



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de la relevancia clínica de diversas variantes de los genes *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1*, sobre Ciclosporina y Tacrolimus en Trasplante Hepático

Ana Argudo Ramírez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA E INMUNOLOGÍA

HOSPITAL UNIVERSITARI DE BELLVITGE. LABORATORI CLÍNIC

EVALUACIÓN DE LA RELEVANCIA CLÍNICA DE DIVERSAS VARIANTES DE LOS GENES *CYP3A4*, *CYP3A5* Y *ABCB1* SOBRE CICLOSPORINA Y TACROLIMUS EN TRASPLANTE HEPÁTICO.

Memoria presentada por Ana Argudo Ramírez para optar al grado de doctora por la Universitat de Barcelona.

Directores: Dr. Pedro Alía Ramos*

Dr. José Castellote Alonso**

Tutora: Dra. Teresa Carbonell Camos***

*Jefe de sección del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Laboratori Clínic, Hospital Universitari de Bellvitge.

** Profesor asociado y Facultativo adjunto del Departamento de Hepatología y de la Unidad de Trasplante Hepático, Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitari de Bellvitge.

*** Profesora titular del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universitat de Barcelona.

Doctoranda: Ana Argudo Ramírez

José Castellote Alonso, doctor en Medicina, facultativo especialista en Aparato Digestivo y adjunto del Departamento de Hepatología y de la Unidad de Trasplante Hepático; y Pedro Alía Ramos, doctor en Ciencias Biológicas, facultativo especialista en Bioquímica Clínica y jefe de sección del Área de Bioquímica y Biología Molecular del Laboratori Clínic, del Hospital Universitari de Bellvitge en L'Hospitalet, Barcelona

CERTIFICAN:

Que la tesis “**Evaluación de la relevancia clínica de diversas variantes de los Genes *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1* sobre Ciclosporina y Tacrolimus en Trasplante Hepático**”, de la cual es autora Ana Argudo Ramírez, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge, para optar al grado de doctora por la Universitat de Barcelona y que se encuentra en condiciones de ser defendida ante el tribunal correspondiente.

En L'Hospitalet de Llobregat, 25 Abril de 2016

Dr. José Castellote Alonso

Dr. Pedro Alía Ramos

*A mis padres,
a mis hermanos,
al Marc i a l'Eric.*

Agradecimientos

Al finalizar la realización de esta Tesis Doctoral deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido a que se lleve a cabo este trabajo:

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, Pedro Alía y José Castellote, quienes a pesar de sus otras muchas ocupaciones se comprometieron conmigo para sacar adelante esta tesis doctoral. Además quiero agradecerles su confianza depositada en mí y en este proyecto desde el primer momento, así como su comprensión y paciencia mostradas en cada una de las etapas. También agradecerles su transmisión de conocimientos, y sus consejos y sugerencias, que han sido esenciales para poder desarrollar y acabar esta tesis.

Al Dr. Fabregat, al Dr. Xiol, y a todo el equipo de la Unidad de Trasplante Hepático, por su implicación en esta tesis, y por haber colaborado en la entrega del consentimiento informado a cada paciente. Una mención especial para Raquel Lastra y María Navajas: gracias por la ayuda prestada, pero sobre todo por vuestro tiempo, compañía y siempre fantástico sentido del humor.

A la Dra. Català y a la Dra. Serrano del Servicio de Anatomía Patológica, por su apoyo y colaboración en el suministro del material parafinado. También a Mar Varela y Mónica por instruirme en el manejo del tejido parafinado y por el gran interés mostrado desde el primer momento.

A Pedro Alía, Ariadna Padró, Juanjo y M^a Teresa por enseñármelo todo sobre Biología molecular (¡empezando por mi primera PCR!), a Dolors Dot por abrirme las puertas del maravilloso mundo de los inmunosupresores y presentarme a la fascinante farmacogenética, y a Teresa Casanovas, Jose Castellote y Pablo Ramírez por hacer que me enamore de ese complejo y delicado sistema que supone el paciente trasplantado de hígado.

A mis compañeros residentes Javi, Ruth, Ariadna, M^a Elena, Gemma, Bea, Sofía y Mariona, y a los que para mí, como si también lo fueran, Ari y Chema, les agradezco los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del hospital, las risas, el compañerismo, los viajes, las horas intensivas de trabajo, los congresos, la complicidad, esos momentos que nunca olvidaré y esas fotos que siempre quedarán. En especial quiero dar las gracias a Chema, quien además de amigo, ha participado

en parte de esta tesis: gracias por colaborar con esta tesis, gracias por tu ayuda cada vez que la he necesitado y muchas gracias por tu cariño siempre.

A los que fuisteis compañeros (técnicos, enfermeros y adjuntos) del Laboratori Clínic, quiero daros las gracias por el tiempo invertido en mi formación y mostrarme el camino para ser una buena profesional. A Xavier Fuentes, le agradezco el haberme introducido en el mundo de la redacción de artículos científicos y transmitirme el rigor profesional. A Raül Rigo, su siempre disposición a compartir absolutamente todos sus conocimientos incluso después de los años. A José Valero, Aurora, Macarena, María José y Lourdes gracias por todo lo que me habéis enseñado y, sobre todo, por el cariño con que lo hicisteis.

En especial quiero agradecer a Dolors Dot todo el esfuerzo, dedicación y cariño invertidos en convertirme en la profesional que soy hoy, pero sobre todo, por creer en mí. Gracias por estar siempre ahí.

A Georgia, doctora y experta en estadística del Centro de Regulación Genómica (CRG), le agradezco enormemente su dedicación, esfuerzo e implicación en la recomendación y desarrollo de los modelos estadísticos empleados en este trabajo.

También quiero agradecerles a los que fueron mis compañeros de Althia y a los que son mis compañeros actuales de Toxi: gracias por enseñarme todo desde el primer día, por las risas y momentos compartidos. Ha sido y es una suerte haber tenido la oportunidad de conocerlos, tanto a nivel personal como profesional. Todos y cada uno de vosotros sois especiales, y ha sido y es un lujo haber podido trabajar a vuestro lado. Gracias por preocuparos y apoyarme siempre con este proyecto.

También quiero dar las gracias a Anna Forrellad por ayudarme a encontrar y seguir con ilusión el camino que hoy me ha llevado hasta aquí.

Muchísimas gracias a los pacientes que han participado en esta investigación, a los donantes y a las familias de los donantes, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A mis amigos, los otros pacientes, por apoyarme siempre en cada fase de esta tesis, por vuestra ayuda, por vuestra compañía, por vuestro interés y por vuestra comprensión en mis ausencias, por los grandes y pequeños momentos inolvidables que hemos pasado juntos. Gracias por estar ahí, aun en la distancia, por respetarme, por

quererme y por esperarme, pero sobre todo, gracias por seguir compartiendo los momentos importantes (y los que tampoco lo son tanto!) y por inundarlos de buen comer, buen beber, buen hacer y buen humor. Gracias de todo corazón a Tere, Laura, Migena, Ceci, Agustín, Ana, Alex, Nuri, Pili, Lore, Hele, María, Nieves, Rocío, Jou, Ceci, Andrés, Almu, Jan, Pau, Sergio...A todos.

Gracias a mi familia, que siempre me apoyó y creyó en mí y en la consecución de mis sueños de forma incondicional: a pesar de la distancia hacéis que siempre os sienta cerca. A mis padres por los valores que me han inculcado y por su enorme esfuerzo para que yo tuviera la oportunidad de convertirme en quien soy hoy. A Mariano, por cuidarme, por preocuparse por mí y por sus sabios consejos, incluida aquella conversión que nunca olvidaré en la que descubrimos mi vocación por la ciencia: gracias por abrirme los ojos y ayudarme a comenzar este camino. A Pablo, por su energía, su generosidad, su cariño y su don especial de hacerte sentir que puedes con todo. A mi tío por motivarme profesionalmente como nadie y demostrarme que siempre es posible. A mi tía por darme siempre lo mejor: gracias madrina. A Pepita y Francesc, por su cariño, por cuidarme y quererme como si fuera su propia hija y hacer de Barcelona mi hogar. A todos gracias por quererme, respetar mis decisiones y estar siempre orgullosos de mí.

En especial quiero agradecerle a Marc su compañía y apoyo incondicional en este camino, por su paciencia infinita, por cuidarme con tanto cariño, y por dar luz, ganas y alegría a mis días. Gracias por entenderme y ayudarme a encontrar las fuerzas y la motivación necesarias en los momentos más duros. Gracias por quererme tan bien, caminar a tu lado es crecer siempre. Y por último, pero no por ello menos importante, al terremoto de Eric: gracias por entenderme y esperarme día tras día con la mejor de tus sonrisas como regalo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7
ÍNDICE	11
ABREVIATURAS	15
RESUMEN.....	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. EL TRASPLANTE HEPÁTICO.....	25
1.1.1. Características histológicas y funcionales del hígado.....	25
1.1.2. Concepto e historia del trasplante hepático.....	27
1.1.3. Epidemiología del trasplante hepático.....	28
1.1.4. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante hepático.....	30
1.1.5. Complicaciones en el paciente trasplantado	33
1.1.5.1. Rechazo agudo del injerto.....	34
1.1.5.2. Efectos adversos al tratamiento inmunosupresor	35
1.2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO. INHIBIDORES DE CALCINEURINA.....	37
1.2.1. Características moleculares	38
1.2.2. Farmacocinética.....	40
1.2.3. Farmacodinamia	44
1.3. FARMACOGENÉTICA DE LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA.....	46
1.3.1. Citocromo P450	46
1.3.2. P-glicoproteína.....	47
1.3.3. Variantes genéticas estudiadas por su influencia sobre la farmacocinética y farmacodinamia de ciclosporina y tacrolimus.....	49
1.3.4. Farmacogenética de ciclosporina.....	51
1.3.4.1. Gen <i>CYP3A4</i> : rs2740574 (<i>CYP3A4*1B</i>) y rs35599367 (<i>CYP3A4*22</i>)	51
1.3.4.2. Gen <i>CYP3A5</i> : rs776746 (<i>CYP3A5*3</i>)	52
1.3.4.3. Gen <i>ABCB1</i> : rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A).....	52
1.3.5. Farmacogenética de tacrolimus	54
1.3.5.1. Gen <i>CYP3A5</i> : rs776746 (<i>CYP3A5*3</i>)	54
1.3.5.2. Gen <i>CYP3A4</i> : rs2740574 (<i>CYP3A4*1B</i>) y rs35599367 (<i>CYP3A4*22</i>)	55

1.3.5.3. Gen <i>ABCB1</i> : rs1045642 (c.3435 C>T) y rs2032582 (c.2677 G>T/A)	56
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
3. MATERIAL Y MÉTODOS	63
3.1. SUJETOS A ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS	65
3.2. MAGNITUDES ESTUDIADAS.....	67
3.2.1. Magnitudes relacionadas con el seguimiento del paciente trasplantado	67
3.2.2. Magnitudes relacionadas con el estudio farmacológico.....	68
3.2.3. Propiedades relacionadas con el estudio genético.....	69
3.3. VARIABLES ESTUDIADAS.....	69
3.3.1. Variables farmacocinéticas	69
3.3.1.1. Dosis de fármaco administrada.....	70
3.3.1.2. Concentración del fármaco en sangre	70
3.3.1.3. Concentración de fármaco en sangre relativa a la dosis administrada	71
3.3.2. Variables clínicas	71
3.3.2.1. Incidencia de rechazo agudo.....	71
3.3.2.2. Aparición de efectos adversos	72
3.4. MÉTODOS.....	73
3.4.1. Obtención de la muestra y principios de medida de las magnitudes relacionadas con el seguimiento del paciente trasplantado	73
3.4.2. Obtención de la sangre y principios de medida de las magnitudes farmacológicas.....	75
3.4.3. Obtención del ADN y amplificación por PCR.....	76
3.4.3.1. PCR-RFLP.....	79
3.4.3.2. PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas.....	81
3.4.3.3. Interpretación de resultados de PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas.....	84
3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	85
3.5.1. Prevalencia de las variantes seleccionadas en los receptores y en los donantes de los órganos trasplantados	85
3.5.2. Estudio de las variables farmacocinéticas.....	85
3.5.2.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables farmacocinéticas.....	85

3.5.2.2. Estudio multivariante de medidas repetidas para las variables farmacocinéticas.....	86
3.5.2.3. Efecto de la interacción conjunta de dos polimorfismos sobre las variables farmacocinéticas.....	87
3.5.3. Estudio de las variables clínicas.....	89
3.5.3.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables clínicas.....	89
3.5.3.2. Efecto de la interacción conjunta de dos polimorfismos sobre las variables clínicas.	89
3.5.4. Otros test estadísticos empleados	90
3.6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	90
3.7. DIRECCIONES DE INTERNET	90
4. RESULTADOS	91
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	94
4.2. PREVALENCIA DE LAS VARIANTES SELECCIONADAS EN LOS RECEPTORES Y EN LOS DONANTES DE LOS ÓRGANOS TRASPLANTADOS	96
4.3. VARIABLES ESTUDIADAS.....	99
4.3.1. Variables farmacocinéticas.	99
4.3.1.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables farmacocinéticas.....	99
4.3.1.2. Estudio multivariante de medidas repetidas para las variables farmacocinéticas.....	120
4.3.1.3. Efecto de la interacción de dos polimorfismos sobre las variables farmacocinéticas.....	124
4.3.2. Variables clínicas	136
4.3.2.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables clínicas.....	136
4.3.2.2. Efecto de la interacción de dos polimorfismos sobre las variables clínicas	150
5. DISCUSIÓN	165
5.1. FARMACOGENÉTICA Y TRASPLANTE HEPÁTICO	167
5.2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	168
5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS.....	169

5.3.1.	Prevalencia de las variantes seleccionadas	170
5.3.2.	Influencia de los genes estudiados sobre la farmacocinética y farmacodinamia de Ciclosporina.	171
5.3.2.1.	Gen <i>CYP3A4</i> : rs2740574 (<i>CYP3A4*1B</i>) y rs35599367 (<i>CYP3A4*22</i>)	171
5.3.2.2.	Gen <i>ABCB1</i> (rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A))	174
5.3.3.	Influencia de las variantes estudiadas sobre la farmacocinética y farmacodinamia de Tacrolimus.....	178
5.3.3.1.	Gen <i>CYP3A5</i> : rs776746 (<i>CYP3A5*3</i>)	179
5.3.3.2.	Gen <i>CYP3A4</i> : rs35599367 (<i>CYP3A4*22</i>)	182
5.3.3.3.	Gen <i>ABCB1</i> (rs1045642 y rs2032582).....	183
5.4.	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	190
5.5.	FORTALEZAS	193
6.	CONCLUSIONES	197
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203
8.	ANEXOS	227
ANEXO 1	229

Abreviaturas

A	Adenina
ABCB1	del inglés, <i>ATP-Binding Cassette sub-family B member 1</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina-aminotransferasa
Anti CD-25	del inglés, <i>Anti Cluster of Differentiation 25</i>
AP-1	del inglés, <i>Activators Protein 1 Family</i> ; Familia de activadores de la proteína 1
APC	del inglés, <i>Antigen Presenting Cells</i> ; Células presentadoras de antígeno
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AST	Aspartato-aminotransferasa
ATC	del inglés, <i>Anatomical, Therapeutic, Chemical classification system</i>
ATP	del inglés, <i>Adenosine Triphosphate</i> ; Adenosín trifosfato
AUC	del inglés, Area Under Curve; Área bajo la curva
BCS	del inglés, <i>Biopharmaceutical Classification System</i> ; Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
C	Citosina
C/D	Concentración relativa a la dosis o Ratio concentración dosis
C₀	Concentración pre-dosis o basal en sangre
C₂	Concentración a las dos horas de la administración del fármaco en sangre
CAS	del inglés, <i>Chemical Abstracts Service</i> . Identificación numérica única para compuestos químicos
CBP	Cirrosis biliar primaria
CD4+	el inglés, <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8+	el inglés, <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CEP	Colangitis esclerosante primaria
CMV	Citomegalovirus
CSA	Ciclosporina
CYP	Citocromo P450
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Trifosfodesoxirribonucleótidos
DTE	Donante
E.C.	del inglés, <i>Enzyme commission number</i> . Referencia al modo de clasificación de los enzimas

EDTA-K3	del inglés, <i>Potassium EthyleneDiamineTetraAcetate</i>
EMIT	del inglés, <i>Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique</i>
FAL	Fosfatasa alcalina
FDA	del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
FG	Filtrado glomerular
FKBP1A	del inglés, <i>FK Binding Protein 1A</i> ; Proteína de unión a FK
G	Guanina
GGT	γ -Glutamilttransferasa
GLUC	Glucosa
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	del inglés, <i>Human leukocyte antigen</i> ; Antígeno leucocitario humano
HTA	Hipertensión arterial
ICN	Inhibidores de calcineurina
IDMS	del inglés, <i>Isotope Dilution Mass Spectrometry</i> . Procedimiento de medida de referencia
IFCC	del inglés, <i>International Federation of Clinical Chemistry</i>
IHAG	Insuficiencia hepática aguda grave
IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
INT- γ	Interferón γ
IUPAC	del inglés, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ; Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
JNK	del inglés, <i>c-Jun N Kinase</i> ; Kinasa N-terminal c-Jun
LD	Desequilibrio de ligamiento
LSEC	del inglés, <i>Liver sinusoidal endothelial cell</i> ; Célula endotelial del sinusoides hepático
MAPK	Proteína kinasa activadora de mitógeno
MDR	del inglés, <i>MultiDrug Resistance</i>
MDRD-4	del inglés, <i>Modificación of Diet in Renal Disease</i>
MEIA	del inglés, <i>Microparticle Enzyme Immunoassay</i>
MELD	del inglés, <i>Model for End-stage Liver Disease</i> . Sistema de puntuación para medir la severidad de la enfermedad hepática crónica
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mTOR	del inglés, <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NCBI	del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFAT	del inglés, <i>Nuclear factor of activated T-cells</i> ; Familia de los factores nucleares de los linfocitos T activados

NF-κB	del inglés, <i>Nuclear Factor of light chains κ</i> ; Factor nuclear de cadenas ligeras κ
NIH	del inglés, <i>National Institute of Health</i>
NK	del inglés, <i>Natural Killers</i>
NKT	del inglés, <i>Natural Killers T</i>
NP	No portador
°C	Grados centígrados
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
P	Portador
pb	Pares de bases
PBE	Peritonitis bacteriana espontánea
PBMC	del inglés, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	del inglés, <i>Polymerase chain reaction</i> ; Reacción en cadena de la polimerasa
PD	Farmacodinamia
PK	Farmacocinética
PPIA	del inglés, <i>PeptidylProlyl Isomerase A</i>
Pred	Prednisona
R	Receptor
RA	Rechazo agudo
RC	Rechazo crónico
REC	Receptor
RFLP	del inglés, <i>Restriction fragments length polymorphic</i> ; Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
rs	del inglés, <i>Reference SNP</i> . Numeración característica e individual que representa cada polimorfismo
San	Sangre
SNP	del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Polimorfismo de un solo nucleótido
Srm	Suero
T	Timina
TAC	Tacrolimus
TBIL	Bilirrubina
TDM	del inglés, <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> ; Monitorización terapéutica de fármacos
TGF- β1	del inglés, <i>Transforman Grow Factor β1</i> ; Factor de crecimiento transformante β1
TH	Trasplante Hepático
THO	Trasplante Hepático Ortotópico
TNF- β	del inglés, <i>Tumoral Necrosis Factor β</i> ; Factor de necrosis tumoral β
URF	Unidad relativa de fluorescencia

UTH	Unidad de trasplante hepático
UV	Ultravioleta
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
ΔR	Cambio normalizado de fluorescencia
UI	Unidades internacionales

Resumen

EVALUACIÓN DE LA RELEVANCIA CLÍNICA DE DIVERSAS VARIANTES DE LOS GENES *CYP3A4*, *CYP3A5* Y *ABCB1* SOBRE CICLOSPORINA Y TACROLIMUS EN TRASPLANTE HEPÁTICO.

