

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS EN ENZIMAS  
METABOLIZADORAS DEL ÁCIDO MICOFENÓLICO Y SU EFECTO  
INMUNOSUPRESOR EN NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL.***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica  
Toxicológica y Diagnóstico Molecular por:**

***DOMINIQUE DANAE YÁÑEZ OSORIO***

**Directora de Tesis: Mg. Carolina Salas Palma  
Co- Director de Tesis: Dr. Mauricio Farfán Urzúa**

**Santiago-CHILE**

**2020**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster

## DOMINIQUE DANAE YÁÑEZ OSORIO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico, en el examen público rendido el día

---

Directora de Tesis:

Mg. Carolina Salas Palma

---

Co-director de Tesis:

Dr. Mauricio Farfán Urzúa

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Dante Miranda

---

Dr. Luis Quiñones

---

Dra. Daniela Seelenfreund

---

## DEDICATORIA

*A mi hijo Tomás y familia por motivarme y hacer de este logro un motivo de alegría y orgullo.*

*A los pacientes del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna por permitir realizar este trabajo en sus dependencias.

A la Dra. Angela Delucchi y la Unidad de Nefrología quienes fueron fundamentales para poder llevar a cabo este trabajo.

A Carolina Salas por el constante apoyo en la ejecución de este proyecto.

A Natalie Espinoza por apoyar en la ejecución en citometría de flujo. A Alonso de la Rivera y Pía Boza por apoyar en el área de farmacocinética.

A mis colegas del Laboratorio de Biología Molecular Alejandra Vergara y Jocelyn Méndez.

A mi familia, y en especial a mi madre Alejandra y mi marido Ariel por darme el espacio para desarrollar esta tesis.

## **FINANCIAMIENTO**

Sociedad Chilena de Trasplante.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADCIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Trasplante renal y tratamiento inmunosupresor.....	1
1.2. Farmacocinetica y farmacodinamia en el tratamiento con inmunosupresores.....	2
1.3. Ácido micofenólico.....	4
1.4. Farmacocinética del MPA.....	6
1.5. Farmacogenética del MPA y variabilidad.....	10
1.6. Farmacogenómica.....	11
1.7. Farmacodinamia del MPA.....	13
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
2.1. Hipótesis.....	16
2.2. Objetivo General.....	16
2.3. Objetivos Específicos.....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1. Diseño global del estudio.....	17
3.2. Enrolamiento de pacientes.....	18

3.3. Identificación de genotipos.....	21
3.4. Estudio farmacocinético delMPA.....	21
3.5. Evaluación de proliferación linfocitaria mediante citometría de flujo.....	21
3.6. Análisis estadístico.....	22
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1. Distribución según genotipo.....	23
4.2. Farmacocinética del MPA.....	26
4.3. Asociación entre la presencia de los SNPs relacionados con metabolismo de MPA con el ABC <sub>0-12h</sub> del MPA.....	27
4.4. Caracterización de la proliferación de linfocitos T en pacientes antes y después del trasplante renal.....	30
4.5. Asociación entre el ABC <sub>0-12h</sub> con la proliferación linfocitaria.....	31
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
5.1. Frecuencias genotípicas y alélicas de UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T, y MRP2-24T>C en la población pediátrica trasplantada y en espera de TR.....	33
5.2. Asociación de los genotipos UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T, y MRP2-24T>C con el ABC <sub>0-12h</sub> del MPA.....	35
5.3. Caracterización de la proliferación de linfocitos T y marcadores CD25 y CD71 y asociación con el ABC <sub>0-12h</sub> del MPA.....	38
5.4. Limitaciones y proyecciones.....	43
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>46</b>
ANEXO 1.....	51
ANEXO 2.....	52

ANEXO 3.....56  
ANEXO 4.....60  
ANEXO 5.....65

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metabolito y formas farmacéuticas del ácido micofenólico .....	5
Figura 2: Representación esquemática del metabolismo ácido micofenólico .....	7
Figura 3: El MPA inhibe específicamente la síntesis de <i>novo</i> de purinas .....	8
Figura 4: Mecanismo de acción del ácido micofenólico.....	9
Figura 5. Protocolo procedimiento general.....	17
Figura 6. Flujograma de seguimiento y distribución de pacientes para análisis de resultados .....	20
Figura 7. Distribución de frecuencias genóticas en pacientes del HLCM .....	23
Figura 8: Distribución de grupo sanguíneo ABO. ....	25
Figura 9: Distribución del Factor Rh. ....	26
Figura 10: Asociación de Genotipos para UGT1A9 -275T>A con el ABC <sub>0-12h</sub> .....	27
Figura 11: Asociación de Genotipos para UGT1A9 -2152C>T con el ABC <sub>0-12h</sub> .....	28
Figura 12: Asociación de Genotipos para MRP2 -24C>T con el ABC <sub>0-12</sub> .....	29
Figura 13: Variación Proliferación linfocitaria entre pacientes Pre y post trasplante sin corticoides.....	30
Figura 14: Variación de marcadores CD25 y CD71 entre pacientes Pre y post trasplante sin corticoide.....	31
Figura 15: Asociación entre proliferación Linfocitaria con ABC <sub>0-12h</sub> MPA.....	32
Figura 16: Asociación entre marcadores de activación de linfocitos T con ABC <sub>0-12h</sub> MPA.....	32

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Asociación de los diferentes genotipos para las isoformas de UGT y MRP2 a la farmacocinética del MPA.....	12
Tabla 2: Criterios de Inclusión y Exclusión.....	18
Tabla 3: Características de pacientes en estudio.....	19
Tabla 4: Distribución de polimorfismos en pacientes pediátricos analizados.....	24
Tabla 5: Resumen de las determinaciones de $ABC_{0-12h}$ de pacientes trasplantados.....	26

## RESUMEN

Uno de los factores críticos para el éxito del trasplante renal (TR) es lograr una terapia farmacológica inmunosupresora efectiva, que tiene por objeto evitar el rechazo del riñón trasplantado. Dentro de los fármacos utilizados, se encuentra el ácido micofenólico (MPA) que actúa causando la supresión de la proliferación de linfocitos T (PL). Se caracteriza por presentar alta variabilidad intra e interindividual, por este motivo se realiza medición de niveles plasmáticos, los cuales se correlacionan empíricamente con el estado de inmunosupresión del paciente. La alta variabilidad podría explicarse por la presencia de polimorfismos (del tipo SNPs) genéticos presentes en las enzimas metabolizadoras del MPA, alterando con ello los niveles plasmáticos esperados y dificultando el ajuste de dosis de cada paciente.

La terapia inmunosupresora de los pacientes con TR atendidos en el Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna (HLCM) es controlada por monitoreo terapéutico de drogas (TDM). Cabe señalar que no existen exámenes que midan el grado de inmunosupresión del paciente por efecto del MPA y por ende se desconoce si existe una relación entre los niveles plasmáticos y el efecto de este.

Tomando en consideración estos antecedentes, se planteó la Hipótesis “Las variantes polimórficas UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T y/o MRP2 -24 C>T se correlacionan con cambios en la exposición a MPA que no se asocian a la respuesta de la población de células T a la terapia inmunosupresiva en pacientes pediátricos trasplantados renales”.

Se evaluaron 54 pacientes pediátricos en espera o con TR en el HLCM, a los cuales se les determinaron los diferentes SNPs incluidos en estudio, además de la medición de ABC y proliferación linfocitaria. La distribución alélica de los portadores de los SNPs estudiados fue de un 43% para MRP2-24C>T, un 6% para UGT1A9 -2152C>T, y un 15% para el UGT1A9 -275T>A siendo este el único SNPs estudiado que presentó significancia farmacocinética ( $p=0,03$ ) al mostrar una disminución en el  $ABC_{0-12h}$  en comparación de los no portadores. No fue posible determinar una relación entre los SNPs estudiados con el nivel de inmunosupresión (medido a través de ensayo de proliferación de linfocitos T) y los marcadores de activación CD25 y CD71, sin embargo si se observa una diferencia estadísticamente significativa en el efecto inmunosupresor entre pacientes con  $ABC_{0-12h}$  en rango sub y supraterapéuticos.

Con estos resultados se demuestra la importancia del SNP UGT1A9 -275T>A en la cinética del MPA, y que en rangos extremos del  $ABC_{0-12h}$  el estado de inmunosupresión se correlaciona con este.

Estos son resultados preliminares y es necesario ampliar el estudio a un número mayor de pacientes pediátricos con TR. Los resultados obtenidos en este trabajo entregan los primeros antecedentes para realizar terapias inmunosupresoras individualizadas en pacientes pediátricos chilenos con TR, cuya administración farmacológica considere los aspectos genéticos, así como el efecto farmacodinámico.

## ABSTRACT

Influence of polymorphisms on mycophenolic acid metabolizing enzymes and their immunosuppressive effect in children with kidney transplantation.

One of the critical factors for the success of kidney transplantation (TR) is achieving effective immunosuppressive drug therapy, which aims to prevent rejection of the transplanted kidney. Among the drugs used is mycophenolic acid (MPA), that has the effect of decreases antigen-stimulated T- cell proliferation (PL). It is characterized by presenting high intra and inter-individual variability, for this reason plasma levels are measured, which are empirically correlated with the immunosuppression state of the patient. The high variability could be explained by the presence of genetic polymorphisms (SNPs type) present in the metabolizing enzymes of the MPA, thereby altering the expected plasma levels and making it difficult to adjust the dose of each patient.

Immunosuppressive therapy for patients with TR treated at the Dr. Luis Calvo Mackenna Hospital (HLCM) is controlled by therapeutic drug monitoring (TDM). It should be noted that there are no tests that measure the degree of immunosuppression of the patient due to the effect of MPA and therefore it is unknown whether there is a relationship between plasma levels and its effect.

Taking into account these antecedents, the Hypothesis was proposed: “UGT1A9 -275T> A, UGT1A9 -2152C> T and / or MRP2 -24 C> T polymorphism correlate with changes in MPA exposure that are not associated with the response of the T cell population to immunosuppressive therapy in kidney transplant pediatric patients”.

Were evaluated 54 pediatric patients awaiting or with TR in the HLCM, who were determined the different SNPs included in the study, in addition to the measurement of ABC and lymphocyte proliferation. The allelic distribution of the SNPs carriers studied was 43% for MRP2-24C> T, 6% for UGT1A9 -2152C> T, and 15% for UGT1A9 -275T> A, this being the only SNPs studied that presented pharmacokinetic significance ( $p = 0.03$ ) when showing a decrease in  $AUC_{0-12h}$  compared to non-carriers. It was not possible to determine a relationship between the SNPs studied with the level of immunosuppression (measured through the T-cell proliferation assay) and the activation markers CD25 and CD71, however, if a statistically significant difference in the immunosuppressive effect is observed between patients with

$ABC_{0-12h}$  in sub and supra therapeutic range.

These results demonstrate the importance of the SNP UGT1A9 -275T> A in the kinetics of MPA, and that in extreme ranges of  $ABC_{0-12h}$  the immunosuppression state is correlated with it. These are preliminary results and it is necessary to extend the study to a greater number of pediatric patients with TR. The results obtained in this work provide the first antecedents to perform individualized immunosuppressive therapies in Chilean pediatric patients with TR, whose pharmacological administration considers the genetic aspects, as well as the pharmacodynamic effect.

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1. Trasplante renal y tratamiento inmunosupresor**

El Trasplante Renal (TR) ha sido universalmente aceptado como la última alternativa de terapia para pacientes con Insuficiencia Renal Crónica (IRC). En niños se ha visto que minimiza el retardo del crecimiento ocasionado principalmente por trastornos metabólicos, secundarios a la IRC y a la diálisis, logrando mejorar la calidad de vida, función cognitiva, crecimiento óptimo en la edad pediátrica, maduración sexual y reinserción social (Delucchi y cols 2007; Mericqy cols, 2013). La IRC corresponde a la situación clínica derivada de la pérdida de función renal permanente y con carácter progresivo, a la cual se puede llegar por múltiples etiologías, tanto de carácter congénito y/o hereditario como adquiridas. En su etapa terminal requiere tratamiento de sustitución renal por diálisis o finalmente TR. Las causas varían de un país a otro y dependen de factores epidemiológicos, socioeconómicos, genéticos y/o raciales (Pefaur y cols, 2008; Delucchi y cols 2010).

Aun cuando el trasplante de órgano es la última opción como alternativa de vida, destacan que tanto la sobrevida de los pacientes pediátricos trasplantados como la expectativa de vida de todas las edades son mejores que la de los pacientes sometidos a diálisis. El trasplante renal en niños se debe considerar como terapia de elección cuando exista indicación de terapia de reemplazo renal y en caso de ser posible, el trasplante pre diálisis, ya sea con donante vivo o cadáver, se debe ofrecer a todos los candidatos a TR pediátrico. En Chile como en otros países, aproximadamente un 3% del total de los pacientes en lista de espera son niños y de ellos cerca de dos tercios serán trasplantados (Pefaur y cols, 2008).

El panorama en Chile es similar a lo descrito en literatura. Tanto la sobrevida del paciente como la del injerto han mejorado de forma significativa en los últimos años, atribuyéndose en parte a los nuevos esquemas de inmunosupresores utilizados que ayudan a disminuir el rechazo del órgano trasplantado por parte del paciente, estos registros incluyen a pacientes pediátricos (Delucchi y cols, 2006; Pefaur y cols, 2008). La inmunosupresión es fundamental para el éxito del TR y es particularmente importante durante el período de post trasplante inmediato, donde existe una mayor incidencia de rechazo agudo (RA), uno de los factores más importantes en la pérdida del injerto. Por otro lado, durante el período tardío se produce una tolerancia del receptor al injerto que conlleva a una menor incidencia de RA. Por este motivo, resulta de gran

importancia utilizar dosis mayores que la dosis estándar requerida o mayor número de drogas inmunosupresoras durante el primer período post-trasplante.

En Chile tanto el diagnóstico como tratamiento de la IRC se encuentra protocolizada, definiéndose el TR como el tratamiento a elección para estos pacientes. Actualmente, los regímenes inmunosupresores consideran la asociación de varias drogas inmunosupresoras con el objetivo de reducir los efectos adversos, manteniendo o potenciando la eficacia de cada uno (Pefaur y cols, 2008) y promoviendo un desarrollo adecuado para el caso de los pacientes pediátricos (Delucchi y cols, 2007). La guía indica que los inmunosupresores recomendados para la prevención del rechazo en el trasplante renal, deben ser inhibidores de la calcineurina, agentes antiproliferativos y corticosteroides de uso concomitante para el grupo de pacientes de alto riesgo inmunológico menores o iguales a 15 años (Guía Minsal, 2005). Estas combinaciones han ido variando con el tiempo debido al ingreso de nuevas drogas al mercado que presentan más especificidad y menos efectos adversos. Entre estos, los más comúnmente utilizados son tacrolimus (Tac) como inmunosupresor base y ácido micofenólico (MPA) como tratamiento concomitante en reemplazo de aziatropina (Pefaur y cols, 2008). En el paciente pediátrico, con el objetivo de alcanzar una talla final genéticamente determinada, se ha postulado el retiro precoz de esteroides con buenos resultados, siendo el Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna (HLCM) pionero en la aplicación de este protocolo (Delucchi y cols, 2007).

## **1.2. Farmacocinética y farmacodinamia en el tratamiento con inmunosupresores**

Entre los efectos adversos asociados al uso de inmunosupresores se encuentran el mayor riesgo de neoplasias y de infecciones, especialmente oportunistas. Además de los efectos adversos específicos asociados a cada droga se debe sumar características propias del tratamiento inmunosupresor, como es la amplia variación interindividual en la dosis para alcanzar las concentraciones plasmáticas terapéuticas. Una de las herramientas utilizadas en la farmacocinética es la medición del ABC (Área Bajo la Curva, AUC de sus siglas en inglés), la cual refleja la exposición real del paciente al medicamento monitorizado (Fernández, y cols, 2008), sin embargo su realización muchas veces no es aplicable debido al gran número de muestras sanguíneas que se deben extraer, es por esta razón que se realiza la monitorización terapéutica de fármacos (TDM, por sus siglas en inglés) que es la determinación analítica de una

concentración plasmática de un medicamento que tiene la mejor correlación con el ABC, por lo que es una representación del ABC, por lo cual aporta información para dosificar correctamente los medicamentos monitorizados.

Mediante la aplicación de la farmacocinética el TDM se convierte en una herramienta de evaluación de la eficacia y la seguridad de un medicamento. Tradicionalmente, el TDM implica medir las concentraciones de fármaco en diversos fluidos biológicos e interpretar estas concentraciones en términos de parámetros clínicos relevantes. La aplicación del TDM introdujo un nuevo aspecto de la práctica clínica en la década de 1960 con la publicación de estudios farmacocinéticos iniciales vinculando las teorías matemáticas que dicen la relación con modelos de distribución de medicamentos. A partir de ahí, la farmacocinética surgió como una disciplina a finales de los años sesenta y principios de los setenta. Los pioneros de la vigilancia de drogas en la década de 1970 se centraron en las reacciones adversas a los medicamentos y demostraron claramente que al establecer rangos terapéuticos, la incidencia de toxicidad a fármacos se reduce (Kang y cols, 2009).

En el trasplante propiamente tal, el periodo de mayor riesgo de rechazo son los primeros 3 meses, donde una exposición inadecuada al inmunosupresor aumenta el riesgo de RA, especialmente en pacientes tratados con ciclosporina, Tac o MPA. En términos generales un fármaco no debe ser monitorizado antes de transcurridas cinco vidas medias, momento en que alcanza el estado estacionario (Fernández, y cols, 2008), por lo cual durante las primeras 72 horas post TR resulta vital indicar una dosis inicial adecuada, en donde una estrategia complementaria basada en la farmacogenética para predecir la dosis más apropiada podría convertirse en un gran apoyo.

Los niveles plasmáticos de los medicamentos pueden ser afectados por variaciones en la actividad de las enzimas metabolizadoras de estos mismos. Estas variaciones pueden ser ocasionadas por polimorfismos genéticos del tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) identificados en las enzimas metabolizadoras o transportadores de estos fármacos. Tanto para el Tac como el MPA, se han asociado polimorfismos en sus principales enzimas metabolizadoras con una influencia directa en el ABC, que en algunos casos pueden traducirse en bajas concentraciones plasmáticas si aumenta la actividad enzimática de la proteína responsable y con ello no alcanzar el efecto deseado que consiste en una menor inmunosupresión para el paciente;

o bien llegar a altas concentraciones del fármaco, en el caso que la actividad metabolizadora de la enzima disminuya y con ello provocar nefrotoxicidad (Dupuis y cols, 2012; Provenzani y cols, 2013). El hecho de poder identificar estos polimorfismos y conocer el efecto que tienen en la concentración del medicamento, permite dosificar correctamente y alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas adecuadas.

Tal como se comentó anteriormente, el manejo correcto de la terapia inmunosupresora es uno de los pilares más importantes para la mantención del trasplante, esto es mantener las concentraciones plasmáticas dentro del rango adecuado, pero asimismo es de vital importancia poder conocer el efecto final de estos medicamentos a nivel celular, que es donde el medicamento ejerce su acción. En literatura, existe una variada gama de ensayos *in vitro* e *in vivo* que incluyen análisis mediante citometría de flujo, en que se ha observado como el MPA logra inhibir la proliferación de células T (Laliberté y cols, 1998; Millan y cols, 2000). En base a esto, una de las debilidades del TDM es que no toma en cuenta el grado de inmunosupresión que puede alcanzar el individuo, por lo que no bastaría con alcanzar concentraciones plasmáticas terapéuticas, sino también se debería incluir el monitoreo de su efecto a nivel celular, farmacodinamia (Dieterlen y cols, 2011).

