0,8438	0,7386
Mes 2	11	245,45	68,76	18	263,89	33,46	10	265,00	41,16	0,3397	0,4451	0,9387
Mes 3	8	250,00	53,45	17	235,29	34,30	1	250,00		0,4124		
Mes 4	4	225,00	50,00	7	217,86	51,47	2	225,00	35,36	0,8281	1,0000	0,8622
Mes 5	2	225,00	35,36	10	210,00	45,95	4	212,50	25,00	0,6761	0,6328	0,9210
Mes 6	2	200,00	0,00	5	210,00	41,83	2	200,00	0,00	0,7623		0,7623
Mes 7	3	200,00	0,00	2	200,00	0,00	0					
Mes 8	1	200,00		0			3	200,00	50,00			
Mes 9	2	150,00	70,71	3	216,67	28,87	0			0,2191		
Mes 10	1	200,00		2	225,00	35,36	2	225,00	35,36			1,0000
Mes 11	4	159,00	54,07	1	250,00		0					
Promedio	21	321,26	63,15	32	315,11	55,79	14	331,72	55,90	0,7111	0,6189	0,3582

**TABLA 20.** Comparación genotipos de *MDR1* 2677 en base a Concentración C<sub>2</sub> ajustada de Ciclosporina.

<i>Tiempo Post- Trasplante</i>	<b><i>MDR1 2677- Concentración C<sub>2</sub> ajustada (ng/mL por mg/kg)</i></b>											
	<i>G/G</i>			<i>G/mut</i>			<i>mut/mut</i>			<i>P-value</i>		
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>G/G vs G/mut</i>	<i>G/G vs mut/mut</i>	<i>G/mut vs mut/mut</i>
Día 4	5	136,56	81,66	29	142,67	33,99	4	198,12	71,29	0,7706	0,2744	0,0125
Día 7	10	181,19	55,61	37	154,46	63,24	7	165,86	26,31	0,2311	0,5107	0,6438
Día 14	9	158,92	72,38	35	185,04	70,73	7	196,72	90,61	0,3309	0,3683	0,7052
Mes 1	12	232,33	51,95	41	241,84	90,71	7	267,47	83,27	0,7311	0,2696	0,4886
Mes 1,5	3	352,61	84,01	22	277,75	97,58	3	274,61	113,51	0,2200	0,3929	0,9593
Mes 2	8	262,25	138,62	27	302,14	101,91	4	296,76	38,73	0,3772	0,6430	0,9184
Mes 3	4	284,23	86,76	21	279,50	90,02	1	234,41		0,9237		
Mes 4	5	266,64	87,23	8	281,86	125,79	0			0,8181		
Mes 5	3	246,61	48,44	10	269,31	85,55	3	231,79	90,03	0,6751	0,8141	0,5230
Mes 6	3	264,08	156,53	5	244,58	39,07	1	525,00		0,7899		
Mes 7	1	264,66		4	268,33	94,75	0					
Mes 8	1	217,26		2	265,11	87,51	1	467,63				
Mes 9	2	298,26	201,36	3	320,92	29,84	0			0,8478		
Mes 10	3	241,60	165,27	2	167,94	36,36	0			0,5962		
Mes 11	3	261,37	60,43	2	495,01	94,29	0			0,0400		
Promedio	12	214,52	56,63	47	220,00	45,59	7	235,2761	49,19	0,7251	0,4311	0,4162