Ciclosporina y tacrolimus son la base de la terapia inmunosupresora en el trasplante hepático, ya que son fármacos imprescindibles para la prevención del rechazo del órgano trasplantado. Sin embargo, todavía está pendiente de explicar una gran parte de su variabilidad farmacocinética y farmacodinámica. Existen estudios que ponen de manifiesto una relación entre las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de estos fármacos con algunas variantes de genes que codifican para enzimas y proteínas clave relacionadas con su metabolismo y transporte. No obstante, los resultados publicados hasta el momento son controvertidos, cuya inconsistencia general puede estar relacionada con los siguientes factores: variabilidad étnica, pequeño número de pacientes incluidos en los estudios, inespecificidad de los sistemas de medida empleados para la determinación de la concentración de estos fármacos en sangre, variación en el punto del tiempo en el que se obtienen los resultados, e impacto del genotipo del donante.

En el presente trabajo se han estudiado las variantes *CYP3A4*1B* (c.-392A>G), *CYP3A4*22* (c.522-191C>T), *CYP3A5*3* (c.6986A>G), y c.3435C>T y c.2677G>T del gen *ABCB1*. Se ha realizado minimizado las posibles variaciones debidas al diseño del estudio con el fin de ayudar a resolver parte de esta variabilidad y obtener resultados consistentes: incluyendo únicamente pacientes de la misma etnia y con un único inmunosupresor en monoterapia durante los tres primeros meses post-trasplante, realizando todas las medidas de la concentración de los fármacos inmunosupresores en sangre con el mismo sistema de medida, considerando el parámetro “ratio concentración dosis” en el estudio, empleando modelos estadísticos que tienen en cuenta la dependencia de los datos de un mismo individuo en el tiempo e incluyendo el genotipo tanto del receptor como del donante. Además se ha investigado el papel potencial de los genotipos, tanto a nivel individual como en combinación (haplotipos). También se ha evaluado la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos, y se ha estudiado la influencia de dichas variantes genéticas sobre la eficacia clínica (incidencia de rechazo agudo) y sobre la seguridad (incidencia de aparición de los efectos adversos) en el paciente trasplantado hepático.

En nuestra población en estudio, mediante los métodos descritos, se han identificado y/o al menos corroborado algunas observaciones interesantes que merecen estudios más detallados (como la de requerimientos de dosis más altos para los receptores de un injerto portador de la variante *1 del gen *CYP3A5*).

En cuanto a la prevención de acontecimientos adversos, en ciclosporina parece interesante la influencia del alelo *CYP3A4*1B* en receptores sobre la neurotoxicidad, la combinación del alelo *CYP3A4*1B* en donantes con el genotipo 3435CC de *ABCB1* en receptores sobre la hipertensión arterial. En tacrolimus el alelo *CYP3A5*1* en receptores muestra relación con la nefrotoxicidad e hipertensión arterial, el alelo 3435T de *ABCB1* en donantes con la diabetes mellitus y los alelos 2677A/T de *ABCB1* en donantes con la neurotoxicidad. Podrían llevarse a cabo estudios prospectivos para verificar estos hallazgos, y corroborar la repercusión que tiene el conocimiento del genotipo.

En general, se pone de manifiesto la relevancia del genotipo del donante. Aunque éste supone un inconveniente debido a que no puede ser elegido, recomendamos generar un Banco de ADN tanto de los receptores como de los donantes (incluyéndolo en el consentimiento informado) para permitir el acceso fácil y rápido a este tipo de muestras para la realización de futuros estudios farmacogenéticos.

Posibles líneas de futuro serían: realizar este tipo de estudios pero midiendo la concentración de estos fármacos en el interior de los linfocitos; así como investigar la función que desempeña *ABCB1* en linfocitos, en tejido hepático, tejido renal y en barrera hematoencefálica en relación a ciclosporina y tacrolimus, ya que parece tener un papel clave no sólo a nivel del intestino.

Abstract

CLINICAL RELEVANCE EVALUATION OF SEVERAL VARIATIONS OF *CYP3A4*, *CYP3A5* AND *ABCB1* ON CYCLOSPORINE AND TACROLIMUS IN LIVER TRANSPLANT.

Cyclosporine and tacrolimus are the basis for immunosuppressive therapy in liver transplantation: they are essential drugs for organ transplant rejection prevention. However, a large part of its pharmacokinetic and pharmacodynamic variability still needs to be explained. A number of studies show a relation between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these drugs with some variants of genes encoding key enzymes and proteins related to their metabolism and transport. Nevertheless, the results published so far are controversial. Their general inconsistency may be related to the following factors: ethnic variability, small number of patients included in the studies, lack of specificity measuring systems used for concentration determination of these drugs in blood, variation at the point in time where the results are obtained, and impact of donor genotype.

In this work we have studied the following variants: *CYP3A4*1B* (C-392A>G), *CYP3A4*22* (c.522-191C>T), *CYP3A5*3* (c.6986A>G), and c.3435C>T and c.2677G>T from *ABCB1* gene. We have minimized possible variations due to study design in order to help solve part of this variability and obtain consistent results. We have furthermore investigated the potential role of genotypes, both individually and in combination (haplotypes). Moreover, we have evaluated the clinical relevance of the findings, and we have also studied the influence of these genetic variants on clinical efficacy (incidence of acute rejection) and safety (incidence of occurrence of adverse effects) in the liver transplanted patient.

In our study population, by the methods described, we have identified and/or at least confirmed some interesting observations that deserve more detailed studies (such as the requirement of higher doses for recipients of the *CYP3A5*1* carriers graft).

As regards the prevention of adverse events, in cyclosporine seems interesting the influence of *CYP3A4*1B* allele in receptors on neurotoxicity, the combination of *CYP3A4*1B* allele in donors with 3435CC *ABCB1* recipients on hypertension. In tacrolimus the *CYP3A5*1* allele in recipients shows relation to nephrotoxicity and hypertension, the 3435T *ABCB1* allele in donors with diabetes mellitus and 2677A/T alleles of *ABCB1* donors with neurotoxicity. Prospective studies could be conducted to

verify these findings and corroborate the impact of the genotype knowledge. In general, it shows up the relevance of the donor genotype.

1. Introducción

1.1. EL TRASPLANTE HEPÁTICO

El trasplante es uno de los grandes logros de la medicina del siglo XX, que se ha incorporado a la rutina terapéutica en un número cada vez mayor de centros en casi todos los países desarrollados. El amplio desarrollo de esta metodología, en la que células, tejidos u órganos (injerto) de un individuo (donante), se introducen en un individuo diferente (receptor), ha sido posible gracias a una selección cada vez más rigurosa de los receptores, a una mejor técnica quirúrgica y anestésica, a mejores cuidados postoperatorios, a la aparición de potentes inmunosupresores y a los avances de la bioquímica, de la biología molecular, de la inmunología, de la farmacoterapia, y más recientemente, de la farmacogenética.

1.1.1. Características histológicas y funcionales del hígado

El hígado tiene una gran actividad metabólica y ejerce una importante acción reguladora sobre el metabolismo general; actúa como glándula exocrina, produciendo la bilis que es liberada en el intestino delgado y, como glándula endocrina, sintetizando gran variedad de sustancias (proteínas plasmáticas, colesterol, hormonas, vitaminas, etc.) que se vierten directamente al torrente circulatorio. Además, es capaz de regular la concentración de glucosa y aminoácidos en sangre y almacenar sustancias como el hierro para regular el metabolismo de la hemoglobina. Por otro lado, se encarga de inactivar productos tóxicos procedentes del intestino o de la circulación general degradándolos por oxidación e hidroxilación, como sería el caso de los fármacos inmunosupresores.

El hígado se localiza en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, actuando como intermediario entre el tracto intestinal y la circulación sistémica. Recibe sangre procedente de dos vías: de la vena porta donde se recolecta sangre proveniente del intestino, rica en nutrientes, antígenos alimentarios, productos bacterianos, toxinas ambientales, etc.; y de la arteria hepática, desde donde entra sangre oxigenada. La sangre de ambos orígenes se mezcla en los sinusoides hepáticos y se filtra desde el espacio porta hasta la vena central que abandona el hígado, pasando durante este proceso por una estructura laminar formada por hepatocitos; esta organización maximiza el intercambio de moléculas entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos (Figura 1). Los sinusoides tienen un revestimiento fenestrado constituido por células endoteliales del sinusoides hepático, lo que permite que células localizadas en el

espacio sinusoidal entren en contacto directo con el tejido conectivo subyacente y los hepatocitos. La sangre, el plasma, los linfocitos y las células dendríticas atraviesan el sinusoides hacia el espacio subendotelial conocido como espacio de Disse, y desde este espacio los linfocitos drenan a los vasos linfáticos situados en el espacio porta para dirigirse a los nódulos linfáticos (1).

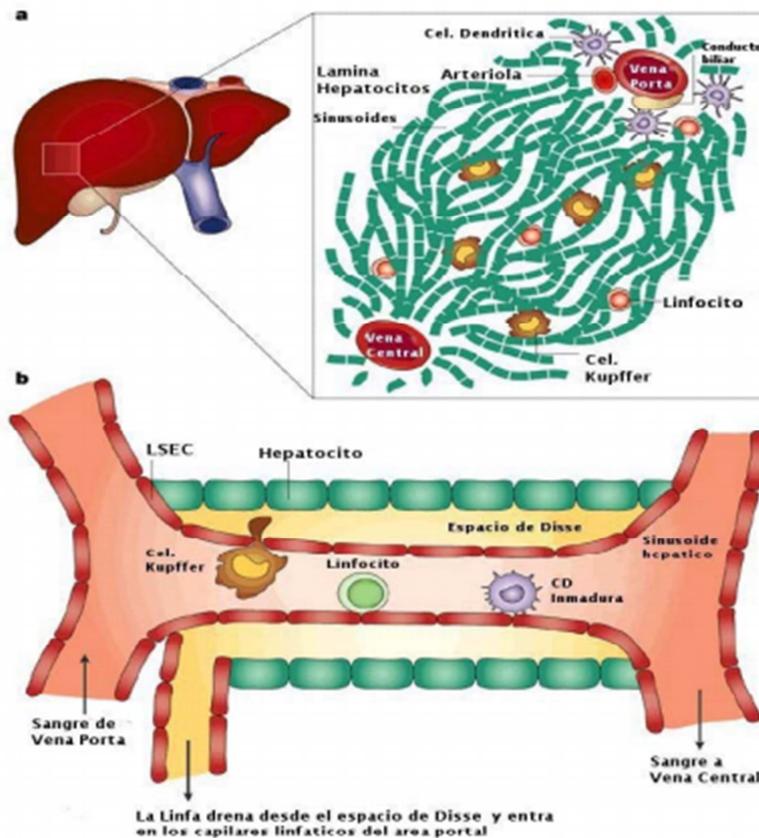


Figura 1. Microambiente hepático. a) Estructura de un lobulillo hepático. El lobulillo está constituido por una rama de la vena porta, una arteriola y un conducto biliar. Desde la vena porta, la sangre fluye hacia la vena central a lo largo de los sinusoides hepáticos. Los sinusoides contienen una población de macrófagos conocidos como células de Kupffer. b) Organización de los sinusoides. Los sinusoides están delimitados por un endotelio fenestrado formado por células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC). Las células de Kupffer, los linfocitos y las células Dendríticas inmaduras se localizan en los sinusoides. El espacio sub-endotelial se conoce como espacio de Disse y es por donde los linfocitos salen a los vasos linfáticos. (Modificado de Nat Rev Immunol. 2003. 3(1):51-62.)

Además de las células hepáticas, el hígado contiene una serie de poblaciones celulares con gran interés desde el punto de vista inmunológico: las células de Kupffer, las células dendríticas y la población de linfocitos residentes. Las células de Kupffer son macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica y se localizan

fundamentalmente en los sinusoides aunque pueden desplazarse hacia el espacio de Disse y entrar en contacto con los hepatocitos. Se encargan de fagocitar células apoptóticas y microorganismos. Aunque se ha observado que son capaces de actuar como células presentadoras de antígeno (APCs) e interaccionar de forma efectiva con los linfocitos T, también parece que pueden ejercer un papel importante en la inducción de tolerancia a ciertos antígenos. Las células dendríticas tienen como función la presentación de antígenos, y se han relacionado con el desarrollo de tolerancia frente a ciertos antígenos. La población de linfocitos intrahepáticos está constituida fundamentalmente por linfocitos CD8+ (T citotóxicos, Tc), además de linfocitos CD4+ (T colaboradores o *helper*, Th), células NK (*Natural Killers*) y NKT (*Natural Killers T*) que se encuentran en mayor número que en otros tejidos linfoides. (2,3).

1.1.2. Concepto e historia del trasplante hepático

El primer trasplante hepático humano lo realizó el doctor Thomas E. Starlz en 1963 en Denver (Estados Unidos) (4), pero fue en 1967 cuando se consiguió que un paciente trasplantado de hígado tuviera una supervivencia a largo plazo (5). Posteriormente hubo que esperar hasta el inicio de la década de los ochenta para que, una vez superadas las barreras técnicas, se hiciera frente a las barreras inmunológicas: la introducción del fármaco inmunosupresor ciclosporina (CSA) en la práctica clínica permitiría una mejoría significativa de los resultados (6).

En 1983, durante la *Consensus Development Conference* organizada por el *National Institute of Health* (NIH) en Bethesda, se consideró que el trasplante hepático (TH) había dejado de ser un hecho experimental para convertirse en una realidad clínica, aceptándose como el tratamiento de elección para muchas hepatopatías irreversibles, al conseguir una supervivencia al año superior al 70% (7). Este cambio se debió a múltiples factores, entre los que hay que destacar la introducción en la práctica clínica del fármaco inmunosupresor ciclosporina A, el avance de las técnicas quirúrgicas y anestésicas (con mención especial a la bomba de bypass venovenoso, que permitió trasplantar con seguridad a pacientes que no toleraban el clampaje de la vena cava inferior durante la fase anhepática), y un mejor conocimiento de la historia natural de las enfermedades hepáticas que permite elegir el momento más adecuado para realizar el trasplante hepático (ni demasiado pronto, cuando el paciente puede

sobrevivir varios años con su hepatopatía crónica estabilizada, ni demasiado tarde, cuando el paciente ha desarrollado un grado de afectación extrahepática tan importante que llega a suponer un riesgo quirúrgico inaceptable) (8).

En España, el primer trasplante hepático lo realizaron en Hospitalet de Llobregat (Barcelona) los cirujanos Eduardo Jaurrieta y Carles Margarit, el 24 de febrero de 1984 en el Hospital Universitari de Bellvitge (9). Desde entonces el número anual de trasplantes hepáticos realizados ha aumentado progresivamente (10).

En la actualidad, el paciente necesita un delicado, largo y minucioso seguimiento hospitalario tras el trasplante. Para ello, surgen nuevas herramientas para el clínico, cirujano y/o hepatólogo, como son las biopsias del hígado trasplantado, la monitorización del tratamiento inmunosupresor, el diagnóstico y tratamiento de infecciones en pacientes inmunodeprimidos, y más recientemente, el estudio farmacogénico de los fármacos inmunosupresores en los pacientes.

1.1.3. Epidemiología del trasplante hepático

El trasplante hepático es el tratamiento de elección en la insuficiencia hepática aguda o crónica irreversible de diferentes etiologías, consiguiendo en la actualidad, supervivencias en el primer año superiores al 80% en la mayoría de los centros con experiencia (11). Además, el trasplante hepático proporciona una calidad de vida mejor que la previa en un porcentaje elevado de pacientes (12,13).

El trasplante hepático ortotópico consiste en la extirpación de un hígado enfermo y su sustitución, en la misma localización anatómica, por un hígado sano, procedente de un donante cadáver o vivo. Se trata de un procedimiento medicoquirúrgico complejo y sofisticado que precisa de una amplia implicación multidisciplinar en un centro médico avanzado (14).

Hoy en día, no sólo es una de las alternativas terapéuticas plenamente consolidadas, sino que además se está convirtiendo en uno de los principales tipos de trasplante que se realizan en el mundo, y de forma especial en nuestro país. Según datos del Registro Mundial de Trasplante desarrollado por la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, cada año se realizan en el mundo más de 22.500 trasplantes hepáticos, lo que hace que la actividad de los equipos españoles de trasplante hepático suponga el 4,5% de la

actividad en el mundo, hecho de gran relevancia teniendo en cuenta que la población española representa apenas el 0,7% de la población mundial (15). La actividad global de todos los centros desde el inicio de este tratamiento en España se presenta en la Figura 2.

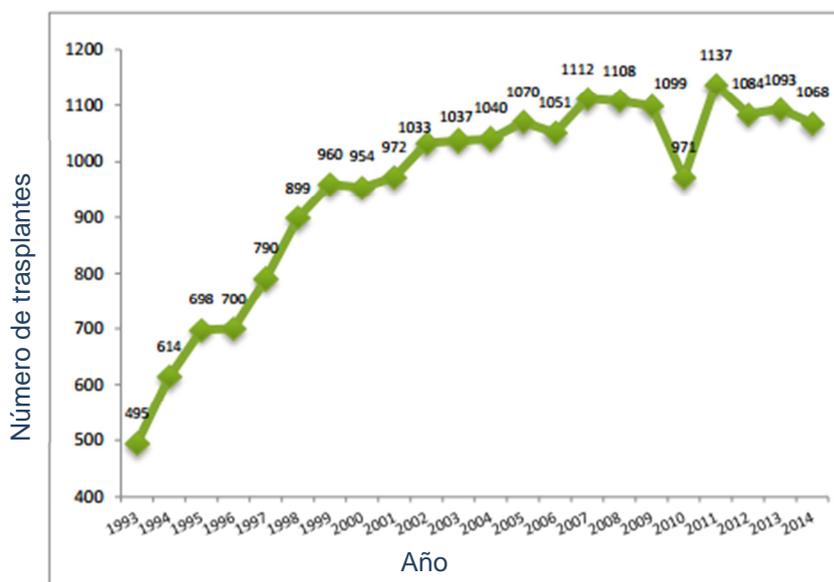


Figura 2. Actividad en trasplante hepático en España. Periodo 1993-2014. (Modificado de ONT (15)).