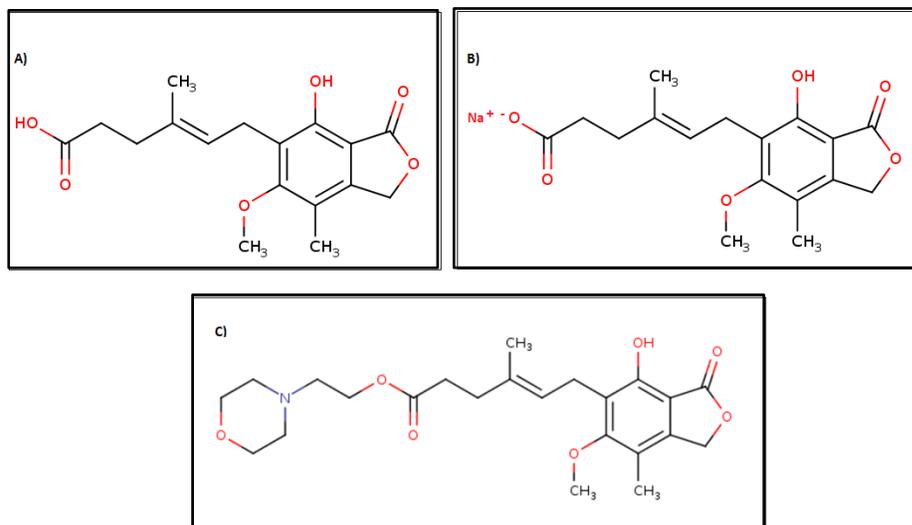
Los estudios en población pediátrica trasplantada acerca de farmacodinamia y polimorfismos con relevancia farmacocinética del MPA no han sido incluidos en guías nacionales, por lo que existe un vacío sobre el comportamiento de los pacientes en Chile, por esto con el presente trabajo se pretende contribuir al establecimiento de una base sólida en estas herramientas para que puedan a futuro incorporarse en los protocolos de seguimiento de los pacientes con TR.

### **1.3. Ácido micofenólico**

El MPA (Figura 1A) es un agente inmunosupresor utilizado para la prevención del rechazo. Es utilizado como parte de un protocolo libre de esteroides. La dosis estándar utilizada en el HLCM en pacientes pediátricos de trasplante renal es  $800\text{mg}/\text{m}^2$  durante el primer mes,  $600\text{mg}/\text{m}^2$  durante el segundo mes y  $400\text{mg}/\text{m}^2$  al tercer mes (Delucchi y cols, 2007); y su rango terapéutico para las concentraciones plasmáticas es entre  $1,4 - 4\ \mu\text{g}/\text{mL}$  (según guías clínicas del HLCM).

El Micofenolato sódico (EC-MPS, Myfortic®) (Figura 1B) es una presentación farmacéutica de MPA. Este, es una formulación de recubrimiento entérico que se metaboliza a MPA y que retrasa la absorción hasta que el fármaco llega al intestino delgado, reduciendo de este modo los efectos secundarios gastrointestinales. Esta formulación también se ha utilizado en niños y adolescentes capaces de tragar la cápsula.

La otra presentación farmacéutica Micofenolato de Mofetilo (MMF, CellCept®, Figura 1C) es bien tolerado en la mayoría de los pacientes. Los efectos secundarios descritos son leucopenia y problemas gastrointestinales (GI), que se asocian en algunos pacientes con diarrea severa que luego requiere una reducción de la dosis, y por lo tanto puede comprometer la función renal (Böhler y cols, 2008).



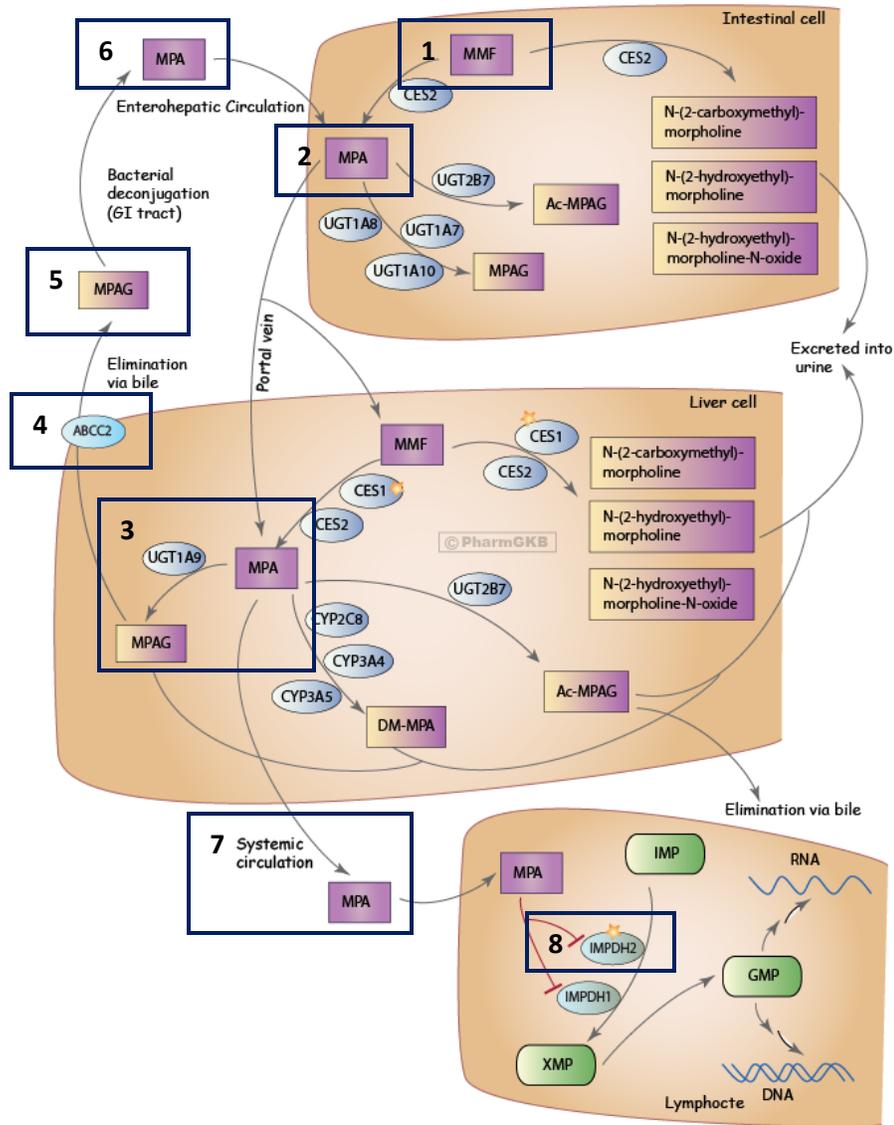
**Figura 1. Metabolito y formas farmacéuticas del ácido micofenólico.** A) Metabolito activo del ácido micofenólico (MPA) (e)-6-(4-hidroxi-6- metoxi-7-metil-3-oxo-5-fentalanil)-4- metil-4-ácido hexanoico. B) Sal de sodio de ácido micofenólico (EC-MPS). C) Micofenolatomofetilo (MMF) 2- morfoetileno de ester de ácido micofenólico. Adaptado de Drug Bank y Myfortic ® Novartis.

En un estudio cruzado en pacientes de TR pediátrico, se demostró que la formulación revestida EC-MPS (Figura 1B) tiene una exposición similar con respecto al ABC y concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) a la del MMF (Figura 1C), pero posiblemente los síntomas gastrointestinales son menores, principalmente como la reducción del dolor abdominal y diarrea (Filler y cols, 2016). En un estudio farmacocinético en pacientes trasplantados renales, se demostró que la dosis de 720 mg de EC-MPS/día es equivalente a 1g de MMF/día (Arns y cols,

2005). También se investigaron los efectos farmacodinámicos de las dos formulaciones, sobre la proliferación, activación y función de los linfocitos. Un estudio clínico en pacientes trasplantados renales sólo mostró una tendencia de EC-MPS a producir una menor inmunosupresión en comparación con dosis equivalentes de MMF (Dieterlen y cols, 2011; Böler y cols, 2008).

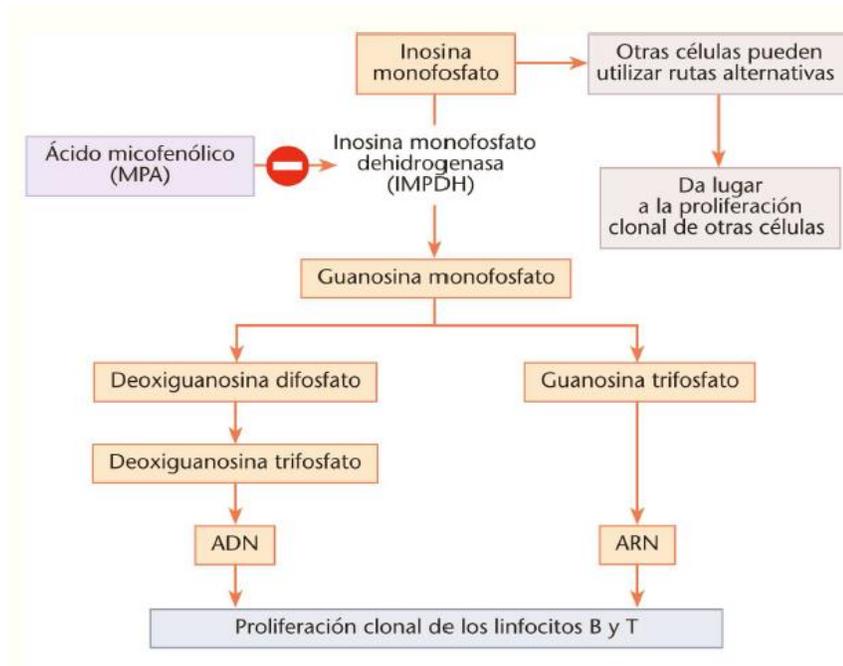
#### **1.4. Farmacocinética del MPA**

El MMF administrado por vía oral experimenta una rápida bioactivación pre-sistémica al MPA (farmacológicamente activo) (Figura 2) por carboxilesterasas (CES), principalmente CES-1 y CES-2. Dentro del intestino, el MMF se hidroliza a MPA, N- (2-carboximetil) -morfolina, N- (2-hidroxietyl) - morfolina y el N-óxido de N- (2-hidroxietyl) - morfolina. El MMF que escapa a la hidrólisis intestinal inicial entra en el hígado a través de la vena porta y se convierte en MPA en el hepatocito. La fase II de glucuronidación de MPA es la principal vía metabólica mediada por uridina difosfato glucuronosil transferasa (UGT) intestinales y hepáticas. Las enzimas primarias implicadas en la glucuronidación de MPA son UGT1A8 y UGT1A9, siendo esta última la que presenta mayor contribución en la formación del metabolito farmacológicamente inactivo MPA-7-O-glucurónido (MPAG) con papeles menores para UGT1A1, 1A7 y 1A10. (Picard, 2004. van Schaik, 2009). El MPAG se excreta principalmente en la orina por secreción tubular activa y filtración glomerular. UGT1A8 y UGT1A10 se expresan sólo extrahepáticamente y por lo tanto son responsables del metabolismo de MPA en el tracto gastrointestinal siendo UGT1A9 quien desempeña un papel predominante en el metabolismo hepático del MPA a MPAG. La excreción de este último por la bilis ocurre principalmente a través de proteína de resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP2), que se expresa en la membrana de los hepatocitos y otros tejidos, luego las bacterias del tracto gastrointestinal (GI) reconvierten el MPAG a MPA el cual es reabsorbido y entra nuevamente en circulación. Esta recirculación enterohepática contribuye con cerca del 30% del  $ABC_{0-12h}$  del MPA ya que genera un segundo pico a las 6 horas después de la ingesta del fármaco (Fukuda 2012, van Schaik, 2009, Filler, 2016). Cabe destacar que aunque no sea significativo, una pequeña cantidad de MPA es metabolizado por CYP3A4/5 a 6-O-desmetil MPA (Picard, 2004).



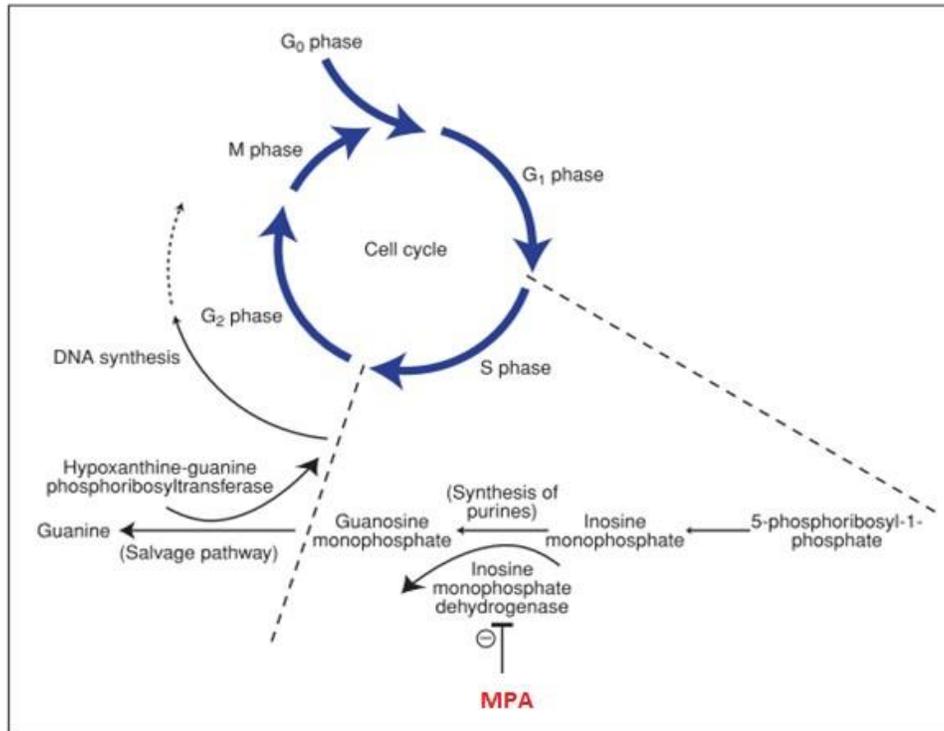
**Figura 2. Representación esquemática del metabolismo ácido micofenólico.** (1) MMF es metabolizado a (2) MPA. (3) En el hígado es principalmente glucuronizado a MPAG por UGT1A9. (4) El transportador de membrana ABCC2 (MRP2) excreta el (5) MPAG hacia la bilis, en el tracto GI la microbiota aquí revierte el proceso y se forma (6) MPA dando como resultado una recirculación enterohepática. El MPA que entra a (7) circulación sistémica se dirige a los (8) linfocitos en donde inhibe a IMPDH y con ello se inhibe la síntesis ADN, producto de la inhibición de GMP necesario para la proliferación celular. Adaptado de Lamba y cols, 2014.

El metabolito activo MPA es un potente inhibidor reversible y no competitivo de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH). En linfocitos humanos aislados de sangre periférica se encontró la isoforma IMPDH II, y el MPA actúa específicamente en esta enzima, que es clave en la síntesis de *ново* de nucleótidos de guanosina (Figura 3).



**Figura 3. El MPA inhibe específicamente la síntesis de *ново* de purinas.** El MPA inhibe a IMPDH y por tanto inhibe la proliferación de linfocitos, los cuales no presentan vías de salvataje. (Carretero, M., 2005).

Por lo tanto, el MPA produce una carencia de guanosina disponible en los linfocitos T arrojando el ciclo celular y reprimiendo la generación de linfocitos T citotóxicos y linfocitos B inhibiendo su proliferación. Ya que este tipo de células no cuenta con una vía de salvataje, se suprimen las respuestas inmunitarias mediadas por células y la formación de anticuerpos (Figura 4) (Barten y cols, 2002).



**Figura 4. Mecanismo de acción del ácido micofenólico.** La vía de salvamento de la síntesis de purinas en linfocitos es menos activa que la síntesis de *novο* de purinas. El monofosfato de inosina (IMP) se convierte en guanosina monofosfato (GMP) por la IMPDH. El MPA inhibe de forma no competitiva y reversiblemente la actividad de IMPDH durante la síntesis de ADN en la fase S del ciclo celular. En la vía de salvamento, la guanosina se convierte a guanina monofosfato por la enzima hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) (Stepkowski, 2000).

Se ha investigado el mecanismo por el cual el MPA arresta el ciclo celular y se ha demostrado en estudios con células humanas mononucleares aisladas que disminuye la degradación de p27<sup>Kip1</sup> e inhibe la inducción de ciclina D/CDK6 kinasa, bloqueando la transición normal desde la fase G<sub>1</sub> a S en los linfocitos T arrojando así el ciclo celular (Laliberté y cols, 1998).

El MPA también inhibe la glicosilación y expresión de moléculas de adhesión, y el reclutamiento de linfocitos y monocitos en sitios de inflamación, además agota la tetrahidrobiopterina (cofactor de óxido nítrico sintasa) y disminuye la producción de óxido nítrico por NO sintasa inducible (iNOs) sin afectar la actividad de NO sintasas constitutivas. Los

macrófagos activados producen NO y superóxido, que se combinan para generar peroxinitrito y dañar el tejido. Por estos dos mecanismos MMF ejerce actividad anti-inflamatoria. A diferencia de los inhibidores de la calcineurina (Tac y ciclosporina), el MPA no es nefrotóxico y no induce la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), implicado en el desarrollo de fibrosis en varios procesos de inflamación crónica. No aumenta la presión arterial, niveles de colesterol o niveles de triglicéridos. De esta manera, reduce el rechazo agudo y crónico del injerto y su uso prolongado no produce nefrotoxicidad (Allison, 2005).

### **1.5. Farmacogenética y variabilidad del MPA.**

Se ha documentado para el MPA variabilidad interindividual asociada a factores farmacogenéticos que incluyen SNPs en la enzima UGTs, enzima de la familia responsable de las principales vías de metabolización (Figura 2). Se ha propuesto que la combinación de los polimorfismos en las isoformas UGT1A9, UGT2B7 y MRP2 (ABCC2) pueden ser importantes predictores de variabilidad interindividual del MPA en población pediátrica. (Sánchez-Fructuoso y cols, 2009; Fukuda y cols, 2012).

Con respecto a las concentraciones plasmáticas terapéuticas que se deben alcanzar, los niveles basales ( $C_0$ ) deben ser mínimo 1,4  $\mu\text{g/mL}$  y el área bajo la curva entre 0 a 12 horas ( $\text{ABC}_{0-12\text{h}}$ ) mayor a 30  $\text{mg} \times \text{h/L}$ , pero no más de 60  $\text{mg} \times \text{h/L}$ , ya que este valor está relacionado a efectos adversos (Filler y cols, 2016). En base a este último punto con respecto al ABC, debido a la problemática que existe en la obtención de muestras en pacientes pediátricos en un tiempo tan prolongado de 12 horas, se ha propuesto un ABC con solo 4 puntos que son extrapolables para obtener un cálculo de  $\text{ABC}_{0-12\text{h}}$  (Filler, 2004).