**TABLA 21.** Comparación genotipos de *MDR1* 2677 en base a dosis diaria de Ciclosporina.

<b><i>MDR1</i> 2677– Dosis diaria (mg/día)</b>												
<i>Tiempo Post- Trasplante</i>	<i>G/G</i>			<i>G/mut</i>			<i>mut/mut</i>			<i>P-value</i>		
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>G/G vs G/mut</i>	<i>G/G vs mut/mut</i>	<i>G/mut vs mut/mut</i>
Día 4	5	495,00	37,08	29	446,55	70,94	4	487,50	47,87	0,1489	0,7980	0,2747
Día 7	10	430,00	62,14	37	400,68	66,53	7	439,29	57,48	0,2168	0,7590	0,1589
Día 14	9	413,89	60,09	35	358,57	54,89	7	367,86	59,01	0,0114	0,1479	0,6884
Mes 1	12	337,50	71,11	41	308,32	94,31	7	300,00	40,82	0,3268	0,2215	0,8206
Mes 1,5	3	275,00	25,00	22	256,82	44,44	3	266,67	76,38	0,4999	0,8662	0,7422
Mes 2	8	256,25	49,55	27	261,11	50,64	4	250,00	0,00	0,8121	0,8105	0,6685
Mes 3	4	237,50	47,87	21	242,86	39,64	1	200,00		0,8120		
Mes 4	5	230,00	44,72	8	215,63	48,07	0			0,6014		
Mes 5	3	250,00	50,00	10	200,00	33,33	3	216,67	28,87	0,0642	0,3739	0,4533
Mes 6	3	200,00	50,00	5	210,00	22,36	1	200,00		0,7024		
Mes 7	1	200,00		4	200,00	0,00	0					
Mes 8	1	200,00		2	200,00	70,71	1	200,00				
Mes 9	2	175,00	106,07	3	200,00	0,00	0			0,6850		
Mes 10	3	233,33	28,87	2	200,00	0,00	0			0,2191		
Mes 11	3	162,00	65,82	2	200,00	70,71	0			0,5810		
Promedio	12	315,62	42,40	48	318,36	61,14	7	343,62	57,54	0,8843	0,2393	0,3086

## ANEXO 4

**TABLA 2.** Comparación de genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* agrupados y Concentración  $C_2$  ajustada de Ciclosporina.

Tiempo Post- Trasplante	<b>Grupo 1</b> (ng/mL por mg/kg)			<b>Grupo 2</b> (ng/mL por mg/kg)			<i>P</i> -value
	<i>N</i>	Promedio	<i>SD</i>	<i>N</i>	Promedio	<i>SD</i>	
Día 4	25	160,19	41,72	4	112,18	53,52	0,0487
Día 7	37	170,79	57,13	5	132,58	60,75	0,1707
Día 14	30	188,78	74,45	5	189,34	78,54	0,9879
Mes 1	38	243,86	80,97	5	200,33	22,96	0,2430
Mes 1,5	18	290,66	80,49	2	292,07	135,98	0,9824
Mes 2	24	307,36	129,64	5	281,97	48,13	0,6730
Mes 3	19	274,80	97,64	2	299,32	2,58	0,7324
Mes 4	9	269,06	101,89	1	191,39		
Mes 5	8	260,57	66,37	1	204,76		
Mes 6	4	340,44	178,16	1	228,00		
Mes 7	1	141,90		1	264,66		
Mes 8	3	337,29	125,50	0			
Mes 9	2	397,97	60,34	0			
Mes 10	4	216,75	143,80	1	193,66		
Mes 11	2	382,47	253,44	1	323,89		
Promedio	42	196,838	44,79	6	166,493	51,28	0,2333

Grupo 1: *CYP3A5*\*3/\*3 + *CYP3A4*\*1A/\*1A; Grupo 2: *CYP3A4*\*1A/\*1B + *CYP3A5*\*1/\*1 o *CYP3A5*\*1/\*3

**TABLA 23.** Comparación de genotipos *MDR1* 3435 y *MDR1* 2677 agrupados y Concentración C<sub>2</sub> ajustada de Ciclosporina.

Tiempo Post- Trasplante	<b>Grupo 3</b> (ng/mL por mg/kg)			<b>Grupo 4</b> (ng/mL por mg/kg)			<i>P</i> -value
	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Promedio</i>	<i>SD</i>	
Día 4	30	143,22	44,58	4	198,12	71,29	0,094
Día 7	41	162,44	62,32	6	167,27	28,53	1
Día 14	37	182,52	69,75	6	207,11	94,58	1
Mes 1	45	249,55	78,46	6	274,12	89,16	1
Mes 1,5	23	281,00	95,55	2	211,18	40,38	0,976
Mes 2	28	307,53	114,50	3	309,11	36,53	1
Mes 3	24	279,38	89,50	0			
Mes 4	11	286,80	112,50	0			
Mes 5	11	257,90	61,06	2	281,21	39,45	0,113
Mes 6	7	251,02	96,42	1	525,00		
Mes 7	5	267,60	82,08	0			
Mes 8	1	217,26		1	467,63		
Mes 9	5	311,86	103,62	0			
Mes 10	3	247,33	162,16	0			
Mes 11	5	354,83	142,91	0			
Promedio	52	221,50	46,47	6	233,43	53,62	1