En el año 2014 hubo en España 1682 donantes de órganos. Esta actividad de donación (sumada a la procedente de donantes vivos) permitió la realización de un total de 4360 trasplantes de órganos sólidos, de los que 1068 fueron trasplantes hepáticos (15). Esto supone una tasa de 22,8 trasplantes por millón de habitantes, lo que sitúa a España entre las máximas registradas a nivel internacional junto con Portugal (22,7), Bélgica (26,3), o USA (20,2), según los datos del año 2013 (aún no hay datos internacionales de 2014) (15).

De los 1.682 donantes que hubo en España durante 2014, 1405 (83,3%) fueron aceptados como donantes hepáticos, de los cuales la causa más frecuente de muerte fue el accidente cerebrovascular (en el 71,2% de los casos) con predominio del sexo masculino (54,1%). La edad media en donantes adultos se ha ido incrementando durante los últimos años, situándose en 60,9 años. (15).

El total de pacientes adultos que en 2014 estuvieron en lista de espera fue de 2031.

El diagnóstico de los pacientes adultos trasplantados, se muestra en la Figura 3, donde la indicación más frecuente fue por cirrosis hepática no biliar (59,7%) seguida por tumores, retrasplante crónico y colestasis crónica con un 18,7%, 5,0% y 3,6% respectivamente.

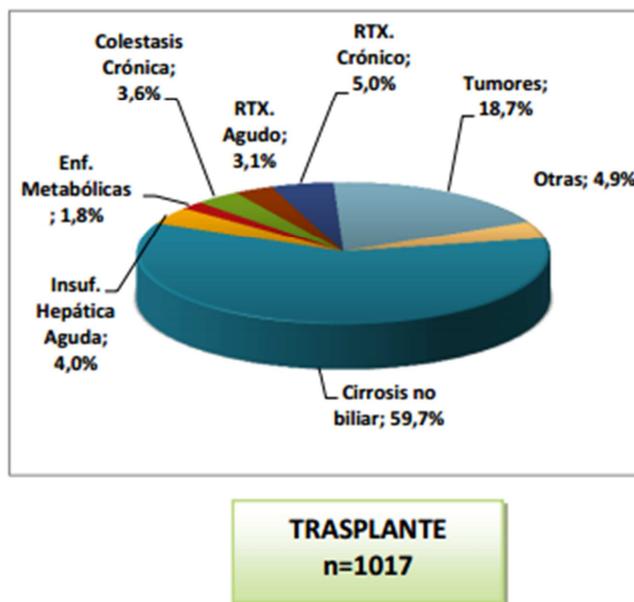


Figura 3. Indicación de trasplante hepático en adultos. España, 2014. (Modificado de ONT (15)).

1.1.4. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante hepático

El trasplante hepático está indicado en las enfermedades hepáticas progresivas en las que no son posibles otras medidas terapéuticas y en las que la supervivencia esperada al año es inferior a la que se conseguiría con el trasplante (16,17). El desequilibrio entre la oferta y la demanda hace necesaria una selección cuidadosa de los candidatos a este procedimiento. Por un lado, el trasplante se debe evitar en pacientes con hepatopatía demasiado estable en los que la expectativa de vida sin trasplante sea superior a la esperable con el TH. Por otro lado, el TH debe evitarse en pacientes con contraindicaciones que limiten de forma significativa la supervivencia post-trasplante.

En la Tabla 1 se resumen las principales enfermedades hepáticas susceptibles de ser tratadas con TH.

Tabla1. Indicaciones del trasplante hepático en el adulto.

A. Indicaciones comunes
<p>1. Cirrosis hepática</p> <ul style="list-style-type: none"> - Viral (VHB, VHC) - Etílica - Autoinmune - Criptogénica
<p>2. Hepatopatías colestásicas crónicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cirrosis biliar primaria (CBP) - Colangitis esclerosante primaria (CEP) - Cirrosis biliar secundaria
<p>3. Carcinoma hepatocelular</p>
<p>4. Insuficiencia hepática aguda grave (fallo hepático fulminante)</p>
B. Indicaciones inusuales
<p>1. Enfermedades hereditarias y metabólicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hemocromatosis hereditaria - Enfermedad de Wilson - Déficit de α-1-antitripsina - Esteatohepatitis no alcohólica - Polineuropatía amiloidótica familiar - Enfermedad de Caroli - Enfermedad por depósito de colágeno tipo 1 - Fibrosis quística (mucoviscidosis) - Enfermedad poliquística - Hiperoxaluria primaria - Protoporfiria
<p>2. Tumores hepáticos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Primarios: hepatocarcinoma, carcinoma hepatocelular fibrolamelar, hemangioendotelioma - Metástasis de tumores neuroendocrinos
<p>3. Enfermedades vasculares hepáticas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Síndrome de Budd-Chiari - Enfermedad veno-oclusiva hepática
<p>4. Otros</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cirrosis biliar secundaria - Retrasplante - Miscelánea

Tabla 1. Indicaciones del trasplante hepático en el adulto. VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C. (Modificado de Trasplante Hepático. Ed. Elsevier J Berenguer, P Parrilla).

En general, se recomienda realizar trasplante hepático en aquellos pacientes en los que se prevea una posibilidad de supervivencia en el TH menor o igual al 90% al año (lo que sucede cuando el índice MELD es inferior a 15), aunque existen excepciones en circunstancias especiales. El sistema MELD (*Model for End-stage Liver Disease*) (19,20) es el más utilizado en España para la evaluación de la supervivencia de los pacientes con hepatopatías crónicas terminales.

Tabla 2. Contraindicaciones del trasplante hepático.

Absolutas
<ul style="list-style-type: none"> - Sida - Enfermedad cardiaca, pulmonar o neurológica grave - Tumores extrahepáticos no controlados o enfermedad metastásica - Infección sistémica grave no controlada en el momento del TH - Adicción activa a drogas o alcohol - Problemas sociales o psiquiátricos graves - Hemangiosarcoma - Trombosis extensa eje esplenomesentérico - Edema cerebral grave o fallo multiorgánico en la IHAG - Hepatocarcinomas > criterios de Milán
Relativas
<ul style="list-style-type: none"> - Infección por VIH - Edad > 70 años - Replicación activa del VHB - Insuficiencia renal crónica - PBE o colangitis tratadas en menos de 48 horas - Colangiocarcinoma

Tabla 2. Contraindicaciones del trasplante hepático. IHAG: insuficiencia hepática aguda grave; PBE: peritonitis bacteriana espontánea; TH: trasplante hepático; VHB: virus de la hepatitis B; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana. (Modificado de Trasplante Hepático. Ed. Elsevier J Berenguer, P Parrilla).

Dado que el desequilibrio entre la oferta y la demanda de hígados para donación es cada vez más acusado, es imprescindible que los pacientes que necesitan un TH sean valorados exhaustivamente con el fin de detectar cualquier situación que pueda condicionar una mala evolución del paciente, con la consiguiente pérdida del injerto. En la tabla 2 se muestran las contraindicaciones del TH; para las contraindicaciones

absolutas (circunstancia que hace el TH técnicamente imposible o condiciona una mala supervivencia independientemente de la realización del TH), existe un consenso general; para las contraindicaciones relativas (por sí solas no influyen en los resultados del TH, sin embargo si se suman varias de ellas pueden comprometer el éxito del trasplante, constituyendo entonces una contraindicación absoluta), no existe uniformidad en todos los centros hospitalarios.

1.1.5. Complicaciones en el paciente trasplantado

La calidad de la función inicial del injerto es muy importante y determinante en el futuro clínico del paciente y, por tanto, su valoración, así como la identificación y la corrección de las complicaciones inmediatas, son de gran interés clínico (21).

Tabla 3. Complicaciones más frecuentes en el TH.

Complicaciones en el postoperatorio inmediato
<ul style="list-style-type: none"> • Complicaciones quirúrgicas <ul style="list-style-type: none"> - Fallo primario del injerto - Hemorragia postoperatoria - Complicaciones vasculares - Complicaciones biliares • Rechazo agudo • Complicaciones neurológicas • Insuficiencia renal • Complicaciones respiratorias y cardiovasculares • Complicaciones infecciosas
Complicaciones a largo plazo
<ul style="list-style-type: none"> • Rechazo crónico • Complicaciones metabólicas • Complicaciones infecciosas • Complicaciones óseas • Tumores <i>de novo</i> • Recidiva de la enfermedad de base: hepatocarcinomas o la enfermedad que produjo la cirrosis inicial

Tabla 3. Complicaciones más frecuentes en el trasplante hepático en el adulto. (Modificado de Trasplante Hepático. Ed. Elsevier J Berenguer, P Parrilla).

Habitualmente, si no hay complicaciones, el paciente puede ser dado de alta tras un período de entre 7 y 12 días de estancia hospitalaria, después de estabilizar la concentración de inmunosupresor/es en sangre, tener una función renal normalizada, en franca mejoría o estable, una función hepática estable, coagulación normalizada, no requerir tener canalizada ninguna vía venosa permanente y no presentar un cuadro infeccioso que obligue a tratamiento hospitalario. Posteriormente, las visitas son periódicas pero cada vez más distanciadas.

En la tabla 3 se muestran las complicaciones más frecuentes, atendiendo a si aparecen en el postoperatorio inmediato (hasta 3 meses post-trasplante) o a largo plazo (a partir del tercer mes post-trasplante).

Algunas de estas complicaciones están directamente relacionadas con el uso de los fármacos inmunosupresores, y se comentarán con más detalle a continuación, junto con el rechazo agudo del injerto, ya que son las variables clínicas que se estudiarán en el presente trabajo.

1.1.5.1. Rechazo agudo del injerto

El rechazo agudo (RA) es una complicación médica que puede condicionar la supervivencia del injerto a corto y largo plazo. El RA representa el ataque inmune mediado por linfocitos T (CD4+ y CD8+) frente a los antígenos HLA de las células del injerto y ocurre fundamentalmente a partir de los 3-4 primeros días post-trasplante, con el pico de mayor incidencia dentro de los tres primeros meses (22-24).

El término agudo no hace referencia al tiempo de aparición (en contraposición al crónico (RC)) sino a las características de los hallazgos histopatológicos y a su reversibilidad tras el tratamiento administrado (25). Se ha recomendado la utilización más adecuada del término rechazo celular (por la significativa infiltración linfocitaria del espacio porta) en lugar de agudo y de rechazo ductopénico para el rechazo crónico (26). Sin embargo, los términos RA y RC se han mantenido por el uso y son los que se emplean habitualmente al referirse a estos procesos en la literatura médica. El RA actualmente no constituye un problema serio habitual en el seguimiento del paciente con trasplante hepático, ya que cada vez hay menor incidencia y la respuesta al tratamiento es mejor (27-29).

Los factores que pueden estar influyendo en la baja frecuencia de RA y RC son el mejor control de las concentraciones en sangre de los fármacos inmunosupresores, el uso de nuevos y más potentes inmunosupresores (30-32), el control de la infección por citomegalovirus (CMV), la mejora de la preservación de injerto con la solución de Wisconsin y la mayor experiencia de los patólogos en la interpretación de las biopsias hepáticas.

Las manifestaciones clínicas del rechazo agudo/reversible son inespecíficas (ictericia, fiebre o malestar general) e incluso puede ser asintomático. Las alteraciones de las magnitudes bioquímicas relacionadas con la función hepática se interpretan como predominantemente líticas (aumentos de AST y ALT), colestásicas (bilirrubina, FA, GGT) o mixtas, que es lo más habitual. Estas alteraciones son inespecíficas, y debe hacerse el diagnóstico diferencial. Sólo la biopsia hepática confirma la sospecha clínico-bioquímica de RA (27) y descarta el resto de posibles causas.

Clásicamente, el primer paso en el tratamiento del RA consiste en la utilización de esteroides a altas dosis (33,34) seguida de una pauta de descenso rápida (3-4 días) hasta la dosis de mantenimiento.

1.1.5.2. Efectos adversos al tratamiento inmunosupresor

Nefrotoxicidad

Se presenta en un porcentaje variable de pacientes y está asociada a la concentración sanguínea elevada tanto de ciclosporina como de tacrolimus (TAC), no obstante puede producirse por otros factores. Es reversible, y generalmente la función renal se normaliza al reducir la concentración sanguínea de los estos fármacos (35).

La disfunción aguda por los inhibidores de calcineurina está causada por la existencia de vasoconstricción de la arteriola aferente, en la que además está implicado el sistema renina-angiotensina y la endotelina, de forma que el mantenimiento de este fenómeno con el tiempo probablemente conduce a las características lesiones de la nefropatía crónica (36-39).

Neurotoxicidad

La neurotoxicidad es uno de los efectos adversos asociados al tratamiento con ciclosporina y tacrolimus. Presenta una incidencia entre el 10-28% (40). La toxicidad

nerológica es en general leve, predominando el temblor. Los síntomas graves como convulsiones, hemiparesias, disfagias, afasias motoras y expresivas, síntomas cerebrales orgánicos y trastornos de la atención, ideación, orientación, memoria reciente y actividad psicomotriz son excepcionales en los pacientes trasplantados hepáticos, siendo dosis dependientes, y mejorando al disminuir la dosis de inmunosupresor.

El transporte de ciclosporina y tacrolimus hacia el cerebro depende del transporte activo del fármaco a través de la barrera hematoencefálica que está mediado por la P-glicoproteína (41). En condiciones normales la P-glicoproteína bombea el fármaco fuera del cerebro para impedir su acumulación, reduciendo la neurotoxicidad.

Hipertensión arterial

Se presenta en el 70-90% (42) de los pacientes, no obstante no sólo está provocada por los inhibidores de la calcineurina (ICN), sino que es multifactorial.

La toxicidad está relacionada con el efecto vasoconstrictor de ciclosporina y tacrolimus sobre la arteriola aferente, con la consecuente retención de sodio, aumento del volumen intravascular y supresión de renina. Se han implicado en estos mecanismos la alteración de las prostaglandinas, la síntesis de tromboxano, el aumento de la endotelina 1, la disminución de ácido nítrico, la activación del sistema simpático y el incremento de receptores de la angiotensina II. La incidencia es menor en relación con tacrolimus que con ciclosporina (43).

Diabetes *mellitus de novo*

La diabetes *mellitus de novo* post-trasplante presenta una incidencia en torno al 30% (44) y aumenta el riesgo de complicaciones cardiovasculares e infecciosas, empeorando la supervivencia del injerto y del paciente.

La influencia de los ICN se debe a su efecto inhibitor de la secreción de insulina e inductor de la resistencia periférica a ésta. Tacrolimus es más diabetógeno que ciclosporina (45).

Recidiva por VHC

La recidiva de la infección por VHC en el trasplantado hepático desafortunadamente es universal, es decir, la mayoría de los pacientes a lo largo del tiempo presentan una recidiva de la enfermedad, presentando además daño histológico en un alto porcentaje de casos (46).

Aunque es difícil conocer el efecto específico de cada inmunosupresor en la viremia, la inmunosupresión se ha correlacionado con el grado de fibrosis, el cual está en íntima relación con la supervivencia. En relación a los ICN, en la mayoría de estudios no se encuentran diferencias en términos de evolución de la recidiva por el hecho de ser tratados con ciclosporina o tacrolimus (47).

1.2. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO. INHIBIDORES DE CALCINEURINA

El objetivo de administrar fármacos inmunosupresores en el paciente trasplantado es evitar el rechazo (agudo o crónico) del órgano trasplantado. La inmunosupresión lleva siempre asociado un cierto riesgo para el receptor, ya que afecta a la capacidad de defensa de éste frente a las infecciones y al desarrollo de tumores (entre otros). Por esto, una de las claves que hacen que un trasplante sea exitoso es una correcta modulación de la inmunosupresión, de modo que se mantenga un equilibrio entre el riesgo de aparición de rechazo y la aparición de efectos adversos. La inmunosupresión debe adaptarse a las distintas fases post-trasplante. Así, en la fase inicial o de inducción, donde la capacidad de respuesta del receptor es máxima, las dosis requeridas de los diferentes inmunosupresores son también máximas. Una de las opciones, en cuanto a régimen inmunosupresor en esta fase, es la doble terapia con un inhibidor de calcineurina y esteroides. Una vez superadas las primeras semanas, disminuye la inmunorreactividad y se utilizan regímenes de inmunosupresión de mantenimiento, pudiéndose entonces disminuir las dosis de inmunosupresores al mínimo necesario, habitualmente a partir del tercer mes. El problema está en establecer cuál es la dosis mínima necesaria para cada individuo. Un punto muy importante a tener en cuenta son los efectos secundarios de los distintos inmunosupresores, los cuales se deben valorar en el momento de elegir el mejor inmunosupresor para un receptor determinado.

1.2.1. Características moleculares

Ciclosporina (ciclosporina A) y tacrolimus (FK506) son la base de la terapia inmunosupresora que se utiliza en el trasplante de órganos sólidos para prevenir y tratar el rechazo del aloinjerto en el receptor. Aunque posteriormente hayan aparecido otros fármacos inmunosupresores como los mTOR, en general, estos no suelen usarse durante los primeros meses post-trasplante. El descubrimiento de ciclosporina en el año 1970, y su aceptación como tratamiento inmunosupresor a principios de 1980 supuso una mejora radical en la supervivencia de los pacientes trasplantados.

En el año 1994, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó tacrolimus como una alternativa eficaz a la ciclosporina (48). Desde entonces, ciclosporina y tacrolimus se han convertido en los principales fármacos inmunosupresores en el trasplante de órganos sólidos. Ambos fármacos están indicados como terapia inmunosupresora en el trasplante de riñón, de hígado, de intestino, de pulmón y de corazón (49); además también pueden ser utilizados en casos de enfermedad autoinmune severa, tal como la dermatitis atópica (50,51), la artritis reumatoide (52,53) y la hepatitis autoinmune (103,104).

Ciclosporina y tacrolimus difieren en su estructura química: ciclosporina es un endecapéptido cíclico (54), mientras que tacrolimus es una lactona macrocíclica (55) (Figuras 4 y 5).