Debido a la alta variabilidad que presenta el MPA, se realizó un análisis de niveles plasmáticos de pacientes en un período de tiempo determinado debido a la alta variabilidad que presenta el fármaco. En conjunto la unidad de nefrología con la unidad de laboratorio clínico del HLCM, realizó una evaluación arbitraria de los niveles plasmáticos  $C_0$  de MPA de pacientes trasplantados renal pediátricos. Todos los niveles correspondieron a pacientes que se encontraban en tratamiento concomitante con Tac y se estableció como nivel mínimo  $C_0$  un valor de 1,4  $\mu\text{g/mL}$  de MPA el cual se especifica en las guías clínicas utilizadas en el HLCM

como el valor mínimo de rango terapéutico. Bajo esta premisa, se determinó que sobre el 18% de los niveles determinados se encontraban en rango sub-terapéutico. Esta baja en los niveles esperados puede ser atribuible a que a pesar de estar recibiendo las dosis de MPA, de acuerdo a la superficie corporal correspondiente según las guías clínicas, existen otros factores que pueden afectar tales como SNPs asociados a las enzimas metabolizadoras de este fármaco, dejando una inquietud en la unidad de atención al paciente que este trabajo pretende dilucidar al determinar el genotipo de los pacientes atendidos, y evaluar si los SNPs determinados contribuyen a la variabilidad interindividual del MPA. Además se pretende evaluar otros parámetros que no están incluidos en las guías clínicas para el monitoreo del paciente trasplantado como son las proliferaciones linfocitarias y así verificar el estado real inmunosupresor del paciente.

## **1.6. Farmacogenómica**

El tratamiento concomitante con Tac surge como una variable a tener en cuenta que podría afectar la variabilidad del MPA. Sin embargo, un estudio realizado en Japón, en donde se observaron los parámetros farmacocinéticos de MPA y Tac en distintos grupos genotípicos para CYP3A5 y UGT2B7, determinó que tanto la farmacocinética del Tac no fue afectada por cambios en la concentración de los niveles plasmáticos de MPA (Kagaya y cols, 2008), así como la farmacocinética de MPA no cambió en presencia de altas concentraciones de Tac en sangre. De esta forma se demostró, que a dosis terapéuticas, MPA y Tac no tienen una significativa influencia en la farmacocinética del otro, por lo que pueden ser combinados de forma segura (Dupuis y cols, 2012).

Existen distintos SNPs en las enzimas metabolizadoras del MPA que pueden aumentar o disminuir el  $ABC_{0-12h}$  de acuerdo a como esta mutación afecta al promotor del gen o bien su capacidad metabolizadora. De las múltiples variantes existentes destacan UGT1A9 -275T>A y UGT1A9 -2152C>T (Tabla 1) debido a las abundantes publicaciones sobre estos polimorfismos en pacientes de trasplante renal tratados concomitante con Tac o esteroides y a su frecuencia en la población caucásica (potencialmente podrían afectar al 10-12%), que ya han sido asociados a disminución en el  $ABC_{0-12h}$  (Dupuis y cols, 2012; Sánchez-Fructuoso y cols, 2009; Kuypers y cols, 2005), sumado a los SNPs UGT1A9-440C>T, UGT2B7-900A>G, y MRP2-24T>C (este último con prevalencia de un 15%) señalados como predictores de variabilidad interindividual en

la exposición de MPA en población pediátrica que aportan a aumentar el  $ABC_{0-12h}$  (Fukuda y cols, 2012).

Importante mencionar el papel de UGTB7 con una alta actividad a nivel del hígado con la producción del acil glucurónido del MPA (AcAMPG) (Picard y cols, 2004), un metabolito activo, siendo el principal metabolito activo el MPA. Mientras que UGT1A1, 1A7 y 1A10 presentan una menor contribución en la metabolización del MPA (Picard y cols, 2004; van Schaik y cols, 2009). Debido a que UGT1A8 y UGT1A10 se expresan sólo extrahepáticamente y por lo tanto son responsables del metabolismo de MPA en el tracto gastrointestinal es UGT1A9 quien desempeña un papel predominante en el metabolismo hepático de la MPA por lo que los polimorfismos asociados a esta enzima toman mayor relevancia debido a su alta participación en el metabolismo del MPA, aportando alrededor del 40% de MPAG a nivel intestinal y cerca del 50% a nivel hepático (Picard y cols, 2004).

**Tabla 1.** Asociación de los diferentes genotipos para las isoformas de UGT y MRP2 a la farmacocinética del MPA.

Gen	SNP	Cambio	Efecto	Farmacocinética
<b>UGT1A9</b>	rs6714486	Promotor -275T> <b>A</b>	Aumenta glucuronidación de MPA a MPAG	Disminuye $ABC_{0-12h}$
	rs 17868320	Promotor -2152C> <b>T</b>	Aumenta glucuronidación de MPA a MPAG	Disminuye $ABC_{0-12h}$
<b>MRP2</b>	rs717620	Promotor -24T> <b>C</b>	Aumenta expresión y actividad de MRP2	Aumenta $ABC_{0-12h}$

En negrita destaca el alelo mutado. Adaptado de van Schaik y cols, 2009.

## 1.7. Farmacodinamia del MPA

La experiencia clínica ha demostrado que las concentraciones plasmáticas de fármacos inmunosupresores por sí solas no siempre reflejan el efecto real sobre las funciones de las células inmunes. Por lo tanto, la confianza en los valores plasmáticos para la selección de dosis de fármacos inmunosupresores supone un riesgo al sobre o sub estimar la inmunosupresión, que puede conllevar, entre otras, a una infección por un lado y rechazo en el otro, por lo tanto el hecho de poder medir el efecto de los inmunosupresores en diversas funciones de las células inmunes (farmacodinámica) podría aumentar la eficacia y seguridad de los fármacos. La relevancia del ABC,  $C_{\text{máx}}$  y  $C_0$  para predecir las eficacias y la seguridad no es totalmente conocida para todos los inmunosupresores clínicamente aprobados. Por lo tanto, la determinación de las relaciones entre la farmacodinamia y farmacocinética pueden mejorar la utilidad de la monitorización de fármacos (Barten y cols, 2002).

Un objetivo actual de la medicina de trasplante es explorar biomarcadores robustos y establecer ensayos fiables para monitorear la inmunidad alorreactiva y anti-infecciosa individual, para una terapia inmunosupresora más equilibrada que prevenga la inmunosupresión insuficiente o excesiva (Barten y cols, 2007). Se distinguen dos tipos diferentes de estrategias de monitoreo farmacodinámico: (i) estrategias enzimáticas, que monitorean la inhibición de la actividad enzimática del fármaco-objetivo y (ii) estrategias inmunológicas, que miden la respuesta celular (proliferación o ciclo celular) después de estimuladas in vitro (van Rossum y cols, 2010). Los ensayos enzimáticos determinan los marcadores específicos del fármaco, pero no detectan los efectos sobre la función de las células inmunes ni sobre los efectos en el sistema inmune causados por las terapias de combinación. Las estrategias inmunológicas miden la respuesta inmune a varios niveles, tales como concentraciones intracelulares o excreción de citoquinas, expresión de marcadores de activación superficial y proliferación celular (Barten y cols, 2007; van Rossum y cols, 2010).

El trasplante de órganos causa una serie compleja de procesos inmunológicos, pero las células T son los iniciadores y mediadores críticos de la respuesta aloinmune. Las células T son centrales en el proceso de rechazo del trasplante. Los antígenos tienen la capacidad de causar daño directamente en el injerto a través de diversos mecanismos y juegan un papel importante en el suministro de soporte de células B en la generación de la respuesta inmune humoral de los

antígenos donantes. La activación y proliferación de los linfocitos T es el resultado del contacto directo célula-célula de células T *naive* con células presentadoras de antígeno (APC). Un amplio espectro de cambios celulares y moleculares que están conectados a la activación y proliferación de células T pueden ser detectados y cuantificados por citometría de flujo, uno de los diagnósticos más comunes que proporciona detección simultánea de múltiples parámetros de diferentes marcadores de superficie e intracelulares (Dieterlen y cols, 2011).

La proliferación de células T se mide mediante análisis simultáneo de antígeno nuclear proliferante (PCNA) y contenido de ADN. Varios estudios clínicos mostraron que la detección de PCNA en células T actúa como un biomarcador farmacodinámico para diferentes fármacos inmunosupresores en implantes de riñón, pulmón y corazón (Dieterlen y cols, 2011). Las células T activadas pueden ser detectadas mediante la expresión de antígenos de superficie, todos ellos con papeles potenciales en la coestimulación (CD25, CD71), adhesión (CD134, CD154) y apoptosis (CD95) de la respuesta inmune (Barten y cols, 2007). También, la activación de las células T puede ser detectada por acumulación y secreción de citoquinas intracelulares.

Los estudios realizados han concluido que la administración de MPA a pacientes está asociada no solo a una dramática disminución a la proliferación de células T y la actividad de IMPDH, sino también a una disminución en la expresión de CD25 (p55  $\alpha$ ) y CD71 (receptor de transferrina) (Kamar y cols, 2009). Los estudios han sido realizados en pacientes antes del trasplante (Prémaud y cols, 2011) y a los pocos días de realizado este (Dieterlen y cols, 2011), por lo que no existen datos para un monitoreo efectivo mediante citometría de flujo a tratamientos más prolongados en los que tardíamente se observan síntomas de rechazo asociados a bajas concentraciones plasmáticas de droga, o también intoxicaciones debido al aumento de dosis del fármaco inmunosupresor como una medida preventiva al rechazo. Todas estas variables, podrían ser prevenidas si se mantiene un monitoreo constante de las poblaciones linfocitarias.

Considerando todos estos antecedentes, surgen interrogantes como ¿los pacientes que se encuentran fuera de rango terapéutico del MPA son portadores de polimorfismos? y si ¿existe una correlación de los niveles plasmáticos con el estado proliferativo de los linfocitos T en estos pacientes?

Para responder a estas interrogantes, se propuso analizar los principales polimorfismos asociados a las enzimas metabolizadoras (UGT) y la proteína transportadora (MRP2) de MPA y evaluar su influencia en su ABC. Además, analizar el grado de inmunosupresión a través de las poblaciones de linfocitos T y marcadores de activación como son CD25 y CD71 producto del MPA en los pacientes con trasplante renal pediátricos del HLCM.

## **2.1. HIPÓTESIS**

Las variantes polimórficas UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T y/o MRP2 -24 C>T se correlacionan con cambios en la exposición a MPA que no se asocian a la respuesta de la población de células T a la terapia inmunosupresiva en pacientes pediátricos trasplantados renales.

## **2.2. OBJETIVO GENERAL**

Correlacionar los genotipos SNPs UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T y MRP2-24T>C con el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA y asociar el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA con cambios en la PL en pacientes pediátricos con TR atendidos en el HLCM.

## **2.3. OBJETIVO ESPECÍFICOS.**

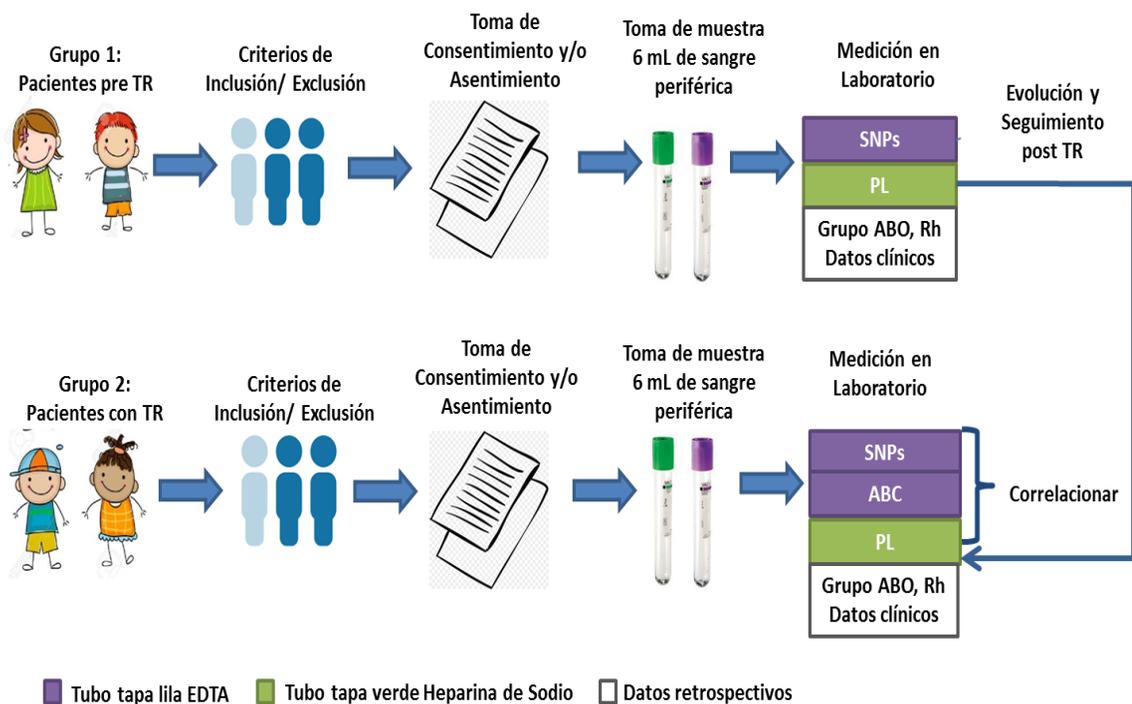
1. Determinar las frecuencias genotípicas y alélicas de UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T, y MRP2-24T>C en la población pediátrica trasplantada y que se encuentran en espera de TR.
2. Evaluar si existe una asociación entre la presencia de los genotipos UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T, y MRP2-24T>C con el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA.
3. Caracterizar la proliferación de linfocitos T y marcadores CD25 y CD71, evaluando si existe una asociación con el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Diseño global del estudio.

Estudio descriptivo de carácter observacional con corte transversal. Cuenta con la aprobación del Comité de Ética en Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo1).

Se reclutaron a todos los pacientes atendidos en la unidad de Nefrología del HLCM que se encontraban en espera de TR o con TR y que estén en tratamiento inmunosupresor estable y se dividieron en dos grupos de pacientes (Figura 5):



**Figura 5. Protocolo procedimiento general.** Esquema representativo de los procedimientos a realizar a pacientes pre TR (Grupo 1) y con TR (Grupo 2), toma de muestras y procesamiento de estas. SNPs: polimorfismos, corresponde a identificación de genotipos UGT1A9 -275T>A / -2152C>T y MRP2 -24C>T. ABC: Área Bajo la Curva, corresponde a estudio farmacocinético del MPA. PL: proliferación linfocitaria, corresponde a Análisis de sangre periférica mediante citometría de flujo para la determinación de proliferación y marcadores de esta.

### 3.2. Enrolamiento de pacientes.

Se enrolaron 54 pacientes, que corresponden al total atendido en la unidad de Hemodiálisis y Nefrología del HLCM entre los años 2017 – 2019, el médico tratante los invitó a participar en el estudio aceptando mediante firma del Consentimiento Informado (Anexo 2 y 3) y/o Asentimiento Informado (Anexo 4 y 5), una vez incluidos se les solicitó los exámenes requeridos.

El reclutamiento de pacientes y análisis de resultados se llevó a cabo de acuerdo a los criterios de Inclusión y Exclusión presentados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Criterios de Inclusión y Exclusión

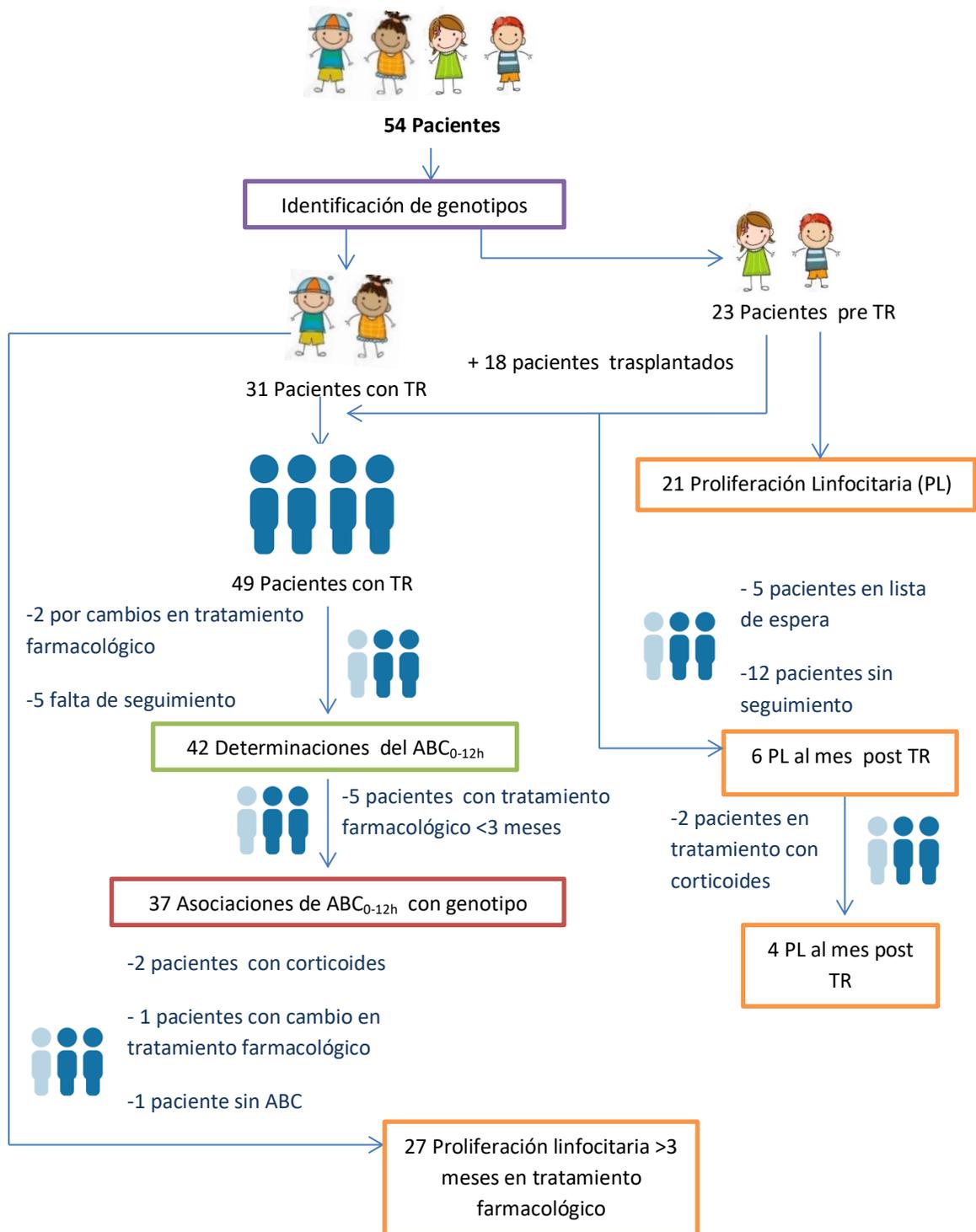
Inclusión	Exclusión
Pacientes en espera de TR	Pacientes trasplantados con régimen inmunosupresor que incluya Ciclosporina o Azatioprina.
Pacientes trasplantados con tratamiento inmunosupresor estable que incluya MPA.	Pacientes con disfunción del injerto durante primer año post trasplante.

Del total de pacientes enrolados (Tabla 3), 31 corresponden a TR que se encontraban en tratamiento inmunosupresor estable con MPA al ingresar al estudio y 23 pacientes en lista de espera de TR. De estos 23 paciente, 18 se trasplantaron durante la realización de este estudio. Estos pacientes ingresaron en la categoría de paciente TR, aumentando a 49 el grupo post trasplante.

**Tabla 3.** Características de pacientes en estudio. (N=54).

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Datos demográficos</b>	
Género (Mujer/Hombre) (n)	24/30
Edad promedio (años)	9 [2 – 14]
Peso (Kg)	29,30 [10 - 61,4]
<b>Tipo de terapia de reemplazo renal</b>	
Hemodiálisis/ Peritoneo	13/41
<b>Diagnóstico (%)</b>	
Estructurales	66,6
Glomerulopatías (General)	9,2
Glomeruloesclerosis Segmentaria	9,2
Hereditarias	5,5
Vasculares	3,7
Otras	5,5
<b>Tratamiento de inducción</b>	
Timoglobulina/ Basiliximab (%)	2,2/97,8
Pre trasplante al inicio/ fin del estudio (n)	23/5
Post trasplante al inicio/fin del estudio (n)	31/49
Corticoides % (sí/no)	15,9/84,1

Para el análisis de resultados, los pacientes fueron distribuidos de acuerdo al tipo de técnica utilizada (Figura 6) de acuerdo a los objetivos, tomando en cuenta si correspondían a pacientes pre o pos trasplante, tiempo y cambios en tratamiento farmacológico y uso o no de corticoides. También se restaron del total los casos en los que no se realizó el seguimiento correspondiente por lo que el número de determinaciones presentadas por técnica corresponde al número analizado y presentado en resultados.



**Figura 6. Flujograma de seguimiento y distribución de pacientes para análisis de resultados.** Se muestra la distribución de los pacientes para el análisis de resultados por técnica. En azul se destaca la pérdida en el seguimiento o exclusión de pacientes de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión. En los recuadros se destacan la cantidad de determinaciones realizadas.

### 3.3. Identificación de genotipos

Se aisló ADN genómico a partir de 200 µl de sangre periférica total con EDTA utilizando un equipo de extracción de ácido nucleico total (MagNA Pure Compact, Roche) para la identificación de los polimorfismos UGT1A9 2152C>T (rs17868320), UGT1A9 -275T>A (rs6714486) y MRP2 -24C>T (rs717620) mediante *TaqMan*<sup>TM</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (Termofisher). Todos los SNPs se procesaron y analizaron en el equipo LightCycler<sup>®</sup> 480II (Roche) según indicaciones del fabricante.

### 3.4. Estudio farmacocinético del MPA

En pacientes post trasplante se tomaron 4 muestras de sangre completa en un tubo con EDTA correspondientes a pre dosis ( $C_0$ ), a la primera, segunda y cuarta hora desde la administración de la dosis ( $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_4$ ). A partir de 200 µl de plasma se determinó el  $ABC_{0-12h}$ , utilizando un equipo HPLC (Agilent Technologies serie 1260 Infinity).

El  $ABC_{0-12h}$  se calculó a partir de cuatro muestras (Curva abreviada) utilizando la siguiente fórmula (Filler, 2004)

$$ABC_{0-12h} \text{ MPA} = 8,217 + 3,163 * C_0 + 0,994 * C_1 + 1,334 * C_2 + 4,183 * C_4$$

La curva abreviada contempla 4 tiempos ya que al ser pacientes pediátricos se dificulta la toma de muestra por 12 horas, y en esta es posible encontrar el  $C_0$  correspondiente al valor basal y  $C_2$  correspondiente a la concentración máxima ( $C_{máx}$ ).

### 3.5. Evaluación de proliferación linfocitaria mediante citometría de flujo

Los efectos farmacodinámicos de MPA en función de linfocitos se evaluaron calculando el porcentaje de proliferación de células T, así como la expresión de CD71 y CD25.

A pacientes en lista de espera (Grupo 1) y luego al mes post trasplante y pacientes post TR en tratamiento estable (Grupo 2), se les tomó una muestra de sangre (4 ml con heparina de sodio). A partir de esta muestra, se extrajeron células mononucleares de sangre periférica mediante

centrifugación por gradiente de densidad en ficoll. Las células se lavaron dos veces con PBS y se sembraron 200.000 por pocillo, previa tinción de las células con el trazador de proliferación VPD-450 por 20 minutos en oscuridad a 37°C. Para la activación de células T, se incubó 200 µl de sangre diluida (1:10) con Fitohemaglutinina (PHA) durante 5 días en placas de 96 pocillos. Posteriormente, los marcadores de superficie de antígeno se tiñeron usando anticuerpos anti-CD3-PerCP marcados, CD25 - FITC y CD71 - PE de anticuerpos monoclonales (Becton Dickinson), y se analizaron por citometría de flujo (Kamar y cols., 2009). La proliferación de linfocitos se determinó mediante análisis citométrico utilizando VPD-450. Para cada muestra de sangre se analizó una muestra estimulada y una no estimulada. Además, se estimularon muestras de voluntarios sanos para fijar un parámetro estándar de los resultados obtenidos y como referencia para los ensayos de los pacientes en tratamiento. Se analizaron tres mil células CD3+ de cada muestra con un citómetro de flujo (Facsanto II, BD Biosciences).

### 3.6. Análisis estadístico

Se contempló como parámetro de evaluación el fenotipo sanguíneo ABO y Rh para determinar si la muestra analizada es representativa de la población chilena. Para esto se utilizaron datos de frecuencias alélicas descritas para la población chilena publicadas por la Encuesta Nacional de Salud del año 2009 – 2010, Ministerio de Salud de Chile. Mediante la prueba estadística de *Chi-cuadrado* ( $X^2$ ) se determinó la frecuencia genotípica y se evaluó si la población se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Los grupos analizados por genotipo portador o no portador y su relación con el  $ABC_{0-12h}$  se compararon mediante el test estadístico de Mann-Whitney. También se evaluó bajo este test la relación de las proliferaciones linfocitarias basales y post trasplante junto con los marcadores CD25 y CD71. Se consideró significativo un  $p < 0.05$ , con intervalo de confianza de 95%.

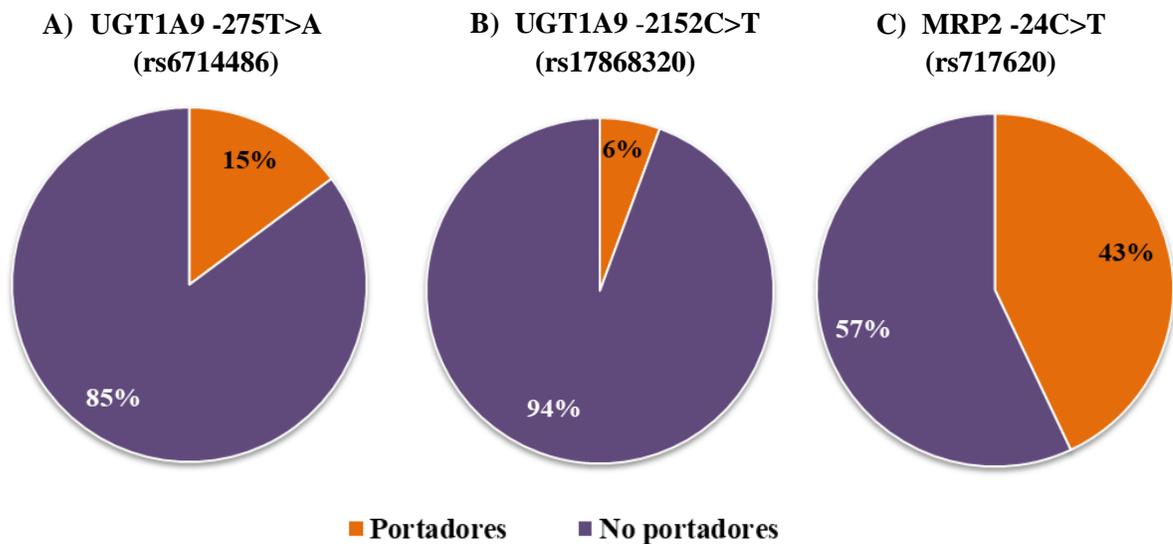
La relación entre  $ABC_{0-12h}$  y su influencia en las proliferaciones linfocitarias se evaluó por test de ANOVA no paramétrico.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Distribución según genotipo

Se determinaron los genotipos para los polimorfismos UGT1A9 -275T>A (rs6714486)/ -2152C>T (rs17868320) y MRP2 -24C>T (rs717620) al total de pacientes reclutados (N=54) obteniendo la distribución presentada en la Figura 7.

En todos los genotipos analizados predomina la frecuencia genotípica homocigota silvestre o No portadores, siendo mayor este porcentaje para los SNPs rs6714486 T/T (85%) y 17868320 C/C (94%) asociados al gen *UGT1A9*, mientras que para el gen *MRP2* el SNPs rs717620 C/C su frecuencia genotípica (57%) resulta más cercana a la de los portadores (43%).



**Figura 7. Distribución de frecuencias genotípicas en pacientes del HLCM.** Se representan en porcentajes los genotipos de los 54 pacientes analizados. A) UGT1A9 -275 Portadores (heterocigotos T/A y homocigotos mutantes A/A), No portadores (homocigotos silvestres T/T) B) UGT1A9 -2152 Portadores (heterocigotos C/T), No portadores (homocigotos silvestres C/C) y C) MRP2 -24 Portadores (heterocigotos C/T y homocigotos mutantes T/T) y No portadores (homocigotos silvestres C/C).

Para los polimorfismos asociados a UGT1A9 los portadores de rs17868320 C/T resultaron ser solo heterocigotos con un 6%, destacando que estos también son portadores de rs6714486 T/A. Con respecto a rs6714486, en los portadores T/A (15%) se incluyó al 1,8% de portadores A/A (homocigoto mutante). En cuanto al equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) (Tabla 4) el SNP rs6714486 se encuentra en equilibrio ( $p=0,39$ ), mientras rs17868320 no lo está.

En el caso del gen *MRP2*, para el polimorfismo rs717620 se incluyó al 1,6% de homocigotos mutantes (T/T) en los portadores junto a la población de heterocigotos (C/T) para calcular la frecuencia genotípica, encontrándose esta última población en equilibrio H-W ( $p=0,36$ ).

A partir de los datos utilizados para calcular las frecuencias genotípicas, se procedió a calcular las frecuencias alélicas (Tabla 4), encontrando que un 8,53% para el alelo mutado rs6714486 (A), un 2,8% para el alelo mutado rs17868320 (T) y un 22,2% para el alelo mutado - rs717620 (T).

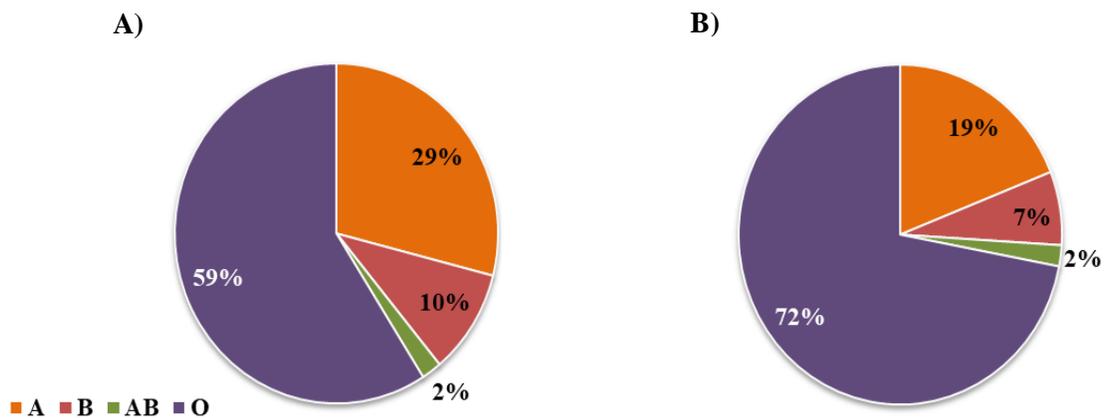
**Tabla 4.** Distribución de polimorfismos en pacientes pediátricos analizados.

SNPs	Población estudiada n=54						
	Frecuencia alélica		Frecuencia genotípica			Equilibrio H-W	
	Alelo Ref.	Alelo Mut.	Homo. silvestre	Heterocigoto	Homo. mutante	$\chi^2$	$p$
UGT1A9-275T>A (rs6714486)	T=0,97	A=0,083	T/T=0,853	T/A=0,129	A/A=0,018	0,73	0,39
UGT1A9-2152C>T (rs17868320)	C=0,972	T=0,028	C/C=0,944	C/T=0,056	T/T=0	9,19	0,002
MRP2 -24C>T (rs717620)	C=0,778	T=0,222	C/C=0,57	C/T=0,414	T/T=0,016	0,85	0,36

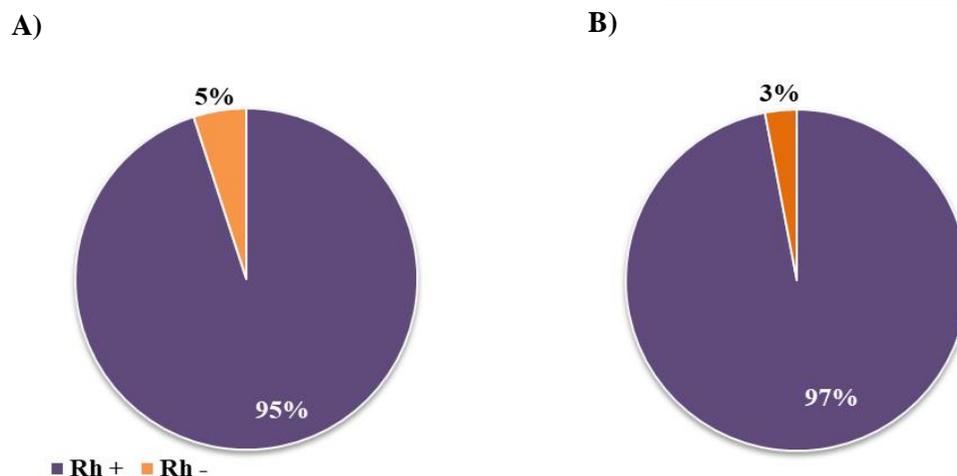
Con el fin de evaluar si la distribución genotípica evaluada es representativa de la población chilena, se analizó la distribución del grupo sanguíneo y el factor Rh. Los 54 pacientes reclutados y estudiados presentan una distribución similar a la muestra poblacional chilena tomando como referencia el grupo sanguíneo (Figura 8) y factor Rh (Figura 9) según lo descrito en literatura (Encuesta Nacional de Salud 2009-2010, Ministerio de Salud de Chile).

Esta distribución se analizó mediante la prueba de  $X^2$ , que determinó estadísticamente la similitud de ambas poblaciones mostrando para el Grupo ABO un  $X^2 = 3,9$  y valor de  $p = 0,272$ ; mientras que para el grupo Rh el valor de  $X^2 = 0,52$  y el valor de  $p = 0,47$  con 3 grados de libertad.

Al comparar la muestra analizada con la población de referencia se observa que predomina el grupo sanguíneo tipo O, seguido de A y B, y con muy baja expresión el fenotipo AB en comparación a los otros grupos en ambas muestras. Lo mismo sucede con el factor Rh en donde en ambas poblaciones predomina el factor Rh positivo.



**Figura 8. Distribución de grupo sanguíneo ABO.** Se representa la distribución del grupo ABO en porcentajes. (A) Distribución de la muestra poblacional chilena (Encuesta Nacional de Salud, Chile 2009-2010. Ministerio de Salud de Chile) y (B) Distribución de la muestra poblacional estudiada.



**Figura 9. Distribución del Factor Rh.** Se representa la distribución del factor Rh en porcentajes (A) de la muestra poblacional chilena (Encuesta Nacional de Salud, Chile 2009-2010. Ministerio de Salud de Chile) y (B) de la muestra poblacional estudiada.

#### 4.2. Farmacocinética del MPA

Se determinaron 42 valores de  $ABC_{0-12h}$  a 42 de los 49 pacientes trasplantados (Tabla 5). Dos pacientes fueron excluidos (Figura 6) por cambios en su tratamiento inmunosupresor (cambio a Ciclosporina y/o Aziatropina). A 5 pacientes no se les realizó el ABC por falta de seguimiento.

Sólo el 50% de los pacientes se encontró en rango terapéutico, mientras que un 35,7% de las determinaciones se encontró en rango subterapéutico y un 14,3% en rango supraterapéutico.

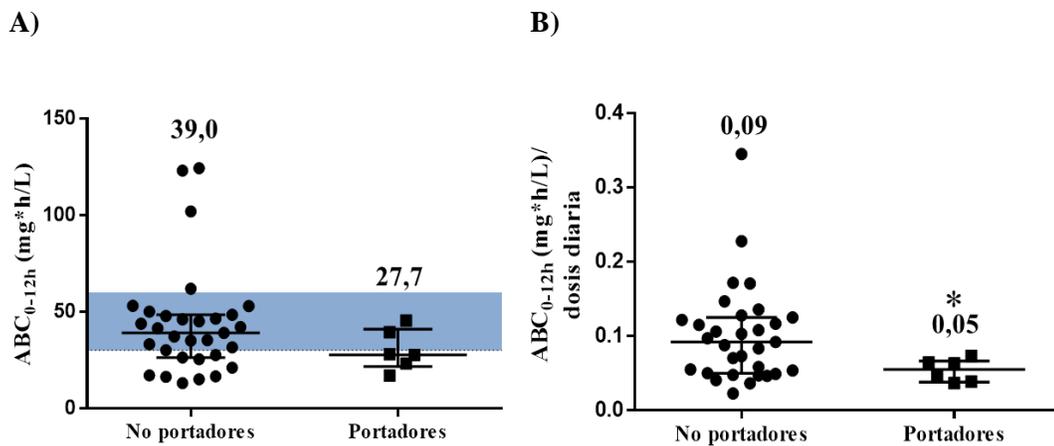
**Tabla 5.** Resumen de las determinaciones de  $ABC_{0-12h}$  de pacientes trasplantados.

Parámetros	Valores
Determinaciones realizadas	42
Mediana	38,1 (mg*h/L)
Desviación standard	25,79
Rango (min – max)	9,8 – 124,3 (mg*h/L)
Percentil 25% - 75%	23,43 - 48,83
Rango terapéutico 30-60 mg*h/L	n=21 (50%)
Subterapéutico < 30 mg*h/L	n=15 (35,7%)
Supraterapéutico >30-60 (mg*h/L)	n=6 (14,3%)

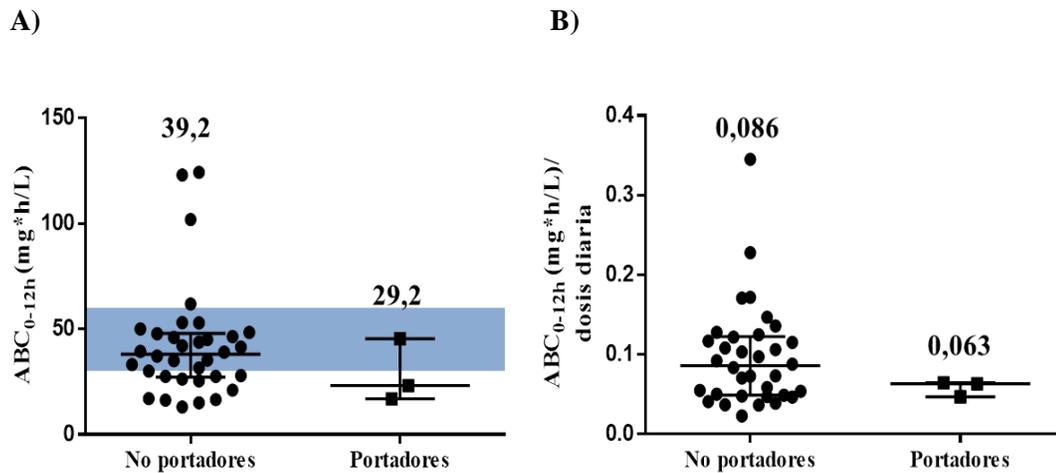
### 4.3. Asociación entre la presencia de los SNPs relacionados con metabolismo de MPA con el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA.