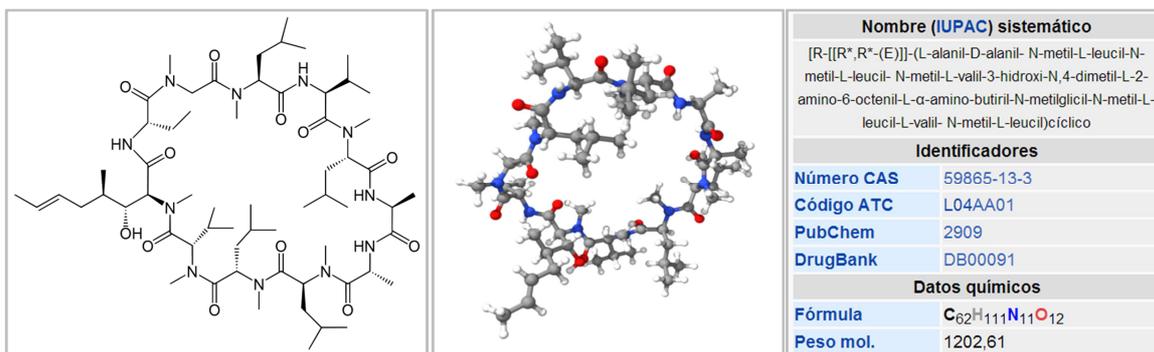


Figura 4. Estructura química Ciclosporina
(Modificado de <<http://es.wikipedia.org/wiki/Ciclosporina>>)

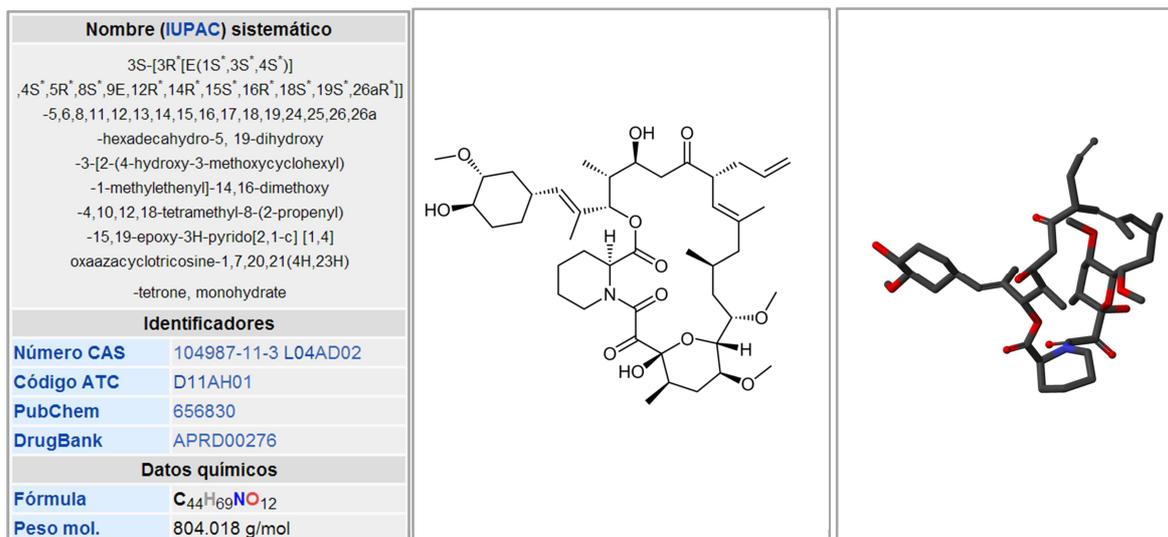


Figura 5. Estructura química Tacrolimus. (Modificado de <<http://es.wikipedia.org/wiki/Tacrolimus>>)

Sin embargo, ambos fármacos presentan un mecanismo de acción similar. Ambos son inhibidores de calcineurina; su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición de importantes fosfatasa (48). Tacrolimus presenta efectos similares a ciclosporina, pero a concentraciones unas 100 veces más bajas (56). Tanto tacrolimus como ciclosporina muestran excelentes ratios de supervivencia del injerto demostrado en un extenso número de estudios comparativos (resumen en *Maes y Vanrenterghem* (57)).

Los principales efectos adversos asociados con el tratamiento de ciclosporina y tacrolimus son neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hipertensión arterial, hiperglicemia, molestias gastrointestinales, infecciones y tumores (58).

A pesar del éxito de ambos fármacos, el tratamiento es complicado por el estrecho intervalo terapéutico y la gran variabilidad farmacocinética intraindividual e interindividual (59,60). Aunque una exposición adecuada es esencial para prevenir el rechazo, la sobreexposición puede originar toxicidades que superen la tolerabilidad y que afecten al injerto a largo plazo y por lo tanto a la supervivencia del paciente (61).

La monitorización terapéutica de fármacos (TDM), además, es obligatoria para ambos. Sin embargo, cada individuo trasplantado responde de forma diferente a iguales concentraciones de inmunosupresor, ocasionando que el intervalo terapéutico recomendado no garantice la ausencia de toxicidad o la eficacia completa del

tratamiento. Los factores que influyen son la farmacocinética (PK) y la farmacodinamia (PD) de estos fármacos: el mecanismo de ambos está bien establecido, lo cual puede ayudar a conocer la utilidad que podría ofrecer la personalización de estas terapias. La farmacogenética podría ser un camino para optimizar el tratamiento con estos fármacos, permitiendo potencialmente evitar los efectos secundarios mientras todavía se mantiene la eficacia.

1.2.2. Farmacocinética

En la figura 6 se muestra una representación esquemática de la distribución de ciclosporina y tacrolimus en el cuerpo humano.

Ciclosporina y tacrolimus se administran por lo general por vía oral (54,61), y existen varias formulaciones disponibles. Ambos están clasificados como Fármacos de Clase II (62,63), según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), indicando que son compuestos poco solubles y muy lipofílicos, por lo que son absorbidos fácilmente a través de las membranas celulares (64,65). La biodisponibilidad de ambos fármacos es generalmente baja con un valor medio del 25% (66,67) a lo cual contribuyen tanto el primer paso significativo de su metabolismo en el intestino delgado e hígado, como el flujo de ambos desde el intestino (68).

Al entrar en los enterocitos, ambos fármacos son metabolizados parcialmente por isoenzimas gastrointestinales CYP3A (de la familia del citocromo P450), principalmente por CYP3A4 y CYP3A5 (69,70). Existen estudios que muestran que CYP3A5 es la enzima predominante para el metabolismo de tacrolimus, con contribución de CYP3A4, pero con una baja eficiencia de catálisis (71,72). Por el contrario, ciclosporina es principalmente metabolizada por CYP3A4 (73). El fármaco original restante que sale del metabolismo intestinal entra en el sistema hepático portal, y en el hígado CYP3A4 y CYP3A5 también metabolizan ciclosporina y tacrolimus (74,75). El fármaco que escapa a las metabolizaciones primero intestinal y posteriormente hepática, pasa a la circulación sistémica, donde ambos fármacos se unen a los eritrocitos en una gran proporción (48,76). Sólo el fármaco libre (no unido a eritrocitos) es capaz de entrar en los linfocitos y ejercer sus principales efectos inmunosupresores.

Se pueden formar hasta 15 metabolitos derivados de tacrolimus (77), siendo el más prevalente 13-O-desmetiltacrolimus (61,78). Este metabolito es aproximadamente diez

veces menos activo que tacrolimus, mientras que uno de los metabolitos minoritarios, el 31-O-desmetiltacrolimus, parece tener una actividad inmunosupresora comparable a

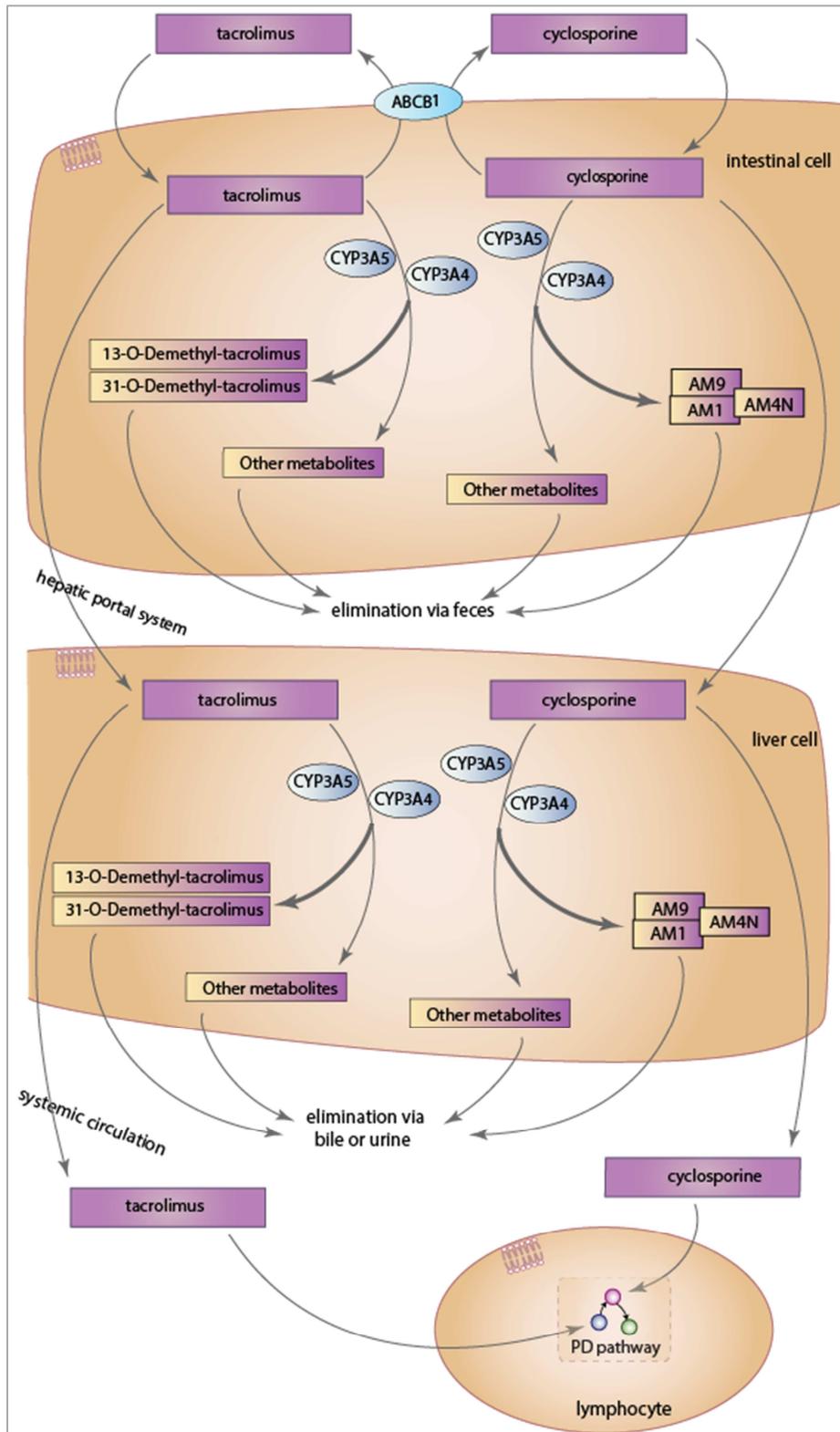


Figura 6. Representación esquemática del metabolismo de ciclosporina y tacrolimus (Fuente: <<http://www.pharmgkb.org/pathway/PA165986114>>).

la de tacrolimus (78,79). El resto de metabolitos tienen una actividad farmacológica débil o insignificante (79,80). Para ciclosporina, se pueden formar aproximadamente 25 metabolitos. (81). Los metabolitos mayoritarios que se encuentran en sangre son AM1 y AM9, los cuales son productos hidroxilados, así como AM4N, el cual es *N*-desmetilado (81). CYP3A4 es capaz de transformar ciclosporina en AM1, AM9, y AM4N, mientras que CYP3A5 solo transforma el fármaco en AM9 (73). La actividad inmunosupresora de estos metabolitos varía entre estudios, pero todos los metabolitos estudiados hasta ahora tienen una actividad reducida comparada con ciclosporina (82,83). AM1 presenta la actividad inmunosupresora más alta: uno de los estudios puso de manifiesto que su actividad era próxima al 20% de ciclosporina (83), mientras en otro fue superior al 80% (82).

Tanto tacrolimus como ciclosporina sufren una gran metabolización, por lo que menos del 0,5 y 1% respectivamente del fármaco original, aparece sin cambios en orina y heces (84,85). Aproximadamente el 95% de los metabolitos de tacrolimus son eliminados vía biliar, siendo la excreción urinaria del 2% aproximadamente (84). De forma similar, los metabolitos de ciclosporina son excretados principalmente en la bilis, con sólo un 3% del fármaco que lo hace por vía renal (85,86).

Además de CYP3A4 y CYP3A5, el flujo de salida mediada por el transportador P-glicoproteína también juega un papel mayoritario en la farmacocinética de ciclosporina y tacrolimus (68). Está codificado por el gen *ABCB1*, y su función es bombear xenobióticos desde el citoplasma al exterior de la célula (87). Se encuentra en la cara apical de las células en las que está presente, y transporta tanto a tacrolimus como a ciclosporina a través de la membrana celular (88). La P-glicoproteína está presente en altas concentraciones en el extremo de las vellosidades de los enterocitos del intestino delgado (89,90), con el fin de disminuir la concentración intracelular de ambos fármacos a través del bombeo de éstas desde los enterocitos al lumen intestinal (87). Además de en los enterocitos, la P-glicoproteína también transporta fármacos a través de las membranas de los hepatocitos (91) y de las células renales (92,93). Está también relacionada con el transporte de fármacos dentro de los linfocitos (90,94), por lo que la concentración real disponible de ciclosporina y tacrolimus para inmunosupresión dentro de estas células puede estar influenciada por su contenido en P-glicoproteína (nota: en la Figura 6 se muestra su implicación sólo en el transporte de fármacos a nivel intestinal ya que su papel dentro de los enterocitos está mejor caracterizado).

La monitorización terapéutica de ciclosporina y tacrolimus se lleva a cabo mediante el ajuste de dosis del fármaco teniendo en cuenta la concentración de éstos en sangre. Todavía no existen evidencias de que la monitorización terapéutica presente una ventaja sobre la no monitorización terapéutica para ciclosporina y tacrolimus, ya que no ha sido formalmente establecido en ningún estudio. Sin embargo, dado el estrecho intervalo terapéutico de ambos fármacos, así como su gran variabilidad farmacocinética interindividual, está ampliamente aceptado que la monitorización terapéutica es beneficiosa (95). Aunque la dosis completa del intervalo del área bajo la curva de concentración – tiempo que va de 0 a 12 h (AUC_{0-12}) se considera de forma general que es el mejor marcador universal de exposición a fármacos, la necesidad de recoger múltiples muestras durante un periodo de 12 horas hace que esta propuesta sea inviable dentro de un contexto clínico, tanto desde el punto de vista práctico como económico (95,96). Por este motivo, la mayoría de los centros donde se realizan trasplantes usan la concentración pre-dosis o basal en sangre (C_0) como guía para la administración de dosis de tacrolimus (95), y la concentración a las dos horas de la administración (C_2) como guía para la administración de dosis de ciclosporina (97). En el caso de ciclosporina, parece que la C_2 correlaciona mejor con el AUC que la C_0 , además de que la tasa de rechazo es menor (97).

Se ha publicado que existen fármacos que interaccionan con ciclosporina y tacrolimus. Pueden encontrarse listas exhaustivas en revisiones de Van Gelder (98), Christians *et al.* (99) y Campana *et al.* (100). Las interacciones entre fármacos ocurren principalmente cuando ciclosporina y tacrolimus se coadministran con otros inhibidores o inductores del citocromo P450 3A (CYP3A) o de la P-glicoproteína (99), dos proteínas que presentan solapamiento significativo en la afinidad por el sustrato (101) (se habla de ellas con más detalle en los apartados 1.3.1 y 1.3.2, respectivamente).

Además de los polimorfismos genéticos, se ha publicado una gran variedad de factores no genéticos que influyen en la farmacocinética de ciclosporina y tacrolimus. Estos incluyen la población trasplantada estudiada, el tiempo desde el trasplante, la formulación del fármaco administrado, la función hepática del paciente, la aparición de íleo paralítico y el tamaño del injerto, la edad del paciente, la raza y peso, el hematocrito del paciente, la concentración de albúmina y lipoproteínas, el ritmo circadiano, la coadministración con comida, diarrea, y otras medicaciones concomitantes que induzcan o inhiban CYP3A o P-glicoproteína. Las revisiones de Staatz y Tett (61) y de Lindholm (102) ofrecen una discusión exhaustiva de los factores asociados con la variabilidad en la farmacocinética de los inhibidores de calcineurina.

1.2.3. Farmacodinamia

En la Figura 7 se muestra la descripción del mecanismo de acción de ciclosporina y tacrolimus en los linfocitos así como los genes candidatos que codifican para las proteínas que se cree que interactúan con los dos fármacos. Ciclosporina y tacrolimus ejercen su efecto inmunosupresor a través de diversas rutas o vías: la inhibición de calcineurina, la inhibición de la kinasa N-terminal c-Jun (JNK) y la inhibición de la p38, induciendo el incremento de la expresión del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). La mayoría de los estudios sobre los efectos farmacodinámicos de ciclosporina y tacrolimus se han centrado en su efecto dentro de los linfocitos T. La implicación de las células *natural killer* (NK) en el rechazo del trasplante no está muy bien definida, sin embargo, se ha encontrado que ambos fármacos inhiben la desgranulación de las células NK de un modo dependiente de la dosis (105).

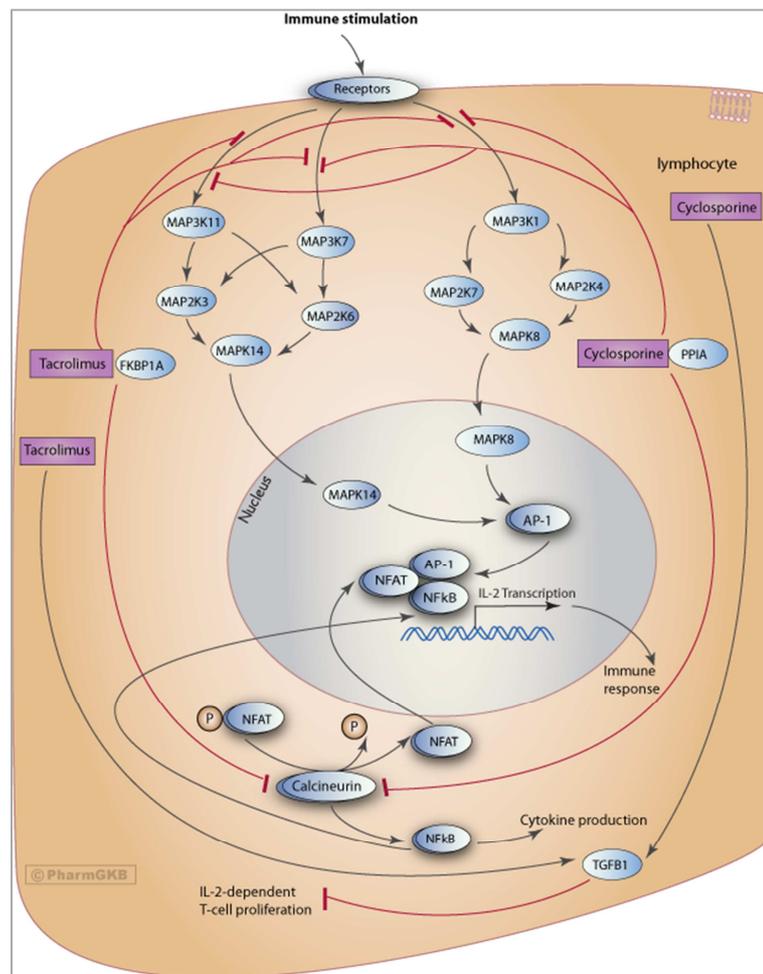


Figura 7. Descripción del mecanismo de acción de ciclosporina y tacrolimus en los linfocitos, así como los genes candidatos que codifican las proteínas que se cree que interactúan con los dos fármacos. (Fuente <<http://www.pharmgkb.org/pathway/PA165985892>>).