Se analizaron 37 valores de ABC<sub>0-12h</sub> de pacientes con TR con tratamiento inmunosupresor por más de 3 meses (se excluyeron 4 pacientes recientemente trasplantados y un paciente por cambio en tratamiento en el transcurso del estudio de acuerdo a los criterios de exclusión). En todos los genotipos analizados se aprecian pacientes distribuidos tanto en rango sub, supra y terapéutico de acuerdo a sus valores de ABC<sub>0-12h</sub> para MPA

No se encontraron diferencias significativas con respecto a los portadores y no portadores en todos los casos estudiados de genotipo *versus* ABC<sub>0-12h</sub>, sin embargo sí se observó una tendencia a la disminución en las medianas del ABC<sub>0-12h</sub> en el caso de los portadores de los SNPs rs6714486 T/A y A/A (Figura 10A), rs17868320 C/T (Figura 11A) y rs717620 C/T y T/T (Figura 12A).

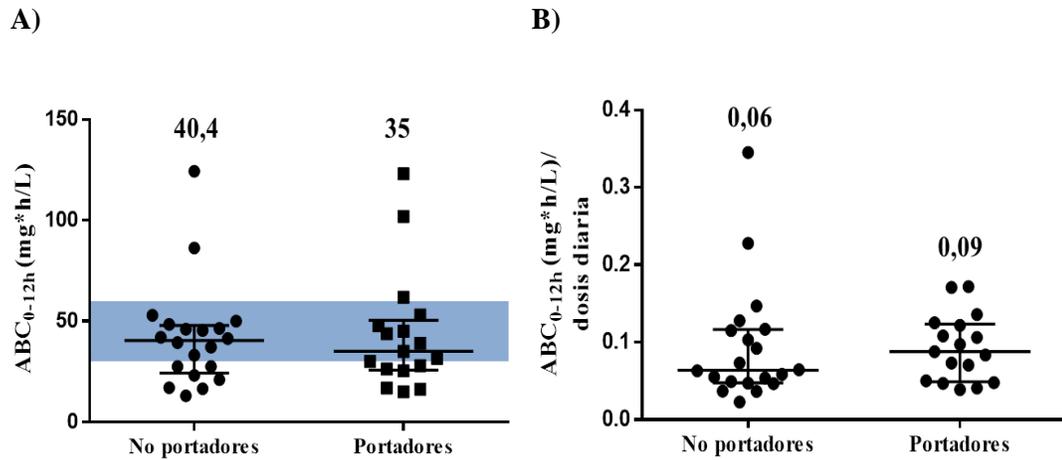


**Figura 10. Asociación de Genotipos para UGT1A9 -275T>A con el ABC<sub>0-12h</sub>.** Portadores corresponden a pacientes rs6714486 T/A y A/A y no portadores a pacientes homocigotos silvestres (T/T). Los valores en la zona superior de cada grupo corresponden a las medianas. A) Asociación con el ABC<sub>0-12h</sub>. En color se destaca el rango terapéutico del MPA. B) Asociación con el ABC<sub>0-12h</sub> normalizado por la dosis diaria correspondiente al nivel analizado de cada paciente. N=37 \**p*=0,033.



**Figura 11. Asociación de Genotipos para UGT1A9 -2152C>T con el ABC<sub>0-12h</sub>.** Portadores corresponden a pacientes heterocigotos (rs17868320 C/T) y no portadores a pacientes homocigotos silvestres (C/C). Los valores en la zona superior de cada grupo corresponden a las medianas. A) Asociación con el ABC<sub>0-12h</sub>. En color se destaca el rango terapéutico del MPA. B) Asociación con el ABC<sub>0-12h</sub> normalizado por la dosis diaria correspondiente al nivel analizado de cada paciente. N=37.

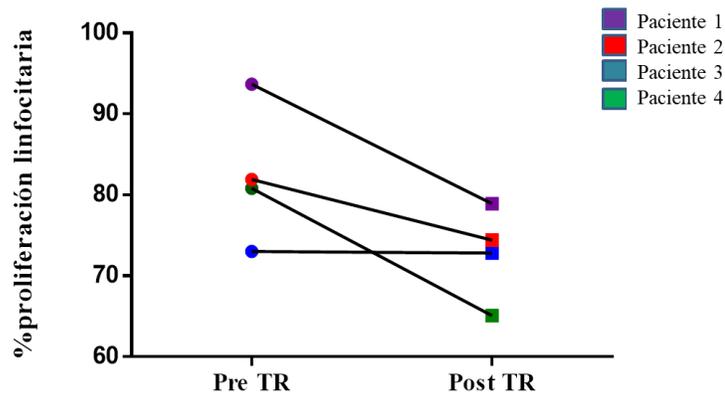
Al normalizar el ABC<sub>0-12h</sub> por la dosis (mg diarios de MPA) por paciente, en el SNP rs6714486 asociado al gen *UGT1A9* (Figura 10B) se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0,03$ ) entre Portadores (A) y No portadores (T), no siendo el caso para rs17868320 (Figura 11B). Por otra parte, los portadores del polimorfismo rs717620 (T) del gen *MRP2* (Figura 12B) presentaron una tendencia al aumento en la mediana en su ABC<sub>0-12h</sub> cuando se normalizó por la dosis.



**Figura 12. Asociación de Genotipos para MRP2 -24C>T con el  $ABC_{0-12h}$ .** Portadores corresponden a pacientes heterocigotos y homocigotos mutados (rs717620 C/T y T/T) y no portadores a pacientes homocigotos silvestres (C/C). Los valores en la zona superior de cada grupo corresponden a las medianas. A) Asociación con el  $ABC_{0-12h}$ . En color se destaca el rango terapéutico del MPA. B) Asociación con el  $ABC_{0-12h}$  normalizado por la dosis diaria correspondiente al nivel analizado de cada paciente. N=37.

#### 4.4. Caracterización de la proliferación de linfocitos T en pacientes antes y después del trasplante renal

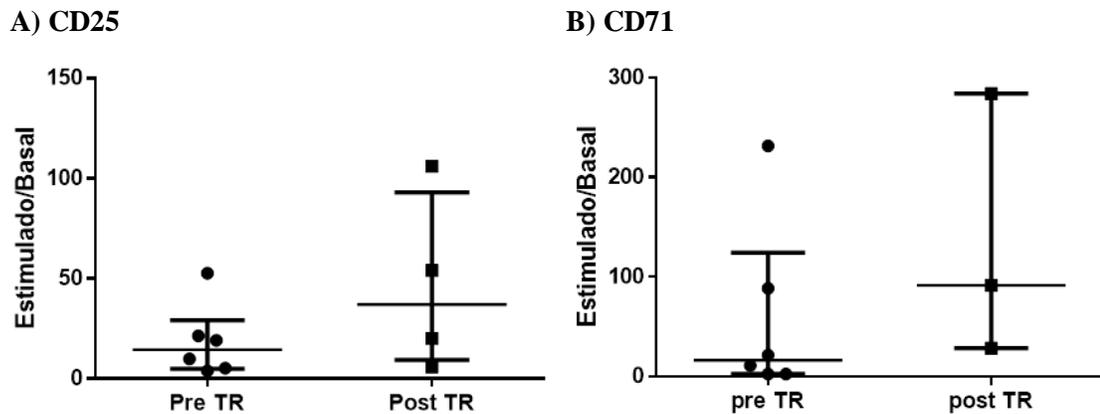
Para el análisis de PL se excluyeron a los pacientes que estaban en tratamiento concomitante con corticoides antes y después del TR por la influencia que estos podían tener en las PL además de los pacientes que se desconocían esta información. Bajo estas circunstancias sólo se pudieron analizar 6 PL y de estas sólo 4 corresponden a seguimiento de pacientes antes y después del TR (Figura 13).



**Figura 13. Variación Proliferación linfocitaria entre pacientes Pre y post trasplante sin corticoides.** Se analizaron las PL realizadas a pacientes pre TR y durante el primer post TR. En color se representa a cada paciente con seguimiento desde Pre TR hasta un mes después del TR. n=4. Test de t no paramétrico.

Es posible observar que al mes post TR existe una pronunciada disminución en las PL (Paciente 1 -15,8%, Pacientes 2 -9,2% y Paciente 4 -19,4%) correspondiente a los pacientes que se encuentran bajo tratamiento inmunosupresor en comparación a sí mismos antes del TR., mientras que para el paciente 3 no se observaron cambios.

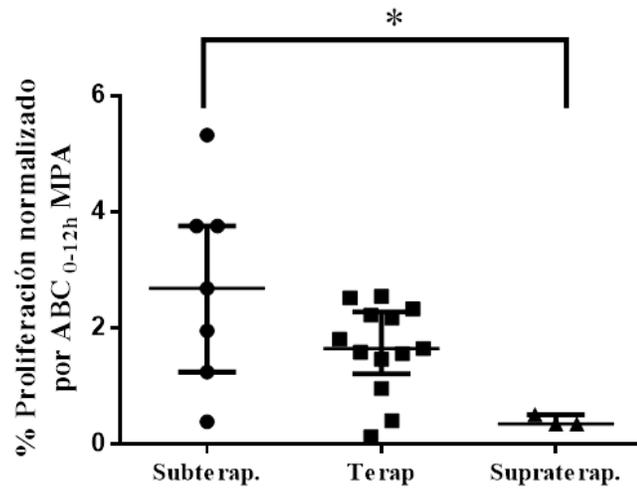
Con respecto a los marcadores CD25 y CD71 (Figura 14) no se observan diferencias significativas, sin embargo se observa una tendencia al aumento de estos marcadores en los pacientes al mes del trasplante.



**Figura 14. Variación de marcadores CD25 y CD71 entre pacientes Pre y post trasplante sin corticoides.** Se analizaron los marcadores CD25 y CD71 en las PL realizadas a pacientes pre TR y durante el primer post TR. A) Veces de aumento del marcador CD25 en muestras estimuladas/basal B) Veces de aumento del marcador CD71 en PL estimuladas/basal. n=6 Test de t no paramétrico.

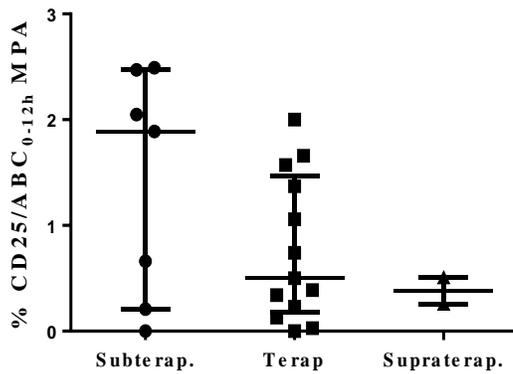
#### 4.5. Asociación entre el $ABC_{0-12h}$ con la proliferación linfocitaria

Se determinaron 23 proliferaciones linfocitarias correspondientes a los pacientes TR (Grupo 2) que se encontraban con tratamiento inmunosupresor con MPA mayor a 3 meses (31 pacientes) y sin corticoides. Las proliferaciones se normalizaron por su  $ABC_{0-12h}$  correspondiente (Figura 15) y se observó la relación que existe entre los niveles sub, supra y terapéuticos, siendo significativa la diferencia entre los pacientes con niveles sub y supratrapéuticos. Al normalizar por dosis los  $ABC_{0-12h}$  utilizados para normalizar las proliferaciones se sigue observando la misma tendencia. Un comportamiento similar se observa entre los marcadores CD25 y CD71 (Figura 16) al comparar con el  $ABC_{0-12h}$ , sin embargo las diferencias no resultaron ser significativas.

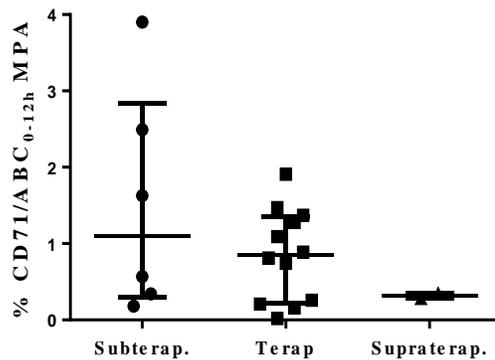


**Figura 15. Asociación entre proliferación Linfocitaria con  $ABC_{0-12h}$  MPA.** Se determinaron proliferaciones linfocitarias a 23 pacientes, estas se dividieron por el  $ABC_{0-12h}$  correspondiente y se representan de acuerdo a si el  $ABC_{0-12h}$  obtenido corresponde a Subterapéutico, Terapéutico o Subraterapéutico. \* $p=0,03$

**A) CD25**



**B) CD71**



**Figura 16. Asociación entre marcadores de activación de linfocitos T con  $ABC_{0-12h}$  MPA.** Se determinaron los marcadores A) CD25 y B) CD71 a 22 pacientes, el porcentaje del marcador bajo estímulo con PHA se dividió por el  $ABC_{0-12h}$  de MPA correspondiente y se representan de acuerdo a si el  $ABC_{0-12h}$  obtenido corresponde a Subterapéutico, Terapéutico o Subraterapéutico.

## 5. DISCUSIÓN

En la actualidad, parte del éxito del TR se debe al perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas, mejor conocimiento de las patologías que llevan a IRC en la infancia y al uso individualizado de las nuevas drogas inmunosupresoras. Además de reconocer que los niños y adolescentes presentan cambios constantes, y que en cada etapa de su desarrollo se deben evaluar para evitar el rechazo del injerto como parte de la respuesta del sistema inmune (Pefaur y cols, 2008). Por esto el mayor reto en la investigación inmunológica es esclarecer los mecanismos de tolerancia y frente a esto, entonces adaptar la terapia farmacológica para evitar el rechazo del injerto en los pacientes trasplantados a corto y largo plazo.

### 5.1. Frecuencias genotípicas y alélicas de UGT1A9 -275T>A, UGT1A9 -2152C>T, y MRP2-24T>C en la población pediátrica trasplantada y en espera de TR.

El fármaco inmunosupresor MPA presenta una gran variabilidad inter e intraindividual. Este, es un problema que aqueja a los clínicos encargados de controlar a los pacientes post TR que utilizan el fármaco como un inmunosupresor, manteniendo la tolerancia al injerto tanto con reducción del rechazo agudo así como minimizando el efecto inmunosupresivo. Debido al delicado equilibrio que se debe manejar en los parámetros farmacocinéticos del MPA en búsqueda de concentraciones plasmáticas que se mantengan dentro del rango terapéutico establecido, se han investigado nuevos factores que pueden estar involucrados en esta variabilidad como son los SNPs asociados a los genes de las enzimas metabolizadoras del MPA UGT1A9 y MRP2, ambas con una gran participación en la metabolización del MPA, y que han sido involucrados directamente con el  $ABC_{0-12h}$  en diversos trabajos, demostrando la participación específicamente de los SNPs UGT1A9 -275T>A y -2152C>T asociados a disminución de los niveles plasmáticos de MPA en los pacientes de mayor riesgo a rechazo agudo (van Schaik y cols, 2009), mientras que MRP2 -24C>T ha sido asociado con el aumento del  $ABC_{0-12h}$  y con un efecto protector. (Naesens y cols, 2006).

En primera instancia se analizó el genotipo de los pacientes. La muestra analizada resultó ser representativa, avalada por la distribución fenotípica del grupo sanguíneo ABO y Rh de la población chilena, por lo que se procedió a analizar los SNPs en cuestión. Estadísticamente la

muestra poblacional se distribuye de igual forma que la muestra modelo que es la población chilena (Figura 8 y 9) según los test estadísticos correspondientes (*chi* cuadrado), sin embargo, al analizar los genotipos para los SNPs asociados a UGT1A9 y MRP2, la distribución de estos no fue la esperada según literatura en todos los casos, debido en parte a que la mayor parte de los trabajos se han realizado en otras poblaciones como americanas, europeas o asiáticas y no necesariamente se correlacionan con la población latinoamericana, por lo que toma relevancia realizar este tipo de trabajo ya que la significancia clínica dependerá de la etnicidad (Sanchez-Dominguez y cols, 2017).

Para el caso de UGT1A9 -275T>A (Figura 7A) se esperaba un ~12% (Sanchez-Fructuoso y cols, 2009, Naesens y cols, 2006) de frecuencia genotípica para los portadores del SNP rs6714486 (T/A) y la muestra analizada presentó un 12,9% siendo bastante similar, sin embargo la frecuencia genotípica para UGT1A9 -2152C>T (rs17868320) esperada corresponde a ~9% (Sanchez-Fructuoso y cols, 2009) y la población analizada mostró un 6% (Figura 7B), siendo 2/3 de lo esperado además de no encontrar pacientes que portaran el SNP mutado en ambos alelos para rs17868320 (T/T) que en literatura corresponde a un 1,1% (Naesens y cols, 2006), pero que ya había sido reportada la ausencia de estos en una población de 338 individuos procedentes de centros en distintos continentes (van Schaik y cols, 2009).

Las frecuencias genotípicas para MRP2 -24C>T resultaron ser más cercanas a la literatura con un 41,4% para la población portadora del SNP rs717620 (C/T) y que según literatura corresponde a ~43,2% (Naesens y cols, 2006), mientras que un 1,6% resultó ser portador de ambos alelos mutados (T) bastante más bajo que lo reportado en literatura con un 3 a 5% (Naesens y cols, 2006. Van Schaik y cols, 2009),

Con respecto a las frecuencias alélicas, para el alelo mutado (A) del SNP rs6714486 es de un 8,3%, por encima de lo reportado, correspondiente a un 6,84% (Naesens y cols, 2006), mientras que el alelo mutado rs17868320 (T) presentó una frecuencia de un 2,8% que es bastante menor que lo reportado por Naesens y cols, 2016 (8,9%), pero más cercano a lo reportado por van Schaik y cols, 2009 (5%), destacando que existen estudios en donde no se ha observado este SNP (Mazidi y cols, 2013). En el caso del gen *MRP2* para el SNP en el promotor -24C>T, la frecuencia alélica resultó ser un 22,2% para el alelo mutado (T), cercano a lo reportado (Naesens

y cols, 2016, van Schaick y cols, 2009) encontrándose este SNP en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 4).

Es considerable encontrar diferencias en la distribución de genotipos dependiendo la etnicidad (Sanchez-Dominguezy cols, 2018). Es precisamente por esta variabilidad que es tan importante conocer a la población en cuestión de tal forma que los tratamientos clínicos sean individualizados de acuerdo a la farmacogenómica del paciente, anticipándose a efectos adversos asociados a la metabolización de fármacos. Por este motivo se hace importante conocer el panorama a nivel nacional ya que Chile presenta en su población una distribución genética de ascendencia relacionada a la geografía (Eyheramendy y cols, 2015).

Todas estas conclusiones son con respecto a la población analizada y no corresponden a la población chilena como tal, es más, de los polimorfismos analizados para el gen *UGT1A9* solo uno se encontró en equilibrio de H-W por lo que es necesario ampliar el número de personas y aumentar a una muestra más amplia, incluyendo distintos sectores geográficos a lo largo de todo Chile, proyectando un estudio multicéntrico que incluya a pacientes sanos, así asegurando la prevalencia de los SNPs que se encuentran con menor frecuencia.

El análisis de los genotipos se llevó a cabo en una muestra reducida (n=54) y sesgada ya que correspondía a los pacientes en lista de espera y post TR atendidos en la Unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Para mejorar estos resultados con respecto a las frecuencias alélicas se hace necesario incorporar a niños sanos o en su defecto a adultos, de tal forma que la muestra aumente a un tamaño óptimo. De esta forma, al ampliar la muestra poblacional, también se puede descartar que estos SNPs estén asociados o predispuestos en la población trasplantada renal.

## **5.2. Asociación de los genotipos *UGT1A9* -275T>A, *UGT1A9* -2152C>T, y *MRP2*-24T>C con el $ABC_{0-12h}$ del MPA.**

Se propuso evaluar la influencia de estos SNPs en los niveles plasmáticos de pacientes trasplantados de la unidad de Nefrología del HLCM, debido a que un porcentaje de pacientes presentaban niveles subterapéuticos a pesar de estar recibiendo las dosis recomendadas según su período post trasplante y superficie corporal.

Según los resultados obtenidos, el 35,7% de los pacientes trasplantados presentan un  $ABC_{0-12h}$  de MPA en rango subterapéutico, que podría relacionarse con una disminución en la inmunosupresión y con ello un eventual rechazo del injerto. Cabe destacar, que estos pacientes reciben un tratamiento inmunosupresor concomitante con Tac, en ocasiones corticoides y otros fármacos dependiendo del estado clínico, además se debe considerar que al ser pacientes pediátricos van variando en peso, talla y metabolización a medida que se desarrollan a diferencia de un paciente adulto que su progreso en estos parámetros tiende a ser más estable, por lo que existen múltiples factores que podrían influenciar las concentraciones plasmáticas de MPA.

Al normalizar el  $ABC_{0-12h}$  por la dosis, se puede corregir la dosificación a cada paciente, ya que normalmente se administran dosis estándar de acuerdo a los protocolos vigentes en guías clínicas según período post trasplante y en base a su superficie corporal. De esta forma, al dividir el valor de ABC por la dosis diaria si el resultado es de bajo valor se puede considerar que se requirió una mayor dosis para alcanzar concentraciones plasmáticas adecuadas de MPA. Así, tanto los valores obtenidos de las curvas para los genotipos UGT1A9 -275T>A como UGT1A9 -2152C>T al ser corregidos (Figura 10B y 11B), tienden a agruparse debido a que seguramente se ajustaron las dosis en los pacientes que se encontraban en rango terapéutico. De la misma forma, al observar el caso de los valores de  $ABC_{0-12h}$  obtenidos para los portadores de MRP2 -24 C>T, al corregir por dosis (Figura 12B) se puede observar como la mediana tiende al aumento en comparación con lo no portadores, situación contraria al observar solo el  $ABC_{0-12h}$  por grupo (Figura 7A). De esta forma, se puede deducir que algunos pacientes necesitaron menor dosis del fármaco para alcanzar las concentraciones plasmáticas óptimas de MPA y que son portadores del alelo mutado (T).

A pesar de estas observaciones, que concuerdan con lo esperado, tanto en los genotipos UGT1A9 -2152C>T como MRP2-24T>C sólo se observaron tendencias (disminución en mediana en un 26,8% y aumento de un 44,4% respectivamente). Para el caso del genotipo UGT1A9 -2152C>T podría deberse principalmente al bajo número de pacientes que se pudieron analizar (6 versus 31), aunque existen otros factores mencionados en literatura como son la dosis de MPA que reciben los pacientes y que puede influir en las diferencias en el ABC, mostrando diferencias entre 1g y 2g de MPA al día (Kuypers y cols, 2005).

En base a lo anterior, al ser pacientes pediátricos la población analizada, sólo el 5,6% recibe 1g de dosis de MPA diario. Por el contrario, el 44,5% recibe dosis de 360 mg al día y el resto varía hasta los 720 mg diarios, y en literatura se ha señalado que a 1g de dosis de MPA no se observan diferencias significativas para los genotipos UGT1A9 -275T>A y UGT1A9 -2152C>T. En cambio, en pacientes que consumen 2g de MPA diarios se observaron diferencias significativas entre los portadores de los SNPs UGT1A9 -275 (T/A) y UGT1A9 -2152 (C/T), quienes presentaron menor  $ABC_{0-12h}$  en comparación a los no portadores, señalando que a menores dosis de MPA los genotipos estudiados no resultaban útiles. Una posible explicación es que la actividad de glucuronidación de UGT1A9 a nivel intestinal produzca más MPAG y se vea disminuido la reintegración de MPA a la circulación enterohepática, tomando en cuenta la posibilidad de saturación del sistema (Kuypers y cols, 2005).

Cabe destacar, que no todos los pacientes que presentaron niveles subterapéuticos son portadores de los SNPs UGT1A9 -275T/A y/o UGT1A9 -2152C/T, de la misma forma, de los pacientes que se encontraron en rango supratrapéutico, solo el 42,9% resultó ser portador de MRP2-24T/C o T/T. Por lo que se puede concluir que en esta población en estudio, los SNPs UGT1A9 -2152C>T y MRP2-24>C no influirían en el  $ABC_{0-12h}$ , pero si se debe tener en consideración el SNP UGT1A9 -275T>A al momento de ajustar dosis ya que si se observó una correlación entre este SNP y la farmacocinética del MPA.

Otro factor importante a considerar es la utilización de una curva abreviada para calcular el  $ABC_{0-12h}$ . La curva analizada solo contempla 4 horas desde la administración del fármaco debido a la dificultad de tener un paciente pediátrico retenido por tan largo tiempo y tomando una gran cantidad de muestras de sangre. En la práctica, no es la exposición real al fármaco que ocurre durante 12 horas (Filler, 2004), por lo tanto, no se reflejaría del todo el impacto de los SNPs estudiados en la recirculación enterohepática ( $ABC$  de 6 a 12h) ya que no se pudieron obtener muestras de las 6 hasta 12 horas, y que además es donde MRP2 tendría una mayor participación. (Kuypers y cols, 2005).

### **5.3. Caracterización de la proliferación de linfocitos T y marcadores CD25 y CD71 y asociación con el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA.**

El sistema inmune defiende al organismo frente a agresiones externas como son los microorganismos y toxinas. Además, debe mantener la capacidad de tolerar los antígenos que se generan de forma fisiológica durante el desarrollo (pubertad lactancia, entre otros) y que se están en contacto a diario. El alotrasplante es considerado por el sistema inmune como un agente extraño y por ende genera una respuesta de rechazo hacia este. Con el objeto de modular esta respuesta es que se administran fármacos con capacidad inmunosupresora que no sólo inhiben la capacidad de respuesta al aloinjerto, sino que también suprimen las reacciones que protegen al organismo frente a infecciones, tumores, entre otros. Precisamente, esta falta de selectividad inmunológica es la responsable del desarrollo de inmunodeficiencia en los pacientes, junto a neoplasias y otros factores que provocan la pérdida del injerto a largo plazo (San Segundo y cols, 2007).

Hasta la década pasada, muy pocos trabajos habían tratado la relación entre la farmacocinética del MPA y el efecto en la función de los linfocitos en pacientes, además de que la mayoría de estos se realizaban *in vitro*, por lo que no existía claridad sobre lo que sucedía en humanos *in vivo*. Por esto, es importante tomar en cuenta la farmacodinámica, ya que el TDM contempla solo el monitoreo de C<sub>0</sub> que sí se correlaciona con el ABC<sub>0-12h</sub>, sin embargo, siempre existe la posibilidad que un paciente no responda como corresponde al MPA por lo que es ideal el monitoreo farmacodinámico, observando las proliferaciones linfocitaria y ciertos marcadores que pueden estar involucrados a etapas temprana de rechazo agudo.

Se evaluó si existe correlación entre el ABC<sub>0-12h</sub> del MPA y la proliferación linfocitaria. Esto se planteó de acuerdo a la premisa que al analizar el estado inmunosupresor del paciente, no necesariamente será el óptimo a pesar de encontrarse en rango terapéutico, ya que existen otros factores que pueden variar la respuesta inmune final. Un ejemplo son los polimorfismos asociados a la IMPDHII que varían su actividad metabólica (Cilião y cols, 2018) y, teniendo en cuenta que el tratamiento con MPA no inhibe el 100% de IMPDH (no se busca suprimir completamente la respuesta linfocitaria), podrían variar las proliferaciones linfocitarias. Por lo que se hace necesario monitorear el real estado inmune del paciente si no se han evaluado con anterioridad todos los factores asociados (genéticos, farmacológicos, etc).

Para la realización del presente trabajo con carácter exploratorio, se tenía la intención de realizar un seguimiento a los pacientes de TR que inician un tratamiento inmunosupresor, ya que debido a los cambios de dosis por protocolo durante los tres primeros meses, se podría correlacionar dosis y concentraciones plasmáticas con el efecto clínico. Sin embargo el seguimiento de la totalidad de pacientes no se pudo realizar con éxito (Figura 6), pero sí se pudieron determinar PL y marcadores (CD25 y CD71) según los  $ABC_{0-12h}$  que presentaban los pacientes, de acuerdo a lo planteado en la metodología. De esta forma fue posible establecer las bases para en un futuro expandir el estudio a los pacientes de largo tratamiento y poder generar un protocolo para monitoreo de rutina.

Con respecto a las PL (Figura 13) existe una tendencia a la disminución en los porcentajes de proliferación en los pacientes tratados con MPA durante el primer mes post TR en comparación a ellos mismos antes de este. Los resultados muestran solo una tendencia, ya que el número de pacientes a los cuales se les realizó seguimiento exitoso sólo corresponde a 4. A pesar de esto, la tendencia resultó ser lo esperado ya que los pacientes se encontraban dentro del primer mes post TR que es cuando deben presentar un mayor estado de inmunosupresión.

Por otra parte, se observó la relación que existe entre las PL y los niveles sub, supra y terapéuticos (Figura 15), siendo significativa la diferencia entre los pacientes con niveles sub y supraterapéuticos, demostrando que el  $ABC_{0-12h}$  se correlaciona con la respuesta linfocitaria, es decir, a mayor  $ABC_{0-12h}$  la respuesta linfocitaria disminuye y viceversa. Al normalizar por dosis los  $ABC_{0-12h}$  utilizados para normalizar las proliferaciones se sigue observando la misma tendencia. La inhibición de la PL dependiente de la concentración ya había sido evaluada en líneas celulares y en linfocitos T de pacientes pre trasplante que recibieron dosis de MPA (Millan y cols, 2000; Kamar y cols, 2009), por lo que resulta importante tener datos de pacientes que se encuentran con múltiples tratamientos farmacológicos por un tiempo prolongado como es el caso de la muestra analizada con pacientes post TR con más de 3 meses de tratamiento estable de MPA y Tac. Así, trabajos con seguimiento de pacientes en sus tratamientos por años cobran mayor relevancia ya que sus resultados incluyen todos los factores asociados al estado clínico y tratamiento (San Segundo y cols, 2019).

Se observa que existe una distribución bastante heterogénea en los pacientes subterapéuticos, por lo que el simple hecho de determinar el  $ABC_{0-12h}$  no sería suficiente para asegurarse que la

respuesta inmunitaria está siendo efectiva. Bajo esta premisa, además de intentar determinar cómo responden las poblaciones linfocitarias al MPA, se buscó determinar si ciertos marcadores celulares podrían servir como un parámetro para evaluar la respuesta inmune en el monitoreo del paciente. Existen diversos trabajos en donde se han propuesto marcadores de activación celular de linfocitos T como son CD25 y CD71, o de función celular como IL-2 y TNF- $\alpha$  que varían su expresión producto del MPA, así como el efecto de este en la expansión clonal de linfocitos (Prémaud y cols, 2011; He y cols, 2011). La selección de los marcadores CD25 y CD71 se debió a que son marcadores de activación de linfocitos T, que es la población celular en estudio, ya que es la diana del MPA y a la cantidad de trabajos previos en donde se había observado que el MPA ejerce un efecto en estos. Como resultado, se determinaron los marcadores CD25 y CD71 en pacientes pre y post TR durante el primer mes, sin mostrar diferencias significativas. En trabajos previos, se determinó que existía una disminución de estos marcadores en presencia de MPA, sin embargo las comparaciones no se realizaron con los mismos pacientes sino que con grupos control o *in vitro* (Fadel y cols, 2015; He y cols, 2011).

Tanto las determinaciones de CD25 como CD71 entre pre y post TR (Figura 14) no mostraron diferencias significativas. Contrario a lo esperado, se observó un aumento de ambos marcadores con una gran dispersión de datos debido al bajo número de determinaciones, pero que podría explicarse por los pacientes que utilizan como tratamiento de inducción THYMO, ya que se ha observado una disminución de CD25 en relación a este (Fadel y cols, 2015), que no es el caso de la muestra analizada en donde los pacientes fueron tratados con Basiliximab. A diferencia de la mayoría de los estudios en que los pacientes aún no son trasplantados, por lo que serían menos reactivos, la población analizada en este trabajo se encuentra con un injerto y por lo tanto las funciones del sistema inmune se encuentran en alerta mientras el fármaco inmunosupresor ejerce su efecto, siendo precisamente este el período más crítico a nivel post trasplante, por lo que sería interesante analizar junto con otros marcadores y determinar poblaciones específicas de células vinculadas a la tolerancia del injerto como son células T reguladoras (Treg) CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>, que en otros estudios se ha observado como varían en número desde el trasplante hasta los 2 años posteriores a este, y que mayores niveles de este grupo de células están presentes en pacientes que han mantenido el injerto a largo plazo (San Segundo y cols, 2019. Krajewska y cols, 2019).

Sin embargo, al realizar el análisis con pacientes post TR con más de 3 meses en tratamiento inmunosupresor estable (Figura 15), se observó una tendencia en la disminución de ambos marcadores a mayor  $ABC_{0-12h}$  de MPA (Supraterapéutico) al igual que sucedió con las PL, mostrando que MPA tendería a modificar estos marcadores como se ha observado en literatura (Kamar y cols, 2009), destacando que este estudio tiene pacientes pre y post TR a diferencia de los trabajos en literatura en donde los pacientes durante la primera dosis de MPA anterior al trasplante son analizados (Prémaud y cols, 2011). Por otra parte, al aumentar las determinaciones en la población en estudio se podría reducir la dispersión y obtener datos más homogéneos que permitan realizar las comparaciones bajo las condiciones de post TR en tratamiento con MPA concomitante con Tac.

Con respecto a la participación CD71 en la respuesta inmune, en estudios recientes se ha indicado que las células eritroides CD71 + son parcialmente responsables de la inmunosupresión del sistema inmune neonatal (Elahi y cols, 2013). Sin embargo, como marcador de rechazo, fue descartado por Fadel y cols, 2015, al comparar pacientes trasplantados renales con y sin rechazo agudo ya que los niveles de CD71 no resultaron ser significativamente distintos. Mientras que Prémaud y cols, 2011 encontraron una disminución en la expresión en pacientes que recibieron dosis de 1g de MPA antes del trasplante hepático. Existe una diferencia entre los estudios y el presente trabajo, y es que las dosis en la mayoría de los pacientes pediátricos son menores a 1g de MPA, lo que podría influir en que los resultados para CD71 no fueron significativos pero que si fue posible observar una clara tendencia a la disminución a mayor  $ABC_{0-12h}$  (Figura 16).

Con respecto a la participación de CD25 en la respuesta inmune, sumado a otros marcadores como lo es FoxP3, pueden resultar en importantes predictores de rechazo. Durante el rechazo agudo del riñón trasplantado, existe un aumento de la expresión del gen *FOXP3* así como un aumento de CD4+CD25+FOXP3+ y otras poblaciones observadas en biopsias del injerto (Fadel y cols, 2015), por lo que resultaría interesante evaluar además de CD25 a FOXP3 en pacientes trasplantados en tratamiento con MPA ya que no existe claridad al respecto por falta de estudios. También se ha observado una relación entre el MPA en conjunto con inhibidores de mTOR y las poblaciones de células T favoreciendo la expansión de las poblaciones de Treg e inhibiendo la PL de células T de memoria (San Segundo y cols, 2007).

Precisamente por esto resulta importante el estudio farmacodinámico, ya que al poder establecer estos parámetros claramente (números absolutos) sería el objetivo variar la terapia farmacológica justamente en busca de estos resultados. Así, en el futuro se podría determinar a qué concentración plasmática se pueden mantener las poblaciones de células T que se requieren, y hacer una especie de tratamiento a la inversa de lo que suele realizarse.

Finalmente, no se logró determinar la implicancia de los polimorfismos estudiados para el gen *UGT1A9* en las proliferaciones linfocitarias ya que el número de pacientes portadores a los que se pudo determinar las PL o marcadores era muy bajo (1 pre TR y 1 post TR), y por lo tanto no se pudo realizar ningún tipo de análisis. Mientras que para el caso del polimorfismo asociado al gen *MRP2*, ninguno de los pacientes con PL en  $ABC_{0-12h}$  de MPA supraterapéutico llevaba el genotipo portador (C/T o T/T), contrario a lo que se podría esperar al estar relacionado este genotipo con un aumento en el  $ABC_{0-12h}$ , que como se observó en este estudio, tendería a disminuir la PL. Al analizar a los pacientes portadores del SNP, más de la mitad presentó PL mayores al 70%, contrariamente, se esperaba que la gran mayoría de los pacientes portadores presentaran menores PL en comparación al grupo de pacientes no portadores.

Al analizar en conjunto todos los datos, no se puede concluir que los SNPs estudiados influyeran las PL de forma indirecta al condicionar el  $ABC_{0-12h}$  del MPA en la muestra poblacional estudiada, pero tampoco se puede descartar la hipótesis, ya que el SNP asociado a *UGT1A9* -275 T>A mostró significancia en el  $ABC_{0-12h}$  del MPA, pero al presentar sólo dos pacientes con análisis de PL y siendo cada uno de grupos de análisis distintos (Pre TR, grupo 1 y Post TR, grupo 2) no es posible realizar ningún análisis, por lo que se requiere aumentar las PL en población portadora del SNP y así tener una muestra más robusta para análisis y poder confirmar o rechazar la hipótesis.

Para el SNP asociado a *MRP2* -24 C>T, existía un número importante de pacientes portadores, pero sólo se observó una tendencia en la correlación del polimorfismo con el  $ABC_{0-12h}$  y tampoco se observó una tendencia con las PL, mientras que el SNP *UGT1A9* -2152C>T no se encontró en equilibrio H-W y no presentó una correlación significativa con el  $ABC_{0-12h}$ , por lo que bajo los parámetros determinados en este estudio los genotipos *UGT1A9* -2152C>T y *MRP2* -24 C>T no sirven como marcadores para incluir en el monitoreo de pacientes trasplantados al no presentar significancia en el  $ABC_{0-12h}$  del MPA y por ende en la inmunidad

del paciente. Sin embargo, UGT1A9 -275 T>A influye disminuyendo el  $ABC_{0-12h}$  por lo que resulta un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de ajustar dosis en el paciente portador del alelo mutado (A).

Por parte del estado inmune del paciente, sólo se puede concluir que existe variabilidad y no existe un patrón claro, ya que no se observaron diferencias significativas al comparar las PL y marcadores CD71 y CD25 de los pacientes con  $ABC_{0-12h}$  con pacientes en rango Sub o Supraterapéuticos. En base a esto, para lograr resultados más contundentes es que se requiere agregar marcadores adicionales y así determinar poblaciones específicas de células que participan en la respuesta inmune (como Treg) y por ende en el rechazo, y luego determinar la relación de estas con el  $ABC_{0-12h}$ .