Acción sobre calcineurina y NFAT

Una vez dentro de los linfocitos T, tanto ciclosporina como tacrolimus se unen con alta afinidad a proteínas llamadas inmunofilinas. Ciclosporina se une principalmente a la ciclofilina A (codificada por el gen *PPIA*), la ciclofilina predominante en los linfocitos T; mientras que tacrolimus se une a las proteínas unidas a FK, en particular a FKBP1A (también conocida como FKBP12 y codificada por el gen *FKBP1A*). Ambas inmunofilinas interactúan con calcineurina en ausencia de otros ligandos. Sin embargo, la afinidad de la inmunofilina por calcineurina es potenciada tras la unión a estos fármacos, inhibiéndose su actividad (106). Calcineurina es una enzima dependiente de calcio y de una proteína fosfatasa, que es estimulada durante la activación de los linfocitos T por una reacción en cadena mediada por calcio y calmodulina (107,108). Una vez activada, desfosforila a miembros de la familia de los factores nucleares de los linfocitos T activados (NFAT), activándolos (109,110). Una vez activadas, las proteínas NFAT se translocan al núcleo (110), donde se asocian con otros factores de transcripción, como los miembros de la familia de activadores de la proteína-1 (AP-1), y se unen al ADN para promover la transcripción de la interleucina 2 (IL-2) (111). Éstas además también se unen a sitios promotores de una gran variedad de genes de otras citocinas, incluyendo los que codifican para IL-4, IL-10 e IL-17 (112). Por lo tanto, la inhibición de calcineurina, evita su capacidad de desfosforilar y activar a NFAT, afectando la transcripción de citocinas importantes para la respuesta inmune. El impacto de los fármacos sobre la transcripción de IL-2 es probablemente el mecanismo mejor conocido, y esta citocina en concreto juega un papel principal en la respuesta inmune, incluyendo el mantenimiento de la regulación de los linfocitos T, así como la diferenciación y supervivencia de los linfocitos T CD4+ y CD8+ (113). Además de los miembros de la familia NFAT y AP-1, el factor nuclear κ de cadenas ligeras potenciador de la activación de linfocitos B (NF- κ B) está también implicado en la transcripción de IL-2 (112,114,115). NF- κ B es el nombre dado al grupo de factores de transcripción diméricos que se unen como homodímeros o heterodímeros, y que ejercen tanto efectos positivos como negativos sobre la transcripción de genes (116). En general, NF- κ B tiene un gran impacto en el desarrollo, homeostasis, supervivencia y función de los linfocitos T (117). Tiene una enorme variedad de genes diana en los linfocitos T, y además para la IL-2 está también implicado en la regulación de citocinas como el factor de necrosis tumoral β (TNF- β) (118) e interferón γ (INT- γ) (119). Calcineurina está también implicada en la activación de NF- κ B. Indirectamente induce la degradación de un componente conocido como I κ B, el cual está unido para inactivar

NF- κ B y actúa como una proteína inhibidora, previniendo la asociación de NF- κ B con los genes diana nucleares. El bloqueo de la actividad de calcineurina por ambos fármacos de este modo interfiere en la capacidad de NF- κ B para ejercer su acción sobre los genes del sistema inmune (117,120).

Aunque el efecto de ciclosporina y tacrolimus sobre calcineurina es probablemente el mecanismo mejor estudiado, ambos fármacos están también implicados en la inhibición de la vía de la proteína kinasa activadora de mitógeno (MAPK) y la vía de acción sobre TGF- β 1. La vía MAPK es una cascada de señales implicada en una amplia variedad de procesos, particularmente en células que participan en el sistema inmune (121). Consiste en tres proteínas kinasas: MAPK, MAPKK y MAPKK-K. MAPKK-K fosforila y activa MAPKK, la cual a su vez fosforila y activa MAPK (122). TGF- β 1 es una citocina crítica para la regulación de las células del sistema inmune. Es uno de los miembros de la familia TGF- β , la cual también incluye TGF- β 2 y TGF- β 3. Se ha visto que TGF- β inhibe la proliferación de IL-2 dependiente en linfocitos T (123), y también ejerce una gran variedad de otros efectos inmunosupresores en los linfocitos T (124).

1.3. FARMACOGENÉTICA DE LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA

Los principales genes implicados en el metabolismo y transporte de ciclosporina y tacrolimus, codifican para enzimas del citocromo P450 y para la P-glicoproteína.

1.3.1. Citocromo P450

El citocromo P450 (CYP) forma parte de una superfamilia de hemoproteínas que llevan a cabo diversas reacciones relacionadas con el metabolismo de diversos xenobióticos (125). Estas reacciones se pueden clasificar en reacciones de fase I y reacciones de fase II. En la fase I, el xenobiótico adquiere grupos polares, lo que se traduce en un aumento de su hidrosolubilidad, y en la fase II se conjuga con moléculas endógenas que facilitan su transporte en el organismo para ser eliminado.

En el ser humano las reacciones de fase I más frecuentes son las de oxidación, y están mediadas por las enzimas de la superfamilia del citocromo P450 (CYP), la cual está formada a su vez por más de 53 familias génicas (entre ellas las más importantes son CYP1A2, CYP2B6, CYP2C y CYP3A).

En el metabolismo de los fármacos inmunosupresores juega un papel importante la familia CYP3A. Las enzimas CYP3A son las más abundantes de la familia CYP en el hígado humano (representan hasta el 30% del contenido total del CYP). Se han identificado 4 isoformas, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A43, que son responsables del metabolismo de más del 50% de los fármacos. En concreto las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5 son las responsables del metabolismo oxidativo de los fármacos inmunosupresores ciclosporina y tacrolimus, y están codificadas por los genes *CYP3A4* y *CYP3A5*, respectivamente.

1.3.2. P-glicoproteína

La P-glicoproteína es una proteína transportadora de membrana de 170 kD compuesta por 6 dominios transmembrana y más de 1.200 aminoácidos (126).

Su principal función es la de proteger al organismo de sustancias tóxicas, ya que su actividad consiste en expulsar los fármacos de la célula mediante un mecanismo de transporte activo dependiente de ATP. Su ausencia induce la acumulación de distintos fármacos en el cerebro y otros tejidos. En la Figura 8 se muestra una imagen de la estructura transmembrana de la P-glicoproteína.

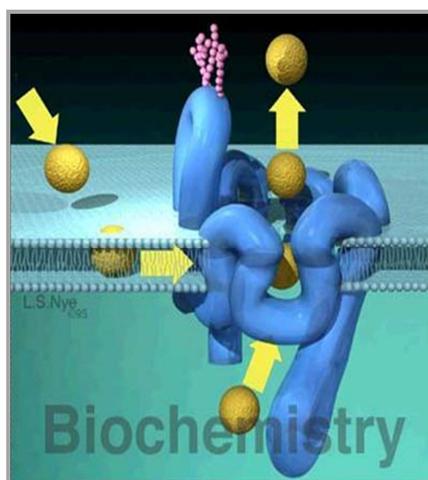


Figura 8. Imagen de la estructura transmembrana de la P-glicoproteína.
(Fuente: <<http://www.ugr.es/~ajerez/proyecto/t3-10.htm>>)

La P-glicoproteína, está codificada por el gen *ABCB1* (también llamado *MDR1*), en el que se han identificado más de 50 polimorfismos (127-131) que pueden producir alteraciones tanto en la expresión como en la función de la proteína (tabla 4). En

concreto, los SNPs localizados en posición 1236 (exón 12), 2677 (exón 21) y 3435 (exón 26) son los más estudiados y se han relacionado con la concentración de fármacos inmunosupresores (figura 9).

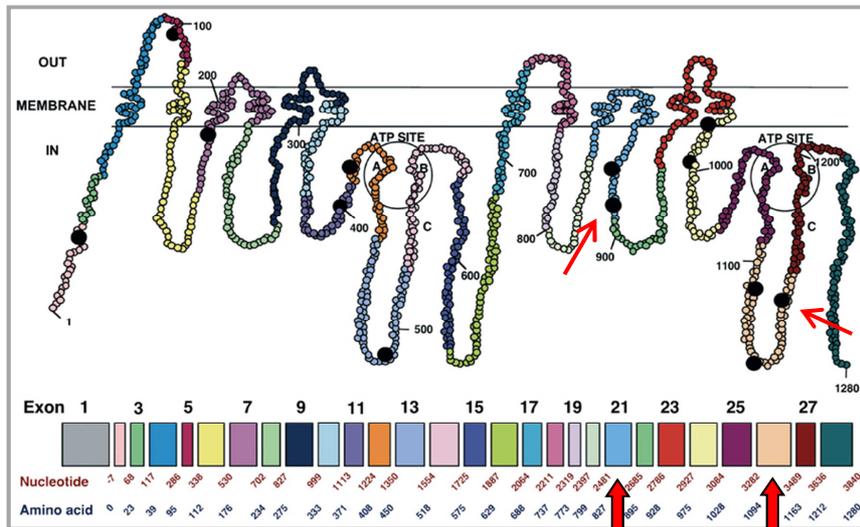


Figura 9. Representación esquemática que muestra la distribución de los SNPs del gen ABCB1 que afectan a la secuencia codificante sobre el modelo estructural 2D de la P-glicoproteína (P-gp). En la parte inferior, se muestran 28 exones del gen, y la región de la P-gp codificada por cada exón está también destacada en el mismo color en la estructura de la P-gp 2D. Las flechas rojas muestran la ubicación de los SNPs 2677G>T/A y 3435 C>T y las regiones para las que codifican en la P-gp.
(Modificado de <http://www.nature.com/onc/journal/v22/n47/fig_tab/1206948f1.html#figure-title>)

En la tabla 4 se muestra un resumen de las variantes genéticas asociadas con la farmacogenética de ciclosporina y/o tacrolimus, así como su correspondiente identificador rs y su efecto sobre las proteínas.

Tabla 4. Resumen de las variantes genéticas que muestran asociación con la farmacogenética de ciclosporina y tacrolimus.

Table 2 Summary of genetic variants that show associations with tacrolimus or cyclosporine pharmacogenetics

Gene name	Variant	rsID	Effect on gene or protein	References
CYP3A5	CYP3A5*3	rs776746	Nonfunctional protein	Kuehl <i>et al.</i> [115]
	CYP3A5*6	rs10264272	Nonfunctional protein	Santoro <i>et al.</i> [116]
	CYP3A5*7	rs41303343	Nonfunctional protein	Santoro <i>et al.</i> [116]
CYP3A4	CYP3A4*1B ^a	rs2740574	Increase gene transcription	Aminmani <i>et al.</i> [117]
	CYP3A4*18 ^b	rs28371759	May increase enzyme activity	Fukushima-Uesaka <i>et al.</i> [118]
	CYP3A4*22	rs35599367	Reduced mRNA levels, reduced enzyme activity	Wang <i>et al.</i> [119]
ABCB1	3435C>T	rs1045642	Reduced protein expression and function	Hoffmeyer <i>et al.</i> [120]
	2677G>T/A	rs2032582	Currently unknown	
	1236C>T	rs1128503	Currently unknown	
NR1I2	8055C>T	rs2276707	Currently unknown	
POR	POR*28	rs1057868	May modify the POR-cytochrome interaction	De Jonge <i>et al.</i> [121]
	CYP2C8*	rs11572080	Reduced enzyme activity	Smith <i>et al.</i> [122]
CYP3A7	CYP3A7*1C		Increased mRNA expression	Sim and colleagues [123,124]
TGFB1	29 T>C	rs1800470	Increased serum concentration of protein	Yokota <i>et al.</i> [125]
	74 G>C	rs1800471	Currently unknown	
PPIA (cyclophilin A)	-11C>G	rs8177826	Increased gene expression	Moscoco-Solorzano <i>et al.</i> [126]

rsIDs (if known) and effects on the gene or protein are also listed. References pertain to the effect on the gene or protein.

^{a,b}In linkage disequilibrium with CYP3A5*3.

(Fuente: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119065/table/T2/>>)

La mayoría de los estudios farmacogenéticos en ciclosporina y tacrolimus se centran en los efectos de las variantes de los genes *CYP3A4*, *CYP3A5*, y *ABCB1*, por el papel central que ocupan las enzimas y transportadores para los que codifican en la disponibilidad de ambos fármacos. Las variantes consideradas más influyentes de dichos genes, son las que se han estudiado en el presente trabajo.

1.3.3. Variantes genéticas estudiadas por su influencia sobre la farmacocinética y farmacodinamia de ciclosporina y tacrolimus

CYP3A4 (rs2740574) NM_017460.5:c.-392A>G

Este SNP, denominado también *CYP3A4*1B*, consiste en una sustitución A>G en la posición -392 del promotor del gen, lo que dificulta la unión de un represor en esta zona. La presencia de la variante *CYP3A4*1B*, se ha relacionado con una actividad transcripcional aumentada, produciéndose una mayor cantidad de enzima activa. Como consecuencia, se daría una metabolización excesivamente rápida del fármaco, y por lo tanto se esperaría un menor efecto inmunosupresor (132).

CYP3A4 (rs35599367) NM_017460.5:c.522-191C>T.

El alelo denominado CYP3A4*22 fue descrito por primera vez en 2011 (133) debido a su fuerte asociación con la expresión diferencial de CYP3A4 en un estudio de desequilibrio de expresión alélica. Consiste en una sustitución C>T en la posición 15389 (intrón 6) del gen CYP3A4. El alelo minoritario T ha sido relacionado con niveles reducidos de expresión de ARNm comparado con el alelo mayoritario C, y por lo tanto con una menor metabolización del fármaco, que se traduciría en un mayor efecto inmunosupresor (134).

CYP3A5 (rs776746) NM_000777:c.6986A>G.

Este SNP consiste en una sustitución A>G en la posición 6986 (intrón 3) del gen CYP3A5. La presencia de G en esta posición define al alelo CYP3A5*3, que es mayoritario en la población de raza blanca, mientras que la presencia de A define a CYP3A5*1, que es minoritario, y por ello en este trabajo se habla de ser portador o no de esta última variante. El alelo CYP3A5*3, se ha relacionado con una menor cantidad de enzima activa, ya que origina proteínas no funcionales. Como consecuencia, se daría una disminución de la metabolización del fármaco, y por lo tanto se esperaría un mayor efecto inmunosupresor (135).

ABCB1 (rs1045642) NM_000927.4:c.3435C>T.

Este SNP consiste en una sustitución C>T en la posición 3435 (exón 26) del gen ABCB1. El alelo T se ha relacionado con una expresión y función disminuida de la P-glicoproteína. Como consecuencia, se esperaría una disponibilidad del fármaco aumentada en comparación con los portadores del alelo C (136).

ABCB1 (rs2032582) NM_000927.4:c.2677G>T/A.

Este SNP consiste en una sustitución G>T/A en la posición 2677 (exón 21) del gen ABCB1, y su efecto sobre la P-glicoproteína todavía no está bien definido (137).

1.3.4. Farmacogenética de ciclosporina

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los estudios farmacogenéticos relacionados con ciclosporina en lo que se refiere a la farmacocinética y la farmacodinamia.

Tabla 5. Resumen de los estudios farmacogenéticos de ciclosporina.

Variant	Associated genotype	Pharmacokinetic phenotype	References	Associated genotype	Pharmacodynamic phenotype	References
<i>CYP3A5</i> *3	*3/*3	↓ C_0/D ^{a,b} , ↑ C_0/D , ↑ C_2/D , ↓ CL/F, ↓ D Other studies: NS	Staatz and colleagues [25,183,184] Staatz and colleagues [25,186]	*3/*3	One study: ↓ survival Majority: NS	Kreutz <i>et al.</i> [185] Staatz and colleagues [26,186–188]
<i>CYP3A4</i> *1B ^c	*1B/*1 *1B/*1B	151 heart and renal recipients: ↑ CL/F Smaller studies: ↑ D, ↓ AUC_{12}/D , ↓ C_0/D Majority: NS	Staatz and colleagues [25,184] Staatz and colleagues [25,186]	*1B/*1 *1B/*1B	Limited studies: NS	Staatz and colleagues [26,186,187]
<i>CYP3A4</i> *18 ^c	*18/*18	↓ C_0/D , ↓ C_2/D	Qiu and colleagues [167,189]			
<i>CYP3A4</i> *22	*22/*1 *22/*22	↑ C_0/D , ↑ C_0	Elens <i>et al.</i> [144]	*22/*1 *22/*22	↑ DGF	Elens [190]
<i>ABCB1</i> 3435C>T	CT TT	Meta-analysis: ↑ AUC_{12} only Smaller studies: ↑ C_0/D , ↑ C_2/D , ↓ D Majority: NS	Staatz and colleagues [25,183] Staatz and colleagues [25,186]	TT	↑ rejection (renal), ↑ nephrotoxicity Other studies: NS	Staatz and colleagues [26,191] Staatz and colleagues [26,187,188]
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A	CT TT	↑ C_0/D Majority: NS	Staatz <i>et al.</i> [25] Staatz and colleagues [25,186]	TT	237 renal recipients: ↑ rejection, 120 liver recipients: ↓ renal dysfunction Majority: NS	Staatz <i>et al.</i> [26] Staatz and colleagues [26,187,188]

Information on significant results can be found in the first row for each variant; information on nonsignificant results can be found in the second row. Empty rows indicate that no studies were available. Comprehensive tables of studies before 2010 showing these associations can be found in reviews by Staatz *et al.* [25,26] referenced throughout this table. Any additional studies not mentioned in this review are referenced individually.

AUC_{12} , area under the blood concentration–time curve from time zero to 12 h; AUC_{12}/D , dose-adjusted AUC_{12} ; C_0 , trough blood concentration; C_0/D , dose-adjusted C_0 ; C_2 , 2-h postdose blood concentration; C_2/D , dose-adjusted C_2 ; CL/F, apparent oral clearance; C_{max} , maximum blood concentration; C_{max}/D , dose-adjusted C_{max} ; D, dose requirements; DGF, delayed graft function; ESRF, end-stage renal dysfunction; Majority, majority of studies; ↓, decreased; ↑, increased.

^aAn example of how to read this table: *3/*3 is associated with decreased C_0/D as compared with remaining genotypes – in this case *3/*1 and *1/*1.

^bOnly PK parameters analyzed in multiple studies were included in this table for the purposes of brevity.

^cIn linkage disequilibrium with *CYP3A5**3.

^dStudies included patients on tacrolimus and cyclosporine.

(Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119065/table/T4/>>)

1.3.4.1. Gen *CYP3A4*: rs2740574 (*CYP3A4**1B) y rs35599367 (*CYP3A4**22)

El impacto de las variantes de *CYP3A4* en la farmacocinética de ciclosporina es controvertido (138,139). Como *CYP3A4* es la enzima predominante involucrada en la metabolización de ciclosporina (73), sería de esperar que mostrara una fuerte asociación con la farmacocinética de ésta, particularmente en comparación con *CYP3A5*. A pesar de esto, las evidencias de que exista una asociación entre el alelo *CYP3A4**1B y la farmacocinética de ciclosporina no han sido consistentes, con varios estudios que muestran relaciones no significativas (139-142). Los estudios en los que se ha observado asociación informan de un aumento en el aclaramiento del fármaco para los portadores del alelo *1B y un aumento de las necesidades de dosis media

para los pacientes **1B/*1* en comparación con los homocigotos **1/*1* en aproximadamente 200 mg/día (143). Ambos resultados concuerdan con la teoría de la asociación entre el alelo **1B* y una actividad transcripcional aumentada, produciéndose una mayor cantidad de enzima activa (132).

El efecto del alelo *CYP3A4*1B* sobre los parámetros farmacodinámicos se ha analizado en muy pocos estudios, y no se ha encontrado ninguna relación en este aspecto (139,144).

También se ha observado la existencia de asociación entre el rs35599367 (*CYP3A4*22*) y la farmacocinética de ciclosporina: los portadores **22* tuvieron C_0/D 1,6 veces mayores que en los homocigotos **1/*1* (145), resultado que concuerda con el hallazgo de que los portadores **22* reducen los niveles de ARNm y de la actividad enzimática (134).

En un estudio reciente sobre el efecto de *CYP3A4*22* en pacientes con trasplante renal, se encontró que el alelo **22* estaba asociado con un mayor riesgo de función retardada del injerto en comparación con los homocigotos **1* (146).

1.3.4.2. Gen *CYP3A5*: rs776746 (*CYP3A5*3*)

El impacto de las variantes de *CYP3A5* en la farmacocinética de ciclosporina es controvertido (138,139), ya que los estudios muestran resultados contradictorios. Este tipo de inconsistencia es común, y no parece estar influenciada por la raza.

Los estudios que han analizado la relación entre los alelos de *CYP3A5*3* y la farmacodinamia de ciclosporina también han mostrado resultados contradictorios. Solo en un estudio, aunque sea excepcional por el número de pacientes incluidos (399 receptores renales alemanes), se encontró una asociación significativa entre el genotipo *CYP3A5*3/*3* y un parámetro farmacodinámico: se redujo la supervivencia del paciente en comparación con los portadores del alelo **1* (147). En el resto de estudios los resultados han sido negativos respecto a la relación (139,144).

1.3.4.3. Gen *ABCB1*: rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A)

El impacto de las variantes de *ABCB1* en la farmacocinética de ciclosporina también es controvertido (138,139). No está claro que exista influencia de los SNP c.3435C>T y c.2677G>T/A de *ABCB1*, ya que la mayoría de los estudios muestran asociaciones

no significativas con los parámetros farmacocinéticos (138). De hecho, un metaanálisis de 1036 individuos mostró que no había influencia del SNP c.3435C>T sobre ninguno de los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina excepto en un incremento del AUC_{12} para los portadores del alelo T (148). En la mayoría de los estudios realizados sobre el c.2677G>T/A, no se ha encontrado ninguna relación (138). En la mayoría de los estudios, incluyendo uno con 407 pacientes con trasplante renal (149), tampoco se encontró ninguna asociación significativa entre los haplotipos del *ABCB1* y la farmacocinética de ciclosporina. Dado este gran número de resultados negativos, es probable que estos SNPs de *ABCB1* expliquen sólo una pequeña cantidad de la variación en la farmacocinética de la ciclosporina.

Los estudios que han analizado la relación entre los alelos de *ABCB1* y la farmacodinamia de ciclosporina han mostrado resultados tanto a favor como en contra.

En el trasplante renal, el genotipo de estos SNPs en el donante podría ser de gran relevancia, ya que la P-glicoproteína presenta una elevada expresión en las células epiteliales del túbulo proximal renal, por lo que la actividad en el riñón del donante podría afectar el desarrollo de los efectos adversos relacionados con los efectos secundarios de ciclosporina (149-151). Si esto es así, en otros tipos de trasplante, como el hepático, podría haber una relación entre estos genotipos en el receptor y la presencia de nefrotoxicidad. Los estudios en esta área son actualmente limitados y muy conflictivos.

1.3.5. Farmacogenética de tacrolimus

En la tabla 6 puede verse un resumen sobre los estudios farmacogenéticos de tacrolimus en lo que se refiere a las variantes relacionadas con la farmacocinética y farmacodinamia. En los siguientes apartados se explica la farmacogenética de tacrolimus, en función del gen implicado.

Tabla 6. Resumen de los estudios farmacogenéticos de tacrolimus.

Variant	Associated genotype	Pharmacokinetic phenotype	References	Associated genotype	Pharmacodynamic phenotype	References
CYP3A5*3	*3/*3	↓D ^{h,b} , ↓CL/F, ↑C ₀ /D, ↑C _{max} /D, ↑C _{0h} , ↑AUC ₀₋₂ /D	Staatz and colleagues [25,133–140]	*3/*3	304 renal recipients: ↓ CNIT Smaller studies: ↓ and ↑ nephrotoxicity, ↓ rejection (renal), ↓ hypertension	Staatz and colleagues [26,137,141]
CYP3A5*6	*6/*1 *6/*6	One study: NS	Mai <i>et al.</i> [142]			
CYP3A5*7	*7/*1 *7/*7	↑C ₀ /D	Santoro <i>et al.</i> [116]			
CYP3A4*1B ^c	*1B/*1 *1B/*1B	↑D _i , ↓C ₀ /D	Staatz <i>et al.</i> [25]	*1B/*1 *1B/*1B	Limited studies: NS	Staatz <i>et al.</i> [26]
CYP3A4*18 ^f	*18/*1 *18/*18	Other studies: NS	Staatz <i>et al.</i> [25]			
CYP3A4*22	*22/*1 *22/*22	↓CL/F, ↓C ₀ /D, ↓C ₂ /D, ↓D _i , ↑C ₀ /D	Staatz and colleagues [25,138] Elens <i>et al.</i> [143,144]			
ABCB1 3435C>T	TT	↑D, ↓D _i , ↑C ₀ /D	Staatz and colleagues [25,145] Staatz and colleagues [25,139]	TT	↑UC remission success, ↓ rejection (lung) Majority: NS	Staatz and colleagues [26,145] Staatz <i>et al.</i> [26]
ABCB1 2677G>T/A	GT TT	↑C ₀ /D, ↓D _i , ↑D	Staatz and colleagues [25,146]	TT	↑UC remission success, ↓ renal dysfunction, ↑ and ↓ neurotoxicity	Staatz and colleagues [26,145,146]
ABCB1 1236C>T	CT TT	Majority: NS ↑C ₀ /D	Staatz <i>et al.</i> [25] Staatz <i>et al.</i> [25]	TT	Majority: NS ↑UC remission success, ↑ and ↓ neurotoxicity	Staatz <i>et al.</i> [26] Herrlinger and colleagues [145,146] Staatz <i>et al.</i> [26]
Haplotype: 3435C>T, 2677G>T/A, 1236C>T	TTT	Majority: NS ↓D, ↑C ₀ /D (vs. CGC)	Staatz <i>et al.</i> [25] Staatz <i>et al.</i> [25]	TGC	Majority: NS ↑CNIT (vs. CGC), ↑ rejection (renal) (vs. TTT)	Staatz and colleagues [26,146]

Information on significant results can be found in the first row for each variant; information on nonsignificant results can be found in the second row. Empty rows indicate that no studies were available. Comprehensive tables of studies before 2010 showing these associations can be found in the reviews by Staatz *et al.* [25,26] referenced throughout this table. Additional studies not mentioned in these tables are referenced individually.

AUC_x, area under the blood concentration–time curve from 0 to x hours; AUC₀/D, dose-adjusted AUC_x; C₀, trough blood concentration; C₀/D, dose-adjusted C₀; C₂, 2-h postdose blood concentration; C₂/D, dose-adjusted C₂; CL/F, apparent oral clearance; C_{max}, maximum blood concentration; C_{max}/D, dose-adjusted C_{max}; CNIT, chronic irreversible drug-induced nephrotoxicity; D, dose requirements; DGF, delayed graft function; ESRF, end-stage renal failure; Majority, majority of studies; UC, ulcerative colitis; ↓, decreased; ↑, increased.

^aAn example of how to read this table: *3/*3 is associated with decreased D as compared with remaining genotypes – in this case *3/*1 and *1/*1.

^bOnly PK parameters analyzed in multiple studies were included in this table for the purposes of brevity.

^cIn linkage disequilibrium with CYP3A5*3.

^dThese effects only seen in CYP3A5*1 carriers.

^eStudies included patients on tacrolimus and cyclosporine.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119065/table/T3/>

1.3.5.1. Gen CYP3A5: rs776746 (CYP3A5*3)

Se ha observado que son algunas de las variantes del gen CYP3A5 las que presentan las asociaciones más firmes con la farmacocinética de tacrolimus. En concreto, el SNP rs776746 (CYP3A5*3) en el intrón 3 del gen es un fuerte predictor de las necesidades de dosis de tacrolimus (152), y explica hasta el 45% de la variabilidad de dosis (153) y el 30% de la variabilidad en el aclaramiento del fármaco administrado por vía oral de

tacrolimus (154). La variante *CYP3A5**3 consiste en una sustitución A>G; la homocigosidad para el alelo G está asociada con un aumento en la ratio de la concentración relativa a la dosis (C_0/D), una disminución de las dosis requeridas, y una disminución en el aclaramiento tras administración oral (155,156). El alelo *3 afecta a la concentración de proteína de *CYP3A5* debido a que se crea un lugar de *splice* críptico dentro del intrón, que da como resultado un *splicing* del ARNm alterado, produciendo un codón de parada prematuro y por lo tanto una proteína no funcional. Los pacientes homocigotos para el alelo *3 son conocidos como los *CYP3A5* no expresadores (135). Esta reducción de la actividad enzimática lleva a una reducción en las necesidades de dosis: pacientes trasplantados renales que son *CYP3A5* portadores del alelo *3 requieren dosis diarias medias inferiores, de unos 0,05 mg/kg aproximadamente (155). Esta asociación entre el genotipo de *CYP3A5* y el metabolismo de tacrolimus se ha replicado muchas veces en una gran variedad de estudios diferentes: en una revisión sistemática reciente de la literatura por la *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy* se encontró un nivel de evidencia muy alto para apoyar la interacción gen-fármaco. Sin embargo, no aconsejan hacer recomendaciones de dosis basadas en este genotipo, del estilo de las basadas en la TDM (157).

Como tacrolimus es metabolizado por enzimas *CYP3A5* tanto intestinales como hepáticas, la contribución combinada de la expresión de *CYP3A5* en el intestino y en el hígado trasplantado puede influir en la farmacocinética de tacrolimus en receptores de trasplante hepático (68). Los estudios realizados hasta la fecha que han examinado la influencia relativa de los donantes y receptores y el genotipo *CYP3A5**1/*3 en pacientes trasplantados de hígado, han sido con participación de sólo un pequeño número de pacientes, y por lo tanto han sido poco concluyentes.

1.3.5.2. Gen *CYP3A4*: rs2740574 (*CYP3A41B) y rs35599367 (*CYP3A4**22)**

De entre las variantes del gen *CYP3A4*, se ha observado que el rs2740574 (*CYP3A4**1B) y el rs35599367 (*CYP3A4**22) muestran tener una asociación con las necesidades de dosis de tacrolimus.

*CYP3A4**1B se encuentra en el promotor del gen, y se ha relacionado con una actividad transcripcional aumentada, produciéndose una mayor cantidad de enzima activa (132). Se ha visto que los portadores del alelo *1B tienen concentraciones basales de tacrolimus ajustadas por la dosis un 35% más bajas en comparación con

los homocigotos para el alelo *1 normal (140). Sin embargo, este SNP está en desequilibrio de ligamiento (DL) con *CYP3A5*3*, por lo que su efecto sobre las necesidades de dosis de tacrolimus (así como cualquiera de los parámetros farmacodinámicos) está probablemente mediado por este SNP (158). Un pequeño número de estudios de haplotipos valoraron las combinaciones de los alelos *CYP3A4*1B* y *CYP3A5*3* y encontraron una asociación significativa con la farmacocinética de tacrolimus (149,159). Aunque dada la fuerte evidencia que apoya el papel de *CYP3A5*3* en la farmacocinética de tacrolimus (157), y el DL entre estos dos alelos (158), cualquier efecto de este haplotipo puede ser debido al alelo *CYP3A5*3*. Por este motivo se ha decidido no incluir el estudio de este SNP en el grupo de pacientes tratados con TAC en el presente trabajo.

El rs35599367 está presente en el intrón 6 del gen *CYP3A4*, y es el resultado de una sustitución de C por T. Los portadores del alelo *22 requieren una dosis diaria de tacrolimus un 33% más baja que los homocigotos no portadores para llegar a la misma concentración basal de tacrolimus en sangre (160). Los portadores del alelo *22 también reducen los niveles de ARNm y la actividad enzimática en comparación con los homocigotos no portadores (134). A diferencia de *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22* no está en DL con *CYP3A5*3*, por lo que contribuye parcialmente en la variación de las necesidades de dosis de tacrolimus independientemente del alelo *3 (145).

Existen muy pocas evidencias para apoyar una influencia de los SNPs del gen *CYP3A4* sobre aspectos relevantes de la farmacodinamia de tacrolimus: los estudios que hay hasta el momento no han mostrado asociación con la variante *CYP3A4*1B* (144). Para el alelo *CYP3A4*22* no existen estudios de asociación con la farmacodinamia de tacrolimus.

1.3.5.3. Gen *ABCB1*: rs1045642 (c.3435 C>T) y rs2032582 (c.2677 G>T/A)

Dentro del gen *ABCB1*, los SNPs más estudiados son el rs1045642 (c.3435C>T), el rs2032582 (c.2677G>T/A) y el rs1128503 (c.1236C>T). Hasta el momento existe controversia sobre la asociación entre la farmacocinética de tacrolimus y las variantes de *ABCB1*.

Una revisión sistemática reciente de la literatura disponible no encontró evidencias coherentes de asociación entre las C_0/D y el rs1045642 (c.3435C>T), el SNP mejor estudiado del gen (161). El SNP c.3435C>T ha sido de particular interés, ya que ha

demostrado reducir la expresión y la función intestinal de la P-glicoproteína, y por lo tanto tenía el potencial de afectar la biodisponibilidad del fármaco (136). La evidencia que apoya la participación de otros SNPs de *ABCB1* sobre el ajuste de dosis de tacrolimus ha sido también inconsistente.

Existe un gran número de estudios en los que tampoco se ha logrado encontrar ninguna asociación entre el rs2032582 (c.2677G>T/A) y el rs1128503 (c.1236C>T), y la farmacocinética de tacrolimus (138).

Otros estudios no han encontrado relación con las combinaciones de haplotipos *ABCB1*, incluyendo uno con 206 receptores renales, en el que las asociaciones del haplotipo no fueron significativas después de que se tuviera en cuenta el genotipo para *CYP3A5* (162). Esto sugiere que estos alelos probablemente juegan un papel menor sobre la influencia de la farmacocinética de tacrolimus en comparación con el efecto de los alelos *CYP3A5* (162).

Las asociaciones entre los alelos de *ABCB1* y los efectos farmacodinámicos han sido inconsistentes, y en ninguno de los estudios se ha podido demostrar ninguna relación entre los SNPs c.3535C<T, c.2677G>T/A y c.1236C>T y ningún parámetro farmacodinámico, tales como la pérdida del injerto o el rechazo agudo (resumidos en Staatz et al. (144)).

En el presente trabajo, se han seleccionado las variables rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A) para ser estudiadas.

2. Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta los datos expuestos anteriormente, en el presente trabajo se plantean las siguientes hipótesis y objetivos.

Hipótesis

1. Algunas variantes de genes relacionados con el metabolismo y el transporte de los fármacos inmunosupresores inhibidores de calcineurina, ciclosporina y tacrolimus, pueden influir en su concentración en sangre cuando se ajusta según la dosis administrada.
2. Las mencionadas variantes pueden influir en la eficacia clínica (incidencia de rechazo agudo) y/o la seguridad (incidencia de aparición de los efectos adversos) de dichos fármacos.

Objetivos

1. Evaluar la relación de las variantes *CYP3A4*1B* (c.-392A>G) y *CYP3A4*22* (c.522-191C>T) del gen *CYP3A4*, y c.3435C>T y c.2677G>T del gen *ABCB1*, con las características farmacocinéticas de ciclosporina en pacientes portadores de un trasplante hepático primario, tanto de manera individual como conjunta, considerando el genotipo de los donantes y los receptores.
2. Evaluar la relación de las variantes *CYP3A4*22* (c.522-191C>T), *CYP3A5* (c.6986A>G), y c.3435C>T y c.2677G>T del gen *ABCB1*, con las características farmacocinéticas de tacrolimus en pacientes portadores de un trasplante hepático primario, tanto de manera individual como conjunta, considerando el genotipo de los donantes y los receptores.
3. Evaluar la relación entre las variantes seleccionadas y el perfil de eficacia y seguridad del régimen inmunosupresor, en términos de profilaxis del rechazo agudo y aparición de efectos adversos.

3. Material y Métodos

Este trabajo se ha planteado como un estudio de carácter observacional unicéntrico y retrospectivo, con dos grupos de pacientes.

3.1. SUJETOS A ESTUDIO Y RECOGIDA DE DATOS

Tras la revisión de las historias clínicas de los pacientes trasplantados de hígado desde febrero de 1984 (año en el que se realizó el primer trasplante hepático en el Hospital de Bellvitge) hasta julio de 2011, se seleccionan los pacientes receptores de un trasplante primario cuyo tratamiento inmunosupresor de inicio consistió en ciclosporina (CSA) o tacrolimus (TAC) en monoterapia, con o sin esteroides (prednisona (Pred)). Los pacientes finalmente incluidos en este estudio fueron trasplantados entre noviembre de 1998 y julio de 2011 en la Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitari de Bellvitge.

Justificación de la selección: con el fin de obtener una población lo más homogénea posible (en cuanto a las variables demográficas, clínico-fisiopatológicas, las dependientes de interacciones medicamentosas, de la formulación del fármaco y de la metodología empleada en el laboratorio), se siguieron estrictamente los criterios de inclusión y exclusión de pacientes para formar parte del estudio que se detallan más adelante. Este rigor, junto con la exigencia de disponer de una muestra de tejido parafinado (de vesícula biliar) del donante, ha sido la causa principal del limitado número de pacientes incluido finalmente en el estudio. Los datos de este trabajo (procedentes de las historias clínicas de los pacientes), se obtuvieron de manera protocolizada durante los tres primeros meses post-trasplante.