#### **5.4. Limitaciones y proyecciones.**

Nuestro trabajo tiene limitaciones. Las muestras analizadas y el bajo número de pacientes con seguimientos son limitaciones importantes (Figura 6), debido principalmente a muestras rechazadas, pacientes con controles una vez al año, pérdida en el seguimiento de examen, entre otros. Esta situación causó pérdida de seguimiento de los pacientes antes y luego del trasplante y con esto se redujo de forma importante las determinaciones para los posteriores análisis estadísticos. Sin embargo, a favor de estos resultados, es que los análisis se realizaron con muestras frescas (se procesaron dentro de 2 horas posterior a la toma de muestra) y por esto mismo la pérdida de determinaciones, ya que en ningún caso se realizaron determinaciones con muestras refrigeradas, que tal vez hubiesen aumentado el número de determinaciones, pero que restan valor ya que se pierden propiedades al refrigerar (San Segundo y cols, 2019). También destaca, que cuando se formuló este proyecto, la citometría de flujo en el hospital recién se estaba montando, por lo que las primeras PL fueron las pioneras y sirvieron como base para la implementación del examen clínico. Con el correr de los meses se han ido ajustando los protocolos y por esto es que se hace más factible incluir nuevos marcadores y favorecer la realización de nuevos proyectos.

En la actualidad de la investigación científica se está en busca de regímenes farmacológicos que favorezcan la inducción y mantención de células Treg. Por esta razón cobra importancia el

análisis del estado inmune del paciente y no sólo medir parámetros farmacocinéticos, ya que se busca adaptar la dosis de fármacos de acuerdo a las poblaciones celulares que se requieran según el período del trasplante del paciente, prolongando así la supervivencia del injerto y del paciente receptor, de modo que con una base sólida puedan a futuro incorporarse estas herramientas en los protocolos de seguimiento de los pacientes con TR.

## 6. CONCLUSIONES

- Los polimorfismos de tipo SNP UGT1A9 -2152C>T, UGT1A9 -275T>A y MRP2-24C>T están presentes en un 6%, 15% y 43% respectivamente en la población pediátrica atendida en la unidad de Nefrología del HLCM.
- De los polimorfismos estudiados, sólo el SNP UGT1A9 -275T>A presentó una disminución estadísticamente significativa en el  $ABC_{0-12h}$  ( $p=0,03$ ) en los pacientes portadores respecto de los no portadores.
- Existe una diferencia estadísticamente significativa en el efecto inmunosupresor entre pacientes con  $ABC_{0-12h}$  en rango sub y supraterapéuticos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Allison, A. C. (2005). Mechanism of action of mycophenolate mofetil. *Lupus*, 14, s2-8. DOI: 10.1191/0961203305lu2109oa
- Arns, W., Breuer, S., Choudhury, S., Taccard, G., Lee, J., Binder, V., Roettele, J., Schmouder, R. (2005). Enteric-coated mycophenolate sodium delivers bioequivalent MPA exposure compared with mycophenolate mofetil. *Clinical Transplantation*, 19, 199–206. DOI: 10.1111/j.1399-0012.2004.00318.x
- Baldelli, S., Merlini, S., Perico, N., Nicastrì, A., Cortinovis, M., Gotti, E., Remuzzi, G., Cattaneo, D. (2007). C-440T/T-331C polymorphisms in the UGT1A9 gene affect the pharmacokinetics of mycophenolic acid in kidney transplantation. *Pharmacogenomics* 8(9), 1127–1141. DOI: 10.2217/14622416.8.9.1127
- Barten, M.J., van Gelder, T., Gummert, J.F., Boeke, K., Shorthouse, R., Billingham, M.E., Morris, R.E. (2002). Pharmacodynamics of mycophenolate mofetil after heart transplantation: new mechanisms of action and correlations with histologic severity of graft rejection. *American Journal of Transplantation*, 2(8), 719–32. DOI: 10.1034/j.1600-6143.2002.20806.x
- Barten, M.J., Rahmel, A., Boldt, A., Dhein, S., Bittner, H.B., Tarnok, A., Mohr, F.W., Gummert, J.F. (2007). Pharmacodynamic monitoring of the immunosuppressive therapy in patients after heart transplantation: Whole blood flow cytometric analysis of lymphocyte function. *Computers in Biology and Medicine*, 37(10), 1367–1373. DOI: 10.1016/j.compbiomed.2006.11.001
- Böhler, T., Canivet, C., Galvani, S., Therville, N., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., Durand, D., Thomsen, M., Rostaing, L., Kamar, N. (2008). Pharmacodynamic monitoring of the conversion from mycophenolate mofetil to enteric-coated mycophenolate sodium in stable kidney-allograft recipients. *International Immunopharmacology*, 8(5), 769–773. DOI: 10.1016/j.intimp.2008.01.023
- Carretero, M. 2005. Actualidad científica, Medicamentos de vanguardia. Micofenolato de sodio, Nuevo fármaco inmunosupresor. *Offarm*, 24 (7), 95-97.
- Cilião, H.L., Camargo-Godoy, R.B.O., de Souza, M.F., Dos Reis, M.B., Iastrenski, L., Alvares Delfino, V.D., Rogatto, S.R., de Syllos Cólus, I.M. (2017). Association of UGT2B7, UGT1A9, ABCG2, and IL23R polymorphisms with rejection risk in kidney transplant patients. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 80(13-15):661-671. doi: 10.1080/15287394.2017.1286922
- Delucchi A., Ferrario M., Varela M., Cano F., Rodriguez E., Guerrero J.L., Lillo A.M., Wolff E., Godoy J., Buckel E., Gonzalez G., Rodriguez J., Cavada G. Pediatric renal

- transplantation: A single center experience over 14 years. (2006). *Pediatric Transplantation*, 10(2), 193–197. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2005.00423.x
- Delucchi A., Valenzuela M., Ferrario M., Lillo A.M., Guerrero J.L., Rodriguez E., Cano F., Cavada G., Godoy J., Rodriguez J., Gonzalez C.G., Buckel E., Contreras L. (2007). A. *et al.* Early steroid withdrawal in pediatric renal transplant on newer immunosuppressive drugs. *Pediatric Transplantation*, 11(7), 743–748. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2007.00735.x
- Delucchi, A. & MacKenna, C. Latin American registry of pediatric renal transplantation 2004-2008. (2010). *Pediatric Transplantation*, 14(6), 701–708. DOI: 10.1111/j.1399-3046.2010.01331.x
- Dieterlen, M. T., Eberhardt, K., Tarnok, A., Bittner, H. B., Barten, M. J. (2011). Flow Cytometry-Based Pharmacodynamic Monitoring After Organ Transplantation. *Methods in Cell Biology*, 103, 267-284. DOI: 10.1016/B978-0-12-385493-3.00011-5
- Dupuis, R., Yuen, A., Innocenti, F. (2012). The influence of UGT polymorphisms as biomarkers in solid organ transplantation. *Clinica Chimica Acta*, 413(17-18), 1318–1325. DOI: 10.1016/j.cca.2012.01.031
- Elahi, S., Ertelt, J.M., Kinder, J.M., Jiang, T.T., Zhang, X., Xin, L., Chaturvedi, V., Strong, B.S., Qualls, J.E., Steinbrecher, K.A., Kalfa, T.A., Shaaban, A.F, Way, S.S. (2013). Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. *Nature*. 504:158–62. DOI 10.1038/nature12675
- Eyheramendy, S. Martinez, F.I, Manevy, F., Vial, C., Repetto, G.M. (2015). Genetic structure characterization of Chileans reflects historical immigration patterns. *Nature Communications*, 6:6472. DOI: 10.1038/ncomms7472
- Fadel, F.I, Elghoroury, E.A., Elshamaa, M.F., Bazaraa, H.M., Salah, D.M., Kassem, N.M., Ibrahim, M.H., El-Saaed, G.S., Nasr, S.A., Koura, H.M. (2015). Lymphocyte Activation Markers in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *International Journal of Biomedical Science*, 11(3):121-30. PMID: 26508906
- Fernández, P., González, A., Leza, J., Lizasoain, I., Moro, M., Portolés, A., Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. 18ª Edición. Madrid. Editorial Médica Panamericana. (2008).
- Filler, G. (2004). Abbreviated mycophenolic acid AUC from CO, C1, C2, and C4 is preferable in children after renal transplantation on mycophenolate mofetil and tacrolimus therapy. *Transplant International*, 17(3), 120-125. DOI:/10.1111/j.1432-2277.2004.tb00415.x

- Filler, G., Alvarez-Elías, A. C., McIntyre, C., Medeiros, M. (2016). The compelling case for therapeutic drug monitoring of mycophenolate mofetil therapy. *Pediatric Nephrology*, 32, 21–29. DOI: 10.1007/s00467-016-3352-2
- Fukuda, T., Goebel, J., Cox, S., Maseck, D., Zhang, K., Sherbotie, J.R., Ellis, E.N., James, L.P., Ward, R.M., Vinks, A.A. (2012). UGT1A9, UGT2B7, and MRP2 genotypes can predict mycophenolic acid pharmacokinetic variability in pediatric kidney transplant recipients. *Therapeutic Drug Monitoring*, 34(6), 671–9. DOI: 10.1097/FTD.0b013e3182708f84
- He, X., Smeets, R.L., Koenen, H.J., Vink, P.M., Wagenaars, J., Boots, A.M., Joosten, I. (2011). Mycophenolic acid-mediated suppression of human CD4+ T cells: more than mere guanine nucleotide deprivation. *American Journal of Transplantation*, 11(3), 439–449. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03413.x.
- Kagaya, H., Miura, M., Satoh, S., Inoue, K., Saito, M., Inoue, T., Habuchi, T., Suzuki, T. (2008). No pharmacokinetic interactions between mycophenolic acid and tacrolimus in renal transplant recipients. *Journal of Clinical Pharmacy Therapeutic*, 33(2), 193–201. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2008.00906.x
- Kamar, N., Glander, P., Nolting, J., Böhrer, T., Hambach, P., Liefeldt, L., Rostaing, L., Neumayer, H.H., Budde, K. (2009). Pharmacodynamic evaluation of the first dose of mycophenolate mofetil before kidney transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(5), 936–942. DOI: 10.2215/CJN.04860908
- Kang, J. S., Lee, M. H. (2009). Overview of therapeutic drug monitoring. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24(1), 1–10. DOI: 10.3904/kjim.2009.24.1.1
- Krajewska, M., Kościelska-Kasprzak, K., Kamińska, D., Żabińska, M., Myszkowski, M., Gomułkiewicz, A., Dziegiel, P., Klinger, M. (2019). Kidney Transplant Outcome Is Associated with Regulatory T Cell Population and Gene Expression Early after Transplantation. *Journal of Immunology Research*, 7452019, 1–14. DOI: 10.1155/2019/7452019
- Kuypers, D. R., Naesens, M., Vermeire, S., Vanrenterghem, Y. (2005). The impact of uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) gene promoter region single-nucleotide polymorphisms T-275A and C-2152T on early mycophenolic acid dose-interval exposure in de novo renal allograft recipients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(4), 351–361. DOI: 10.1016/j.clpt.2005.06.007
- Laliberté, J., Yee, A., Xiong, Y., Mitchell, B. S. (1998). Effects of Guanine Nucleotide Depletion on Cell Cycle Progression in Human T Lymphocytes. *Blood*, 91(8) 2896–2904. PMID: 9531600

- Lamba, V., Sangkuhl, K., Sanghavi, K., Fish, A., Altman, R.B., Klein, T.E. (2014). PharmGKB summary: mycophenolic acid pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 24(1), 73–79.
- Mazidi, T., Rouini, M.R., Ghahremani, M.H., Dashti-Khavidaki, S., Lessan-Pezeshki, M., lagha Ahmadi, F., Salam-Zadeh, J., Mandegary, A., Gholami, K. (2013). Impact of UGT1A9 Polymorphism on Mycophenolic Acid Pharmacokinetic Parameters in Stable Renal Transplant Patients. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3): 547–556. PMID: 24250661
- Mericq V., Salas P., Pinto V., Cano F., Reyes L., Brown K., Gonzalez M., Michea L., Delgado I., Delucchi A. (2013). Steroid withdrawal in pediatric kidney transplant allows better growth, lipids and body composition: A randomized controlled trial. *Hormone Research in Pediatrics*, 79(2), 88–96. DOI: 10.1159/000347024
- Millan, O., Oppenheimer, F., Brunet, M., Vilardell, J., Rojo, I., Vives, J., Martorell, J. (2000). Assessment of mycophenolic acid-induced immunosuppression: A new approach. *Clinical Chemistry*. 46(9), 1376–1383. PMID: 10973868
- Ministerio de Salud. *Guía Clínica de Insuficiencia Renal Crónica Terminal*. 1st Ed. Santiago: Minsal, 2005.
- Naesens, M., Kuypers, D.R., Verbeke, K., Vanrenterghem, Y. (2006). Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation*, 82(8), 1074-1084. 10.1097/01.tp.0000235533.29300.e7
- Pefaur J., Rosati M., Zehnder C., Toro J., Ortiz A., Elgueta S., Kompatzki A., Espinoza O., Ogrodnik M. (2008). Capítulo IV. Trasplante Renal. *Guías Clínicas: Sociedad Chilena de Trasplante*, 85–256.
- Prémaud, A., Rousseau, A., Johnson, G., Canivet, C., Gandia, P., Muscari, F., Peron, J.M., Rostaing, L., Marquet, P., Kamar, N. (2011). Inhibition of T-cell activation and proliferation by mycophenolic acid in patients awaiting liver transplantation: PK/PD relationships. *Pharmalogical Research*, 63(5), 432-438. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.01.005
- Picard, N., Cresteil, T., Prémaud, A., Marquet, P. (2004). Characterization of a phase 1 metabolite of mycophenolic acid produced by CYP3A4/5. *Therapeutic Drug Monitoring*. 26(6), 600–8. DOI: 10.1097/00007691-200412000-00004
- Provenzani, A., Santeusano, A., Mathis, E., Notarbartolo, M., Labbozzetta, M., Poma, P., Provenzani, A., Polidori, C., Vizzini, G., Polidori, P., D'Alessandro, N. (2013). Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World Journal of Gastroenterology*, 19(48), 9156–9173. DOI: 10.3748/wjg.v19.i48.9156

- Sanchez-Dominguez, C.N., Gallardo-Blanco, H.L., Salinas-Santander, M.A., Ortiz-Lopez, R. (2018). Uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase: Its role in pharmacogenomics and human disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16: 3-11. 10.3892/etm.2018.6184
- Sánchez-Fructuoso A.I., Maestro, M.L., Calvo, N., Viudarreta, M., Pérez-Flores, I., Veganzone, S., De la Orden, V., Ortega, D., Arroyo, M., Barrientos, A. (2009). The Prevalence of Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase 1A9 (UGT1A9) Gene Promoter Region Single-Nucleotide Polymorphisms T-275A and C-2152T and Its Influence on Mycophenolic Acid Pharmacokinetics in Stable Renal Transplant Patients. *Transplantation Proceedings*. 41(6), 2313–2316. DOI: 10.1016/j.transproceed.2009.06.038
- San Segundo, D., Benito, M.J., Fernández-Fresnedo, G., Marín, M.J., Arias, M., López-Hoyos, M. (2007). Células T reguladoras y tolerancia en trasplante: Efecto de la inmunosupresión farmacológica. *Inmunología*, 26(3), 157-168. DOI: 10.1016/S0213-9626(07)70085-9
- San Segundo D., Galván-Espinoza, L.H., Rodrigo, E., Irure, J., Ruiz, J.C., Fernández-Fresnedo, G., Riesco, L., Bada, J., Belmar, L., Lopez-Hoyos, M. (2019). Regulatory T-cell Number in Peripheral Blood at 1 Year Posttransplant as Predictor of Long-term Kidney Graft Survival. *Transplantation Direct*, 5(3), e426. doi: 10.1097/TXD.0000000000000871
- Stepkowski, S. (2000). Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2(4):1-23. DOI: 10.1017/S1462399400001769.
- van Rossum, H. H., de Fijter, J. W., van Pelt, J. (2010). Pharmacodynamic monitoring of calcineurin inhibition therapy: principles, performance, and perspectives. *Therapeutic Drug Monitoring*. 32(1), 3–10 DOI: 10.1097/FTD.0b013e3181c0eeeb
- van Schaik, R.H., van Agteren, M., de Fijter, J.W., Hartmann, A., Schmidt, J., Budde, K., Kuypers, D., Le Meur, Y., van der Werf, M., Mamelok, R., van Gelder, T. (2009). UGT1A9 -275T>A/-2152C>T polymorphisms correlate with low MPA exposure and acute rejection in MMF/tacrolimus-treated kidney transplant patients. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 86(3), 319–327. DOI: 10.1038/clpt.2009.83

## ANEXO 1

Carta de aprobación por el CEISH.



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



### ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

FECHA: 09 de Mayo de 2017.

**PROYECTO: INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS EN ENZIMAS METABOLIZADORAS DEL ÁCIDO MICOFENÓLICO Y SU EFECTO INMUNOSUPRESOR EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES PEDIÁTRICOS DEL HOSPITAL DR. LUIS CALVO MACKENNA**

**INVESTIGADOR RESPONSABLE: SRTA. DOMINIQUE YAÑEZ**

**INSTITUCIÓN: LABORATORIO CLÍNICO BIOQUÍMICA Y URGENCIAS, HOSPITAL DR. LUIS CALVO MACKENNA, SEDE ORIENTE, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.**

Con fecha 09 de Mayo de 2017, 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 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.

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

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada de fecha 08 de Mayo de 2017.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

#### **LUGAR DE REALIZACIÓN DEL ESTUDIO**

- LABORATORIO CLÍNICO BIOQUÍMICA Y URGENCIAS, HOSPITAL DR. LUIS CALVO MACKENNA, SEDE ORIENTE, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD DE CHILE.

---

*Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl*

## ANEXO 2

Consentimiento Informado pacientes en espera de TR.

Nombre Paciente: \_\_\_\_\_  
Rut Paciente: \_\_\_\_\_  
Fecha Nacimiento: \_\_\_\_\_

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES NUEVOS**

#### **TÍTULO DEL PROYECTO**

**Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.**



PATROCINANTE: Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna  
Nombre del Investigador principal: Dominique Yáñez Osorio  
R.U.T.: 17.005.382-6  
Institución: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.  
Teléfonos: 225756004.

#### **Invitación a participar:**

Le estamos invitando a participar a su hija/hijo en un estudio piloto de investigación "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna", debido a que existe un pequeño porcentaje de pacientes que no responde al tratamiento con concentraciones plasmáticas terapéuticas (nivel de fármaco en circulación sanguínea necesario para alcanzar una respuesta óptima) de ácido micofenólico, a pesar de estar recibiendo dosis estándar según los protocolos utilizados por la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Además no existen exámenes que demuestren que el fármaco en uso a pesar de encontrarse a concentraciones plasmáticas terapéuticas genera el efecto deseado en el lugar correspondiente, que para este caso corresponden a los linfocitos T (células del sistema inmune).

#### **Objetivos:**

Esta investigación tiene por objetivos detectar los polimorfismos (mutaciones) asociados al metabolismo del ácido micofenólico, y la respuesta por parte de los linfocitos T a las concentraciones plasmáticas del fármaco.