Condiciones de inclusión (todos los sujetos que se incluyen en el estudio cumplen los siguientes criterios):

- Pacientes de ambos sexos con edad igual o superior a 18 años.
- Pacientes que recibieron un trasplante hepático primario procedente de un donante ABO compatible.
- Pacientes que recibieron una terapia inmunosupresora consistente en ciclosporina (grupo CSA) o tacrolimus (grupo TAC), con o sin esteroides (prednisona (Pred)), permitiéndose la inducción con anticuerpos Anti CD-25.

Condiciones de exclusión:

- Introducción de otro fármaco inmunosupresor en combinación con ciclosporina o tacrolimus, antes de los 3 meses post-trasplante.
- Distinta metodología para la medida de la concentración sanguínea del fármaco empleada en el laboratorio.
- Insuficiencia renal previa al trasplante, valorada en función del Filtrado glomerular (FG) según la ecuación del MDRD-4 (ver apartado 3.2.1).
- Material del donante (muestra de tejido parafinado) no disponible en el Servicio de Anatomía Patológica.
- No obtención de material genético suficiente y de calidad para la determinación del genotipo.
- Pacientes receptores de un trasplante multiorgánico.
- Pacientes retrasplantados.
- Pacientes con neoplasia en curso o antecedentes de neoplasia en los 5 años previos al trasplante. Se permite la inclusión de pacientes con carcinoma hepático primario, que cumplen los criterios de Milán (163,164) valorados radiológicamente.
- Pacientes con infección generalizada que requirieron tratamiento.
- Pacientes o donantes VIH positivos.
- Pacientes con diarrea grave, vómitos, úlcera péptica activa o trastornos gastrointestinales que pudieron afectar la absorción del inmunosupresor.
- En el caso de mujeres, las que quedaron embarazadas durante los 3 primeros meses.
- Pacientes que estuvieran participando en algún ensayo clínico con un fármaco experimental.

Tras la aplicación de los criterios de selección y exclusión, el número total de participantes en este estudio fue de 69 pacientes para el grupo CSA y 67 pacientes para el grupo TAC, de los 375 y 154 pacientes potenciales de los que se partía, para ambos grupos, respectivamente.

Tras la aprobación del estudio por el Comité de Ética del hospital, se informó a los pacientes seleccionados y se obtuvo el consentimiento informado (Anexo 1) para poder proceder a la recopilación de los datos y análisis de las muestras.

La información de las variables e indicadores se recogieron de la historia clínica del paciente, tanto en formato papel, como en formato electrónico.

Los datos del seguimiento clínico corresponden a los días previos al trasplante, y a los días 3, 7, 14, 30 y 90 post-trasplante. Todos los datos se registraron en un Cuaderno de Recogida de Datos y posteriormente en una hoja Excel.

3.2. MAGNITUDES ESTUDIADAS

3.2.1. Magnitudes relacionadas con el seguimiento del paciente trasplantado

Las magnitudes estudiadas fueron:

- Velocidad de filtración glomerular (MDRD-IDMS)

Fórmula MDRD-IDMS (165):

Velocidad de filtración glomerular (mL/min/1,73 m²) =
=175 x (Srm—Creatinina)^{-1,154} x (Edad)^{-0,203} x (0,742 si es mujer) x (1,210 si es de raza negra)

En esta fórmula, la concentración sérica de creatinina se expresa en mg/dL y la edad en años.

Esta fórmula es idónea para la estimación de la velocidad de filtración glomerular de los pacientes que padecen insuficiencia renal. El principal inconveniente es que subestima la filtración glomerular en la población sana, y por este motivo sólo se considera patológico cuando estima filtraciones inferiores a 60 mL/min/1,73 m².

- Srm—Glucosa; c.subst. (mmol/L)
- Hb(San)—Hemoglobina A1c; fr.subst. (%)
- Srm—Alanina-aminotransferasa; c.cat. (µkat/L)
- Srm—Aspartato-aminotransferasa; c.cat. (µkat/L)

- Srm— γ -Glutamilttransferasa; c.cat. ($\mu\text{kat/L}$)
- Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat. ($\mu\text{kat/L}$)
- Srm—Bilirrubina; c.subst. ($\mu\text{mol/L}$)
- Srm—Albúmina; c.subst. ($\mu\text{mol/L}$)
- Srm—Creatinina; c.subst. ($\mu\text{mol/L}$)
- Srm—Urea; c.subst. (mmol/L)
- Srm—Colesterol; c.subst. (mmol/L)
- Srm—Triglicéridos; c.subst. (mmol/L)
- San—Hemoglobina; c.masa (g/L)
- San—Leucocitos; c.num. ($\times 10^9/\text{L}$)
- San—Plaquetas; c.num. ($\times 10^9/\text{L}$)
- Srm—RNA Virus Hepatitis C (detección cuantitativa por PCR a tiempo real); carga vírica (UI/mL)

3.2.2. Magnitudes relacionadas con el estudio farmacológico

- San—Ciclosporina; c.masa. (a los 120 min. de su administración) ($\mu\text{g/L}$)

Se determina la concentración del fármaco a las 2 horas de la administración (C_2).

- San—Tacrolimus; c.masa. ($\mu\text{g/L}$)

Se determina la concentración del fármaco pre-dosis o basal (C_0).

3.2.3. Propiedades relacionadas con el estudio genético

Se estudiaron los siguientes SNPs, tanto en donantes como en receptores, para cada uno de los grupos:

- Grupo CSA:
 - CYP3A4 (rs2740574) NM_017460.5:c.-392A>G (CYP3A4*1B)
 - CYP3A4 (rs35599367) NM_017460.5:c.522-191C>T (CYP3A4*22)
 - ABCB1 (rs1045642) NM_000927.4:c.3435C>T.
 - ABCB1 (rs2032582) NM_000927.4:c.2677G>A/T.

- Grupo TAC:
 - CYP3A5 (rs776746) NM_000777:c.6986A>G (CYP3A5*3)
 - CYP3A4 (rs35599367) NM_017460.5:c.522-191C>T (CYP3A4*22)
 - ABCB1 (rs1045642) NM_000927.4:c.3435C>T.
 - ABCB1 (rs2032582) NM_000927.4:c.2677G>A/T.

*Nota: en la bibliografía se describe que no existe una influencia significativa del SNP CYP3A5*3 para ciclosporina y del SNP CYP3A4*1B para tacrolimus, y por este motivo se decidió no incluirlos en el estudio de cada grupo.*

3.3. VARIABLES ESTUDIADAS

3.3.1. Variables farmacocinéticas

Para poder valorar cuantitativamente la relación de cada variante polimórfica, tanto de forma individual como en conjunto, sobre las características farmacocinéticas de ciclosporina y de tacrolimus en los pacientes, se seleccionaron las siguientes variables farmacocinéticas:

- Dosis de fármaco administrada (D).
- Concentración en sangre del fármaco a las 2 horas de su administración para ciclosporina y concentración pre-dosis (o basal) para tacrolimus (C_2 y C_0 , para ciclosporina y tacrolimus, respectivamente).
- Concentración de fármaco en sangre relativa a la dosis administrada (C_2/D y C_0/D , para ciclosporina y tacrolimus, respectivamente).

3.3.1.1. Dosis de fármaco administrada

Todos los pacientes recibieron tratamiento inmunosupresor con ciclosporina o tacrolimus en monoterapia, con o sin corticoides, de acuerdo con el protocolo de inmunosupresión del Hospital Universitario de Bellvitge, que se detalla a continuación:

Ciclosporina: se inició con una pauta posológica inicial de 10 mg/kg/día (cada 12 horas) vía oral.

Posteriormente, la dosis se individualizó en función de los resultados de la concentración sanguínea, ajustando la C_2 al intervalo terapéutico.

Tacrolimus: se inició con una pauta posológica inicial de 0,2 mg/kg/día vía oral.

Posteriormente, la dosis se individualizó en función de los resultados de la concentración sanguínea, ajustando la C_0 al intervalo terapéutico.

Corticoides: Se administró una dosis intraoperatoria de 500 mg de 6-metilprednisolona por vía endovenosa, antes de la revascularización del injerto. A partir del día 1 post-trasplante y hasta el día 5, se administró una dosis única de 0,5 mg/kg/día de 6-metilprednisolona (vía endovenosa), en dosis decrecientes. La dosis de mantenimiento fue de 0,25 mg/kg/día de prednisona desde el día 5 y hasta el 30, y de 0,15 mg/kg/día entre los días 30 y 90. La retirada total de corticoides se realizó a partir del tercer mes post-trasplante.

3.3.1.2. Concentración del fármaco en sangre

Ciclosporina:

Se mide la concentración en sangre a las 2 horas de su administración (C_2). Su intervalo terapéutico se encuentra entre 800-1200 $\mu\text{g/L}$ para las 6 primeras semanas post-trasplante y entre 600-800 $\mu\text{g/L}$, a partir de la sexta semana post-trasplante.

Tacrolimus:

Se mide la concentración pre-dosis (basal o mínima) del fármaco en sangre (antes de la administración del fármaco). Su intervalo terapéutico se encuentra entre 10-15 $\mu\text{g/L}$ para las 6 primeras semanas post-trasplante y entre 5-10 $\mu\text{g/L}$, a partir de la sexta semana post-trasplante.

3.3.1.3. Concentración de fármaco en sangre relativa a la dosis administrada

Para medir la exposición del paciente a ciclosporina y tacrolimus se calcula la variable farmacocinética relación C_2/D y C_0/D , respectivamente.

Para su cálculo se divide la concentración de masa de fármaco en la sangre entre la dosis total diaria administrada dividida por el peso del paciente en el momento de la determinación farmacocinética, tal como se observa en las siguientes ecuaciones:

Para ciclosporina:

$$\text{Relación } C_2/D = \frac{C_2 \text{ Ciclosporina}}{\text{Dosis}}$$

Para tacrolimus:

$$\text{Relación } C_0/D = \frac{C_0 \text{ Tacrolimus}}{\text{Dosis}}$$

Donde:

C_2 : concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de ciclosporina en sangre a las 2 horas de su administración.

C_0 : concentración de masa ($\mu\text{g/L}$) de tacrolimus en sangre pre-dosis o basal.

Dosis: dosis diaria de fármaco (mg/kg/día).

3.3.2. Variables clínicas

Para poder estudiar la relación entre las variantes genéticas seleccionadas y el perfil de eficacia y seguridad del régimen inmunosupresor, en términos de profilaxis del rechazo agudo y aparición de efectos adversos, respectivamente, se seleccionan las siguientes variables clínicas:

3.3.2.1. Incidencia de rechazo agudo

La variable incidencia de rechazo agudo se incluye en el estudio como indicador de la eficacia del tratamiento. La presencia de rechazo agudo fue confirmada con biopsia.

3.3.2.2. Aparición de efectos adversos

Las variables que se incluyen en el estudio como indicadores de toxicidad son las siguientes:

- Neurotoxicidad: consiste en la aparición de síntomas neurológicos no explicados por otras causas, con pruebas de imagen compatibles y con mejoría parcial o total tras la disminución o retirada del fármaco.
- Nefrotoxicidad: valorada por la disminución del MDRD por debajo de 60 mL/min/1,73 m² atribuible al uso de anticalcineurínicos, descartando otras causas, y/o confirmada por biopsia.
- Hipertensión arterial: su aparición se asume por evidencia clínica, es decir, por un mal control de la tensión arterial tras el trasplante que requiere incrementar el número de fármacos antihipertensivos. Se considera que existe hipertensión cuando la presión arterial sistólica supera los 140 mmHg, y la diastólica supera los 90 mmHg, o cuando se está en tratamiento con fármacos antihipertensivos.
- Diabetes mellitus de novo: Aparición de DM *de novo* tras el trasplante, con concentraciones de glucosa basal superiores a 7 mmol/L (166) o HbA1c% superior a 6,5% (166) que requiere tratamiento con antidiabéticos orales o insulina.

Además, se estudia el siguiente efecto adverso para valorar si podría ser un indicador de toxicidad:

- Recidiva VHC: Alteración de las magnitudes relacionadas con la función hepática, además de la cuantificación del VHC en suero, excluyendo otras causas y confirmado con biopsia hepática compatible.

Con el estudio de este indicador se pretende valorar si existe alguna relación entre la presencia de recidiva de VHC en el órgano trasplantado, y alguna de las variantes genéticas estudiadas.

En el estudio de los indicadores de toxicidad, se han descartado los pacientes con comorbilidades previas al trasplante hepático, tales como nefrotoxicidad, diabetes *mellitus* e hipertensión arterial.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Obtención de la muestra y principios de medida de las magnitudes relacionadas con el seguimiento del paciente trasplantado

Las muestras de los pacientes se obtuvieron mediante punción venosa. En el caso del suero, se recogió la sangre en un tubo sin ningún aditivo y con gel separador. Se esperó a la retracción del coágulo, se centrifugó a 2000 g durante 12 minutos a una temperatura entre (18-22) °C, y se obtuvo el suero. En el caso del plasma, se recogió la sangre en un tubo EDTA-K3, se centrifugó a 2000 g durante 12 minutos a temperatura entre (18-22) °C, y se separó el plasma en un tubo para proceder a su conservación entre (-10 – (-20)) °C hasta su procesamiento. En el caso de la sangre, se recogió en un tubo con EDTA-K3 como aditivo.

La extracción se realizó siempre a primera hora de la mañana tras ocho horas de ayuno, y la determinación de las magnitudes bioquímicas se realizó el mismo día de la extracción (excepto en el caso de la carga viral del VHC).

Los principios de medida empleados son los siguientes:

- Srm—Creatinina; c.subst. ($\mu\text{mol/L}$)
Espectrometría de absorción molecular a 505 y 570 nm. Procedimiento de lectura a diferentes puntos a 37 °C. Método de Jaffé, sin desproteinización, con blanco de muestra y compensado. El método se ha estandarizado por IDMS (*Isotopic Dilution Mass Spectrophotometry*).
- Srm—Glucosa; c.subst. (mmol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 340 y 700 nm, con el método enzimático de referencia empleando hexoquinasa.
- Srm—Alanina-aminotransferasa; c.cat. ($\mu\text{kat/L}$)
Espectrometría de absorción molecular a 340 y 700 nm. Este procedimiento sigue las recomendaciones de la IFCC.
- Srm—Aspartato-aminotransferasa; c.cat. ($\mu\text{kat/L}$)
Espectrometría de absorción molecular a 340 y 700 nm. Este procedimiento sigue las recomendaciones de la IFCC.
- Srm— γ -Glutamilttransferasa; c.cat. ($\mu\text{kat/L}$)

Espectrometría de absorción molecular a 415 y 700 nm. Procedimiento de lectura en diferentes puntos a 37 °C, empleando como sustrato la γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida.

- Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat. (μ kat/L)
Espectrometría de absorción molecular a 450 y 480 nm. Procedimiento de lectura en diferentes puntos a 37 °C y pH=10,4, empleando como sustrato el p-nitrofenilfosfato.
- Srm—Bilirrubina; c.subst. (μ mol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 546 y 600 nm. Utiliza el ión diazonio que, a pH ácido y con un disolvente se acopla a la bilirrubina.
- Srm—Urea; c.subst. (mmol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 340 y 700 nm. Reacción de la ureasa-glutamato deshidrogenasa.
- Srm—Albúmina; c.subst. (μ mol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 570 y 505 nm con el método del Verde de bromocresol.
- Srm—Colesterol; c.subst. (mmol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 505 y 700 nm. Reacción de la colesterol esterasa/colesterol oxidasa/peroxidasa.
- Srm—Triglicéridos; c.subst. (mmol/L)
Espectrometría de absorción molecular a 505 y 700 nm. Reacción de la Glicerol-fosfato-oxidasa y peroxidasa.
- San—Hemoglobina; c.masa (g/L)
Espectrometría. Lectura de absorbancia a 540 nm por el método de la cianmetahemoglobina. Analizador Pentra (ABX).
- San—Leucocitos; c.num. ($\times 10^9$ /L)
Citometría de flujo por Impedanciometría. Analizador Pentra (ABX).
- San—Plaquetas; c.num. (1/L)
Citometría de flujo por Impedanciometría. Analizador Pentra (ABX).

Las medidas de las magnitudes en suero se llevaron a cabo en el analizador Modular System (Roche Diagnostics) hasta septiembre de 2009. Posteriormente este analizador fue sustituido por el Cobas c711 (Roche Diagnostics), por lo que antes de comenzar a utilizarse para la medida de las diferentes magnitudes bioquímicas se

verificó la intercambiabilidad entre ambos. Los principios de medida empleados son los mismos en ambos analizadores.

- Srm—ARN Virus Hepatitis C (detección cuantitativa por PCR a tiempo real); carga vírica (UI/mL)

La medida cuantitativa en suero de la carga viral del VHC se llevó a cabo mediante el kit LCx HCV RNA assay (Abbott). Dicho kit utiliza la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa para la cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma humano. Para hacer dicha cuantificación comparable entre los diferentes métodos, el Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos y la Organización Mundial de la Salud desarrollaron y certificaron un patrón estándar para medir el ARN del VHC en unidades internacionales (UI) (167).

- Hb(san)—Hemoglobina A1c; fr.subst. (%)

Cromatografía en fase líquida de alta eficacia en gradiente. La detección de las diferentes fracciones eluidas se realiza leyendo las absorbancias a 415 nm mediante espectrometría de absorción molecular. El cálculo del porcentaje de la hemoglobina A1c (HbA1c) respecto a la hemoglobina, se hace dividiendo el área de integración del pico correspondiente de la HbA1c por el área total del cromatograma.

La medida en sangre de la HbA1c se llevó a cabo en el equipo HI-AutoA1C HA-8140 (Menarini-Arkray) hasta septiembre de 2004. Posteriormente este equipo fue sustituido por el Adams HI-AutoA1c 8160 (Menarini), por lo que antes de comenzar a utilizarse se verificó la intercambiabilidad entre ambos. Los principios de medida empleados son los mismos en ambos equipos.

3.4.2. Obtención de la sangre y principios de medida de las magnitudes farmacológicas.

La sangre de los pacientes se obtuvo mediante punción venosa, recogiendo la sangre en un tubo con EDTA-K3 como aditivo. La extracción se realizó a primera hora de la mañana: antes de la administración del fármaco para la determinación de tacrolimus (pre-dosis), y 2 horas después de la administración del fármaco para la determinación de ciclosporina.

Los principios de medida empleados fueron los siguientes:

- San—Ciclosporina; c.masa. (a los 120 min de su administración) ($\mu\text{g/L}$)

Enzimoimmunoanálisis homogéneo competitivo (EMIT: *Enzyme-Multiplied Immunoassay Technique*). El fármaco marcado se une a un anticuerpo específico produciendo la inhibición de la enzima por impedimentos estéricos. En presencia de fármaco en la muestra, se une a los anticuerpos específicos quedando la enzima libre, que reacciona con el fármaco generando un producto coloreado (intensidad de señal directamente proporcional a la concentración de fármaco en la muestra).

- San—Tacrolimus; c.masa. ($\mu\text{g/L}$)

Enzimoimmunoanálisis por micropartículas (MEIA: *Microparticle Enzyme Immunoassay*). Emplea micropartículas de látex como soporte para el anticuerpo específico. Cuando éste se une al fármaco marcado, se produce un conjugado que genera fluorescencia a través de una reacción enzimática. En presencia de fármaco en la muestra, se une a los anticuerpos específicos inhibiendo la formación del conjugado que reacciona con la enzima (intensidad de señal inversamente proporcional a la concentración de fármaco en la muestra).