Debido a que existen algunas mutaciones a nivel de las enzimas que metabolizan el fármaco, que pueden provocar que este se elimine más rápido o por el contrario que se acumule en el sistema, se propone investigar cómo los polimorfismos influyen en las concentraciones de ácido micofenólico y dado que no existen exámenes de rutina para detectar la respuesta final de la población de linfocitos T en los pacientes, se propone realizar ensayos con estas células para evaluar el estado de inmunosupresión.

De esta forma, en un futuro se podría ajustar la dosis antes de iniciar el tratamiento evitando los problemas asociados como el rechazo o la toxicidad. El estudio incluirá a los pacientes nuevos que sean sometidos a trasplante renal y que reciben tratamiento en la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.



09 MAYO 201

**Procedimientos:** Si Ud. acepta que su hija/ hijo participe del estudio será sometido al siguiente procedimiento:

Antes del trasplante, se tomará una muestra de sangre con la que se analizarán las células inmunes.

Luego del trasplante, se tomarán 4 muestra de sangre distribuidas en 4 horas cada una. La primera muestra será de 3 ml antes de la dosis del fármaco y de esta se determinarán el nivel del fármaco, y se realizarán ensayos con las células (linfocitos). Las muestras restantes serán de 2ml, a la hora después de la dosis, a las dos horas después de la dosis y la última muestra a las 4 horas después de la dosis. De estas, podemos determinar tanto los polimorfismos como las concentraciones del fármaco. Es importante que sepa que además se realizarán exámenes de rutina tales como: clearance de creatinina, albúmina, AST, ALT, hemoglobina y niveles plasmáticos de tacrolimus que podrá solicitar el médico tratante y al que tendremos acceso.

El procedimiento tomará 4 horas y sólo se realizará una vez al mes durante 3 meses. Además, la muestra de ADN sobrante, será almacenada durante 5 años para futuras investigaciones sobre otros polimorfismos relacionados al metabolismo o acción de los inmunosupresores.

**Tratamiento propuesto y justificación del uso de placebo:** Usted y su hija/ hijo deberán seguir las indicaciones del médico tratante de la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, quien indicará la dosis correspondiente según los protocolos utilizados.

**Riesgos:**

No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

Cualquier otro efecto que Ud. observe en su hija/ hijo y considera que puede derivarse del uso de del fármaco deberá comunicarlo al médico tratante.

**Costos:** Este estudio piloto no tiene costo alguno para Ud. Y su hija/ hijo.

Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

**Beneficios:** No obtendrá un beneficio directo para ud. y su hija/hijo. Este estudio piloto significará una contribución al conocimiento y una herramienta para obtener mejores tratamientos en futuros pacientes.

**Alternativas:** Si Ud. decide que su hija/hijo no participará en esta investigación recibirá el tratamiento que se aplica habitualmente.

**Beneficios y riesgos de los métodos alternativos existentes:** No aplica

**Compensación:** Ud. y su hija/hijo no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Garantía de seguro:** No aplica.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de la participación de su hija/hijo en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Usos potenciales de los resultados de la investigación, incluyendo los comerciales:** Complementar la terapia actual de monitoreo clínico.

**Información adicional:** Ud. su hija/hijo o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** La participación de su hija/hijo en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

**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:

Investigador: Bq. Dominique Yáñez. Teléfono 225756004.

Autoridad de la Institución: Dr. Jorge Lastra Torres. Teléfono 225755909

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**



09 MAYO 2017



09 MAYO 2017

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hija/hijo o representado participe en el proyecto "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna".

_____ Nombre del sujeto Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador Rut.	_____ Firma	_____ Fecha

**Cuando Corresponda:**

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

**Artículo 28.-** "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ético científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".

ANEXO 3

Consentimiento Informado pacientes post TR.

Nombre Paciente: \_\_\_\_\_  
Rut Paciente: \_\_\_\_\_  
Fecha Nacimiento: \_\_\_\_\_

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.**

PATROCINANTE: Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna  
Nombre del Investigador principal: Dominique Yáñez Osorio  
R.U.T.: 17.005.382-6  
Institución: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.  
Teléfonos: 225756004.

**Invitación a participar:** Le estamos invitando a participar a su hija/hijo en un estudio piloto de investigación "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna", debido a que existe un pequeño porcentaje de pacientes que no responde al tratamiento con concentraciones plasmáticas terapéuticas (nivel de fármaco en circulación sanguínea necesario para alcanzar una respuesta óptima) de ácido micofenólico, a pesar de estar recibiendo dosis estándar según los protocolos utilizados por la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivos detectar los polimorfismos (mutaciones) asociados a una mala respuesta al ácido micofenólico, esto quiere decir, que existen algunas mutaciones a nivel de las enzimas que metabolizan el fármaco, que pueden provocar que este se elimine más rápido o por el contrario que se acumule en el sistema. Por estos motivos, se propone investigar si los pacientes poseen estas mutaciones y cómo influyen en las concentraciones de ácido micofenólico. De esta forma, en un futuro se podría ajustar la dosis antes de iniciar el tratamiento evitando los problemas asociados como el rechazo o la nefrotoxicidad. Para ello se realizará una determinación de los polimorfismos y una medición del fármaco en circulación sanguínea de ácido micofenólico. El estudio incluirá a todos los pacientes que reciben tratamiento en la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

**Procedimientos:** Si Ud. acepta que su hija/ hijo participe del estudio será sometido al siguiente procedimiento:  
Se tomarán 4 Muestras de sangre correspondientes a 2mL cada una. La primera muestra será antes de la dosis del fármaco (ácido micofenólico), la segunda a la hora después de la dosis, la tercera a las dos horas después de la dosis y la última





muestra a las 4 horas después de la dosis. A partir de un solo tubo podemos determinar los polimorfismos y las concentraciones del fármaco. El procedimiento tomará 4 horas y sólo se realizará una vez.

Es importante que sepa que además se realizarán exámenes de rutina tales como: clearance de creatinina, albúmina, AST, ALT, hemoglobina y niveles plasmáticos de tacrolimus que podrá solicitar el médico tratante y al que tendremos acceso. Además, la muestra de ADN sobrante, será almacenada durante 5 años para futuras investigaciones sobre otros polimorfismos relacionados al metabolismo o acción de los inmunosupresores.

**Tratamiento propuesto y justificación del uso de placebo:** Usted y su hija/ hijo deberán seguir las indicaciones del médico tratante de la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, quien indicará la dosis correspondiente según los protocolos utilizados.

**Riesgos:**

No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis. Cualquier otro efecto que Ud. observe en su hija/ hijo y considera que puede derivarse del uso de del fármaco deberá comunicarlo al médico tratante.

**Costos:** Este estudio piloto no tiene costo alguno para Ud. Y su hija/ hijo. Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

**Beneficios:** No obtendrá un beneficio directo para ud. y su hija/hijo. Este estudio piloto significará una contribución al conocimiento y una herramienta para obtener mejores tratamientos en futuros pacientes.

**Alternativas:** Si Ud. decide que su hija/hijo no participará en esta investigación recibirá el tratamiento que se aplica habitualmente.

**Beneficios y riesgos de los métodos alternativos existentes:** No aplica.

**Compensación:** Ud. y su hija/hijo no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

**Garantía de seguro:** No aplica.

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de la participación de su hija/hijo en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye



09 MAYO 201

el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Usos potenciales de los resultados de la investigación, incluyendo los comerciales:** Complementar la terapia actual de monitoreo clínico.

**Información adicional:** Ud. su hija/hijo o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** La participación de su hija/hijo en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habituales de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.

**Complicaciones:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

**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:

Investigador: Bq. Dominique Yáñez. Teléfono 225756004.

Autoridad de la Institución: Dr. Jorge Lastra Torres. Teléfono 225755909

**Otros Derechos del participante**

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que mi hija/hijo o representado participe en el proyecto "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna".



09 MAYO 2011

_____ Nombre del sujeto Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador Rut.	_____ Firma	_____ Fecha

**Cuando Corresponda:**

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

**Artículo 28.-** "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ético científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".

ANEXO 4

Asentimiento Informado pacientes en espera de TR.

Nombre Paciente: \_\_\_\_\_  
Rut Paciente: \_\_\_\_\_  
Fecha Nacimiento: \_\_\_\_\_

**ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES NUEVOS**

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.**

PATROCINANTE: Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna  
Nombre del Investigador principal: Dominique Yáñez Osorio  
R.U.T.: 17.005.382-6  
Institución: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.  
Teléfonos: 225756004.

**Invitación a participar:**

Hola, te invitamos a participar en un estudio piloto de investigación "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna". Puede que el nombre sea algo extraño, pero en simples palabras es debido a que existe un pequeño grupo de pacientes que no responde al tratamiento de ácido micofenólico, a pesar de estar recibiendo dosis según los protocolos utilizados por la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Además no existen exámenes que demuestren que el fármaco en uso genere el efecto deseado.

**Objetivos:**

Esta investigación tiene por objetivos detectar los polimorfismos (mutaciones) asociados al metabolismo del ácido micofenólico, y la respuesta por parte de los linfocitos T a las concentraciones plasmáticas del fármaco.

Debido a que existen algunas mutaciones a nivel de las enzimas que metabolizan el fármaco, que pueden provocar que este se elimine más rápido o por el contrario que se acumule en el sistema, se propone investigar cómo los polimorfismos influyen en las concentraciones de ácido micofenólico y dado que no existen exámenes de rutina para detectar la respuesta final de la población de células T (células del sistema inmune denominadas linfocitos) en los pacientes, se propone realizar ensayos con estas células.

De esta forma, en un futuro se podría ajustar la dosis antes de iniciar el tratamiento evitando los problemas asociados como el rechazo o la toxicidad.

El estudio incluirá a los pacientes nuevos que sean sometidos a trasplante renal y que reciben tratamiento en la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.





El estudio incluirá a los pacientes nuevos que sean sometidos a trasplante renal y que reciben tratamiento en la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

**Procedimientos:** Si tú aceptas participar del estudio se realizará el siguiente procedimiento:

Antes del trasplante, se tomará una muestra de sangre con la que se analizarán tus células inmunes.

Luego del trasplante, se tomarán 4 muestra de sangre distribuidas en 4 horas cada una. La primera muestra será de 3 ml antes de la dosis del fármaco y de esta se determinarán el nivel del fármaco, y se realizarán ensayos con las células (linfocitos). Las muestras restantes serán de 2ml, a la hora después de la dosis, a las dos horas después de la dosis y la última muestra a las 4 horas después de la dosis. De estas, podemos determinar tanto los polimorfismos como las concentraciones del fármaco. Es importante que sepas que además se realizarán exámenes de rutina tales como: clearance de creatinina, albúmina, AST, ALT, hemoglobina y niveles plasmáticos de tacrolimus que podrá solicitar tu médico tratante y al que tendremos acceso.

El procedimiento tomará 4 horas y sólo se realizará una vez al mes durante 3 meses. Además, la muestra de ADN que sobre, será almacenada durante 5 años para futuras investigaciones sobre otros polimorfismos relacionados al metabolismo o acción de los inmunosupresores.

**Tratamiento propuesto y justificación del uso de placebo:** Simplemente deberás seguir las indicaciones de tu médico tratante de la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, quien indicará la dosis correspondiente según los protocolos utilizados.

**Riesgos:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

Cualquier otro efecto que sientas y que consideras que puede derivarse del uso de del fármaco deberás comunicarlo inmediatamente a tu médico tratante.

**Costos:** Este estudio piloto no tiene costo alguno para ti.

Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y tratamiento de su enfermedad.

**Beneficios:** No obtendrás un beneficio directo para ti. Este estudio piloto significará una contribución al conocimiento y una herramienta para obtener mejores tratamientos en futuros pacientes.

**Alternativas:** Si decides no participar de este estudio no pasa nada y nadie se enojará o retará por ello, tampoco va a influir en tu tratamiento habitual.



**Beneficios y riesgos de los métodos alternativos existentes:** No aplica.

**Compensación:** No recibirás ninguna compensación económica por tu participación en el estudio.

**Garantía de seguro:** No aplica.

**Confidencialidad:** No usaremos tu nombre ni datos personales, es decir, nadie más que nosotros sabrá de quien son las muestras. Tampoco le diremos a nadie que estas participando de este estudio.

Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Usos potenciales de los resultados de la investigación, incluyendo los comerciales:** Complementar la terapia actual de monitoreo clínico.

**Información adicional:** Te informaremos a ti, tus padres y a tu médico tratante si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar tu voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Aunque ahora decidas participar, si más adelante no quieres continuar puedes dejarlo cuando tú quieras y nadie se enfadará contigo. De igual manera tu médico tratante o el investigador podrán determinar tu retiro del estudio si consideran que esa decisión va en tu beneficio.

**Complicaciones:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

**Derechos del participante:** Recibirás una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si tienes dudas o consultas sobre tu participación en este estudio puedes comunicarte con la siguiente persona quien resolverá tus dudas:

Investigador: Bq. Dominique Yáñez. Teléfono 225756004.

Autoridad de la Institución: Dr. Jorge Lastra Torres. Teléfono 225755909

**Otros Derechos del participante:** En caso de duda sobre tus derechos debes comunicarte con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**



los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".



09 MAYO 2017

ANEXO 5

Asentimiento Informado pacientes post TR.

Nombre Paciente: \_\_\_\_\_

Rut Paciente: \_\_\_\_\_

Fecha Nacimiento: \_\_\_\_\_

**ASENTIMIENTO INFORMADO**

**TÍTULO DEL PROYECTO**

**Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.**

PATROCINANTE: Laboratorio Clínico del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna  
Nombre del Investigador principal: Dominique Yáñez Osorio  
R.U.T.: 17.005.382-6  
Institución: Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.  
Teléfonos: 225756004.

**Invitación a participar:** Hola, te invitamos a participar en un estudio piloto de investigación "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna". Puede que el nombre sea algo extraño, pero en simples palabras es debido a que existe un pequeño grupo de pacientes que no responde al tratamiento de ácido micofenólico, a pesar de estar recibiendo dosis según los protocolos utilizados por la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivos detectar los polimorfismos (mutaciones) asociados a una mala respuesta al ácido micofenólico, esto quiere decir, que existen algunas mutaciones a nivel de las enzimas que metabolizan el fármaco, que pueden provocar que este se elimine más rápido o por el contrario que se acumule en el sistema. Por estos motivos, se propone investigar si los pacientes poseen estas mutaciones y cómo influyen en las concentraciones de ácido micofenólico. De esta forma, en un futuro se podría ajustar la dosis antes de iniciar el tratamiento evitando los problemas asociados como el rechazo o la nefrotoxicidad. Para ello se realizará una determinación de tus polimorfismos y una medición del fármaco en circulación sanguínea de ácido micofenólico. El estudio incluirá a todos los pacientes que reciben tratamiento en la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna.

**Procedimientos:** Si tú aceptas participar del estudio se realizará el siguiente procedimiento:





Se tomarán 4 Muestras de sangre correspondientes a 2mL cada una. La primera muestra será antes de la dosis del fármaco, la segunda a la hora después de la dosis, la tercera a las dos horas después de la dosis y la última muestra a las 4 horas después de la dosis. A partir de un solo tubo podemos determinar los polimorfismos y las concentraciones del fármaco. El procedimiento tomará 4 horas y sólo se realizará una vez.

Es importante que sepas que además se realizarán exámenes de rutina tales como: clearance de creatinina, albúmina, AST, ALT, hemoglobina y niveles plasmáticos de tacrolimus que podrá solicitar tu médico tratante y al que tendremos acceso. Además, la muestra de ADN que sobre, será almacenada durante 5 años para futuras investigaciones sobre otros polimorfismos relacionados al metabolismo o acción de los inmunosupresores.

**Tratamiento propuesto y justificación del uso de placebo:** Simplemente deberás seguir las indicaciones de tu médico tratante de la unidad de Nefrología del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, quien indicará la dosis correspondiente según los protocolos utilizados.

**Riesgos:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis. Cualquier otro efecto que sientas y que consideras que puede derivarse del uso de del fármaco deberás comunicarlo inmediatamente a tu médico tratante.

**Costos:** Este estudio piloto no tiene costo alguno ti.

**Beneficios:** No obtendrás un beneficio directo para ti. Este estudio piloto significará una contribución al conocimiento y una herramienta para obtener mejores tratamientos en futuros pacientes.

**Alternativas:** Si decides no participar de este estudio no pasa nada y nadie se enojará o retará por ello, tampoco va a influir en tu tratamiento habitual.

**Beneficios y riesgos de los métodos alternativos existentes:** No aplica

**Compensación:** No recibirás ninguna compensación económica por tu participación en el estudio.

**Garantía de seguro:** No aplica.

**Confidencialidad:** No usaremos tu nombre ni datos personales, es decir, nadie más que nosotros sabrá de quien son las muestras. Tampoco le diremos a nadie que estas participando de este estudio.

Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.



**Usos potenciales de los resultados de la investigación, incluyendo los comerciales:** Complementar la terapia actual con el monitoreo clínico.

**Información adicional:** Te informaremos a ti, tus padres y a tu médico tratante si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar tu voluntad de continuar participando en la investigación.

**Voluntariedad:** Aunque ahora decidas participar, si más adelante no quieres continuar puedes dejarlo cuando tú quieras y nadie se enfadará contigo. De igual manera tu médico tratante o el investigador podrán determinar tu retiro del estudio si consideran que esa decisión va en tu beneficio.

**Complicaciones:** No existe riesgo ni complicaciones asociadas a este estudio, ya que no se contemplan cambios de medicamentos ni modificaciones de dosis.

**Derechos del participante:** Recibirás una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Si tienes dudas o consultas sobre tu participación en este estudio puedes comunicarte con la siguiente persona quien resolverá tus dudas:

Investigador: Bq. Dominique Yáñez. Teléfono 225756004.

Autoridad de la Institución: Dr. Jorge Lastra Torres. Teléfono 225755909

**Otros Derechos del participante:** En caso de duda sobre tus derechos debes comunicarte con el Presidente del "Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos", Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 2-978.9536, Email: [comiteceish@med.uchile.cl](mailto:comiteceish@med.uchile.cl), cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile en Av. Independencia 1027, Comuna de Independencia.

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Influencia de los polimorfismos en enzimas metabolizadoras del ácido micofenólico y su efecto inmunosupresor en pacientes trasplantados renales pediátricos del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna".



Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una (✓) en el cuadrado de abajo que dice "Sí quiero participar" y escribe tu nombre.

Sí quiero participar.

Si no quieres participar, no pongas ninguna (✓), ni escribas tu nombre.

_____ Nombre del sujeto Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante Rut.	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador Rut.	_____ Firma	_____ Fecha

**Cuando Corresponda:**

LEY 20.584. REGULA LOS DERECHOS Y DEBERES QUE TIENEN LAS PERSONAS EN RELACIÓN CON ACCIONES VINCULADAS A SU ATENCIÓN EN SALUD.

De los derechos de las personas con discapacidad psíquica o intelectual.

**Artículo 28.-** "Ninguna persona con discapacidad psíquica o intelectual que no pueda expresar su voluntad podrá participar en una investigación científica. En los casos en que se realice investigación científica con participación de personas con discapacidad psíquica o intelectual que tengan la capacidad de manifestar su voluntad y que hayan dado consentimiento informado, además de la evaluación ética científica que corresponda, será necesaria la autorización de la Autoridad Sanitaria competente, además de la manifestación de voluntad expresa de participar tanto de parte del paciente como de su representante legal. En contra de las actuaciones de los prestadores y la Autoridad Sanitaria en relación a investigación científica, podrá presentarse un reclamo a la Comisión Regional indicada en el artículo siguiente que corresponda, a fin de que ésta revise los procedimientos en cuestión".