La medida en sangre de ciclosporina y tacrolimus se llevó a cabo en el analizador Cobas Mira (Roche Diagnostics) y en el analizador IMX (Abbott), respectivamente.

3.4.3. Obtención del ADN y amplificación por PCR

Muestras de sangre:

Se extrajo el ADN a partir de una muestra de sangre obtenida en un tubo con EDTA-K3 como anticoagulante mediante punción venosa. Las muestras se conservaron entre (2-8) °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN (como máximo una semana tras la obtención de la muestra).

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el sistema High Pure™ PCR Template Preparation Kit; Roche 1796828. El protocolo de extracción de ADN es el siguiente:

1. Se lisan las células de 200 μL de sangre mediante la incubación con 200 μL de una mezcla de guanidina-HCl 6 M, urea 10 mM, Tris HCl 10 mM, 20% Tritón X-100 (v/v) a pH=4,4 y 40 μL de proteinasa K que permite la inactivación de la

- DNAsa endógena. Se agita en un vórtex y se incuba a 70°C en el baño durante 10 minutos.
2. El equipo proporciona unos tubos que tienen una capa de fibra de vidrio, en la que se fijan los ácidos nucleicos mediante la adición de 100 µL de isopropanol. Se traspasa el contenido del tubo al correspondiente tubo con filtro, colocado sobre un tubo colector y se centrifugan los tubos durante 1 minuto a 9000 rpm. Se pasa el tubo con filtro a un nuevo tubo colector y se desecha el usado.
 3. Se realiza un lavado con 500 µL de guanidina-HCl 5 M, Tris HCl 20 mM a pH=6,6 en etanol para eliminar los contaminantes inhibidores de la PCR. Se repite la centrifugación y se desecha el filtrado.
 4. Se realizan dos lavados con 400 µL NaCl 20 mM, Tris HCl 2 mM, a pH= 7,5 en etanol para liberar a los ácidos nucleicos de sales, proteínas y otras impurezas celulares. En cada ocasión, se repite la centrifugación y se desecha el filtrado.
 5. El ADN se eluye de la fibra de vidrio con 200 µl una solución de Tris HCl 10 mM, a pH de 8,5.

Muestras de tejido parafinado:

Para la extracción del ADN de células de tejido parafinado, se empleó principalmente tejido procedente de vesícula biliar, y excepcionalmente de páncreas. Se utilizó el equipo High Pure™ PCR Template Preparation Kit; Roche 1796828, basado en un sistema manual de separación de tubos con filtro, cuyo protocolo fue modificado y optimizado (el protocolo de base es el mismo que para las muestras de sangre). El protocolo empleado fue el siguiente:

1. Se elimina la parafina de 2 cortes de 2-3 µm de grosor procedentes del bloque de tejido parafinado, mediante una primera incubación con xilol y dos posteriores con etanol absoluto.
2. El pellet se seca en un termobloque a 56°C durante 15 minutos, para evaporar el etanol restante.
3. Los cortes de tejido son disgregados y lisados mediante incubación con 180 µL de la solución tampón de lisis y 70 µL de proteinasa K. Se agita en un vórtex.
4. Se incuban en un termobloque con agitación a 56°C y 1100 rpm, durante 1 hora.
5. Posteriormente se incuban en un termobloque a 90°C durante 1 hora.

6. Se acaban de lisar las células mediante la incubación con 200 μ L de una mezcla de guanidina-HCl 6 M, urea 10 mM, Tris HCl 10 mM, 20% Tritón X-100 (v/v) a pH=4,4 y 40 μ L de proteinasa K que permite la inactivación de la DNAsa endógena. Se agita en un vórtex y se incuba a 70°C en el baño durante 10 minutos.
7. El equipo proporciona unos tubos que tienen una capa de fibra de vidrio, en la que se fijan los ácidos nucleicos mediante la adición de 100 μ L de isopropanol. Se traspasa el contenido del tubo al correspondiente tubo con filtro, colocado sobre un tubo colector y se centrifugan los tubos durante 1 minuto a 9000 rpm. Se pasa el tubo con filtro a un nuevo tubo colector y se desecha el usado.
8. Se realiza un lavado con 500 μ L de guanidina-HCl 5 M, Tris HCl 20 mM a pH=6,6 en etanol para eliminar los contaminantes inhibidores de la PCR. Se repite la centrifugación y se desecha el filtrado.
9. Se realizan dos lavados con 400 μ L NaCl 20 mM, Tris HCl 2 mM, a pH= 7,5 en etanol para liberar a los ácidos nucleicos de sales, proteínas y otras impurezas celulares. En cada ocasión, se repite la centrifugación y se desecha el filtrado.
10. El ADN se eluye de la fibra de vidrio con 100 μ l una solución de Tris HCl 10 mM, a pH de 8,5 y previamente calentado a 70°C.

Para verificar que las extracciones, tanto procedentes de muestras de sangre como de tejido parafinado, se habían realizado correctamente, se corrieron los productos de ADN en un gel de agarosa estándar al 1% que se tiñó con bromuro de etidio y se iluminó con luz UV para visualizar las bandas de ADN.

Una vez extraído, el ADN se guardó congelado a -80°C hasta el estudio de las variantes genéticas.

Esquema general:

En la figura 10 se puede ver el procedimiento general seguido para analizar las muestras que llegaron al Área de Bioquímica y Biología Molecular del Laboratori Clínic del Hospital Universitari de Bellvitge.

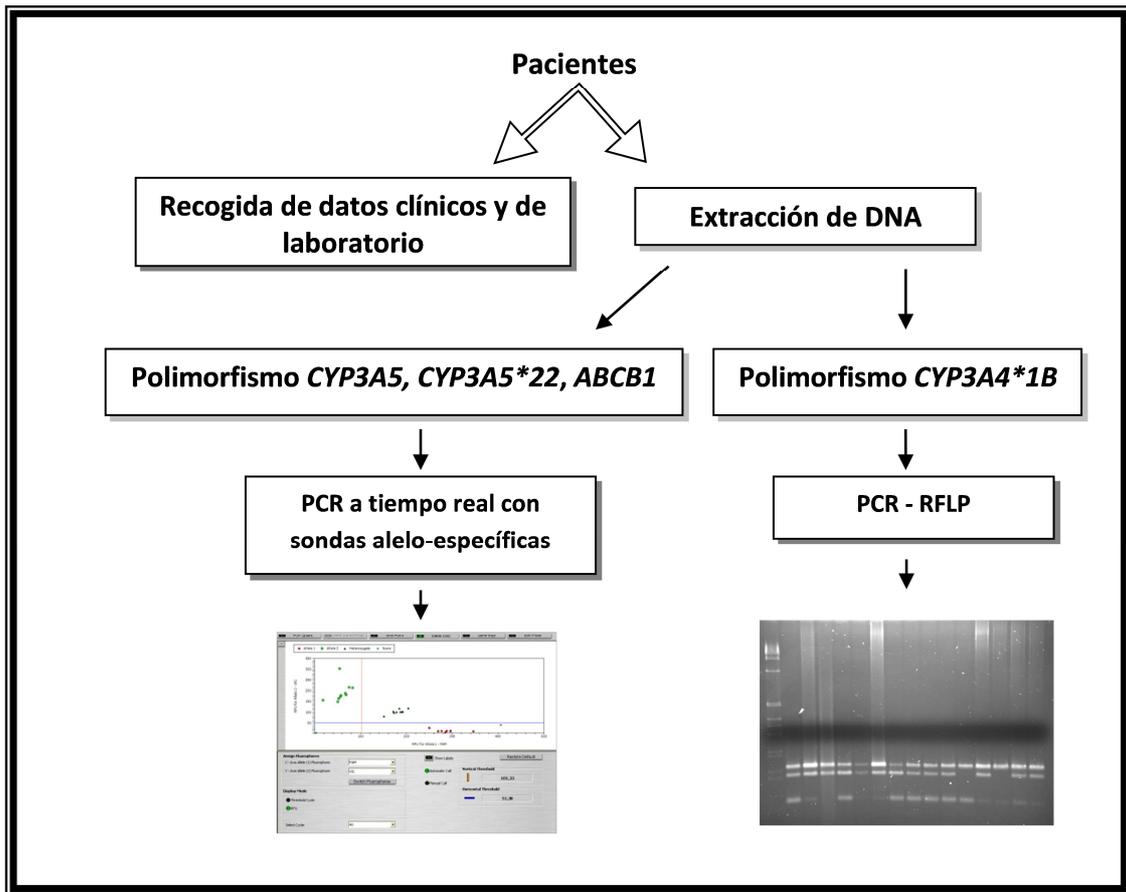


Figura 10. Esquema de los métodos empleados

3.4.3.1. PCR-RFLP

El estudio del SNPs del gen *CYP3A4*1B* (rs2740574; c.-392A>G), se realizó mediante amplificación por PCR clásica seguida de digestión con enzimas de restricción y separación por electroforesis de los fragmentos obtenidos (RFLP).

*CYP3A4*1B* (rs2740574; c.-392A>G)

En primer lugar se lleva a cabo la reacción de amplificación por PCR empleando los siguientes cebadores:

Cebador A: 5´-GGA CAG CCA TAG AGA CAA CTG CA -3´

Cebador B: 5´-CTT TCC TGC CCT GCA CAG -3´

Estos cebadores permiten amplificar un fragmento de ADN de 334 pb e introducen una diana para la enzima de restricción Pst I.

La mezcla de reacción empleada para un volumen final de 25 μL es:

- Supermix (2x) 12,5 μL
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 2 μL
- Cebador A (100 $\mu\text{mol/L}$) 0,25 μL
- Cebador B (100 $\mu\text{mol/L}$) 0,25 μL
- Agua estéril 5 μL
- Muestra de ADN 5 μL

La Supermix (*iQTM Supermix, Bio-Rad*) es un tampón que contiene la polimerasa (iTaQ DNA polymerase), dNTPs, MgCl_2 6 mM y estabilizadores.

Se emplea el termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) y el siguiente programa de PCR:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	94°C	5 min
	94°C	20 s
35x	55°C	30 s
	72°C	30 s
1x	72°C	5 min
1x	12°C	∞

El producto de 334 pb se somete a electroforesis en un gel de agarosa estándar al 1,5% y se tiñe con bromuro de etidio, para verificar que se obtenga producto tras la amplificación. Tras esto, se lleva a cabo su digestión con la enzima de restricción Pst I durante toda la noche a 37°C.

Para realizar la digestión se prepara la siguiente mezcla:

- Tampón H (10X) 1,2 μL
- Enzima Pst I 0,5 μL

- Producto de ADN 10 μ L

Los fragmentos obtenidos tras la digestión corresponden a los tamaños:

- Homocigoto normal $*1/*1$ (AA): 223+78+33 pb
- Homocigoto mutado $*1B/*1B$ (GG): 200+78+33+23 pb
- Heterocigoto $*1/1B$ (AG): 223+200+78+33+23 pb

Los fragmentos obtenidos son sometidos a una electroforesis en gel de agarosa estándar a una concentración del 2%, y posteriormente el gel se tiñe con bromuro de etidio para poder visualizarlo con luz UV (se muestra un ejemplo en la figura 11).

En el gel, los fragmentos de 33 y 23 pb no se observan, debido a su pequeño tamaño, pero su detección no es necesaria para la identificación de los genotipos de las muestras.

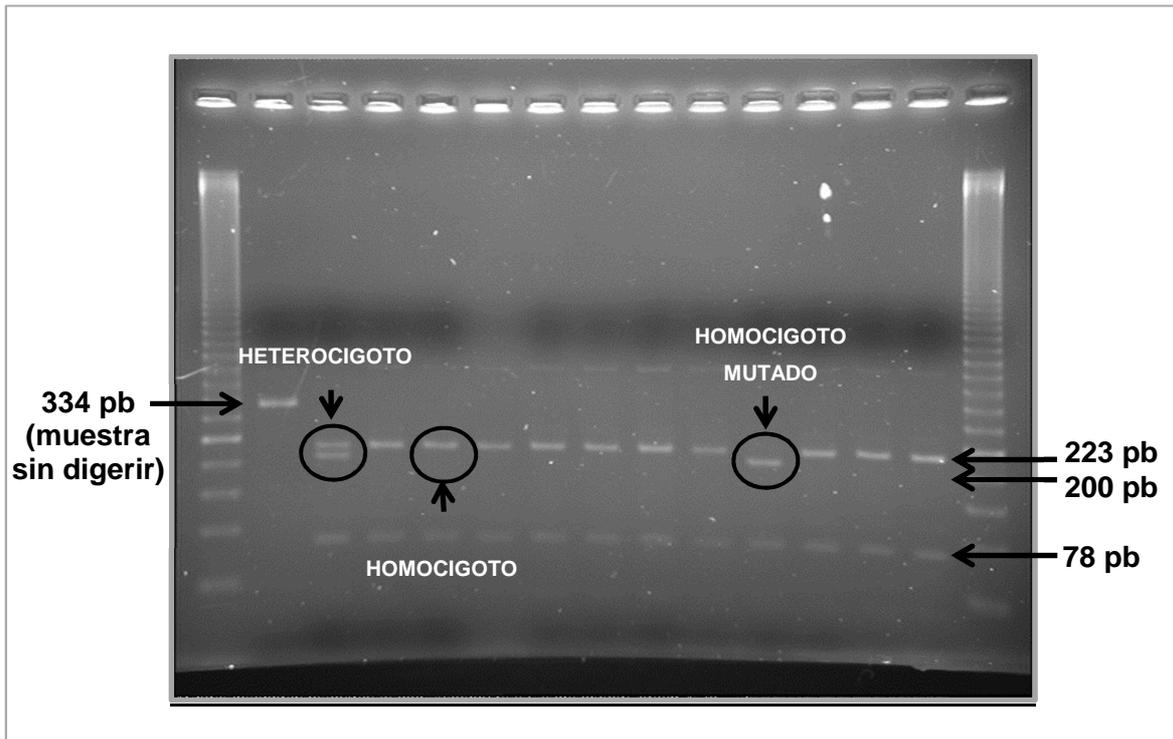


Figura 11: Genotipos posibles del SNP *CYP3A4*1B*.

3.4.3.2. PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas

Se denomina PCR a tiempo real al tipo de amplificación de ADN que permite seguir el proceso mientras ocurre, lo cual se consigue incorporando a la reacción fluorocromos

que al ser excitados emiten luz a diferentes longitudes de onda. En este estudio se empleó esta tecnología para detectar SNPs con sondas alelo-específicas marcadas.

Se emplearon sondas Taqman® (Applied Biosystem). Estas sondas son secuencias complementarias diseñadas una para reconocer el alelo normal y otra el alelo mutado, que se añaden a la mezcla de reacción de la PCR e hibridan perfectamente con el fragmento de ADN correspondiente.

Cada sonda contiene el flourocromo en posición 5' y un atenuador o quencher en el extremo 3'. El atenuador es una molécula que impide la emisión de luz por el flourocromo, de manera que mientras la sonda está en la mezcla de reacción o unida al ADN no se emite fluorescencia. Al llevarse a cabo la PCR, la polimerasa se une al ADN monocatenario y comienza la copia de la cadena, por lo que degrada y libera la sonda, produciéndose la emisión de la fluorescencia, que es detectada. Esta fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN amplificado.

Para el estudio de cada SNP se emplean dos sondas, cada una de ellas marcada con un flourocromo que emite luz a diferente longitud de onda, por lo que se puede identificar el genotipo. En este estudio, los fluorocromos son FAM® y VIC®.

El estudio de las variantes de los genes *CYP3A5*, *CYP3A4*22* y *ABCB1* se llevó a cabo con el termociclador iCycler con módulo iQ™5 (Multicolor Real-time PCR Detection System, Biorad).

Se empleó la siguiente mezcla de reacción de la PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas en un volumen final de 10 µL:

- Supermix (2x) 5 µL
- TaqMan Validated SNP Genotyping Assay (20x) 0,5 µL
- Muestra de ADN 4,5 µL

La Supermix (*iQ™ Supermix, Bio-Rad*) es un tampón que contiene la polimerasa (*iTaq DNA polymerase*), dNTPs, MgCl₂ 6 mM y estabilizadores. El reactivo *TaqMan Validated SNP Genotyping Assay Mix* (Applied Biosystems) contiene los cebadores y las sondas específicas para cada SNP, marcadas con los fluorocromos FAM® y VIC® y los quenchers. No se conocen las secuencias de las sondas y cebadores, ya que la casa comercial no las proporciona.

A continuación, se expone el perfil térmico empleado para la PCR, así como la base reconocida por cada una de las sondas marcadas con fluorocromos para cada polimorfismo.

Programa

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1x	95°C	10 min
40x	92°C	15 s
	60°C	1 min
1x	15°C	1 min

Marcaje de las sondas

Variante	Fluorocromo	Base reconocida
CYP3A5 (c.6986A>G)	VIC®	A
	FAM®	G
CYP3A4 (c.522-191C>T)	VIC®	C
	FAM®	T
ABCB1 (c.3435C>T)	VIC®	T
	FAM®	C
ABCB1 (c.2677G>A)	VIC®	G
	FAM®	A
ABCB1 (c.2677G>T)	VIC®	G
	FAM®	T

3.4.3.3. Interpretación de resultados de PCR a tiempo real con sondas alelo-específicas.

En el termociclador iCycler la interpretación de los resultados se realiza con el programa informático iQ5 2.0 (Standard Edition Optical System Software V2.0, Bio-Rad).

Al final de cada ciclo de PCR se mide la señal de fluorescencia emitida. Se puede medir la emisión de fluorescencia mediante las URFs (unidades relativas de fluorescencia) o mediante ΔR , cambio normalizado de fluorescencia. Las URF se obtienen dividiendo la fluorescencia final entre la basal o fluorescencia inespecífica, y el ΔR es la diferencia desde la línea base a la máxima fluorescencia alcanzada. El gráfico de resultados de iCycler muestra las URFs de cada sonda (figura 12). Para cada muestra se miden las URF o ΔR de FAM y VIC, de manera que en función de la fluorescencia emitida por cada sonda se pueden clasificar los genotipos. Si ambos fluorocromos emiten fluorescencia de similar intensidad se trata de un paciente heterocigoto, y si mayoritariamente sólo emite uno de ellos, homocigoto. En las imágenes se puede ver que si se divide la gráfica en 4 partes, en el cuadrante inferior derecho se encuentran los homocigotos normales, en el cuadrante superior derecho se encuentran los casos en que ambas sondas emiten fluorescencia a similar intensidad, tratándose de heterocigotos. En el cuadrante superior izquierdo se sitúan los homocigotos mutados y en el cuadrante inferior izquierdo se encuentra una muestra sin amplificación (muestra sin ADN). Ésta última no debe emitir fluorescencia ya que de ser así podría tratarse de una señal inespecífica o de contaminación de la reacción.

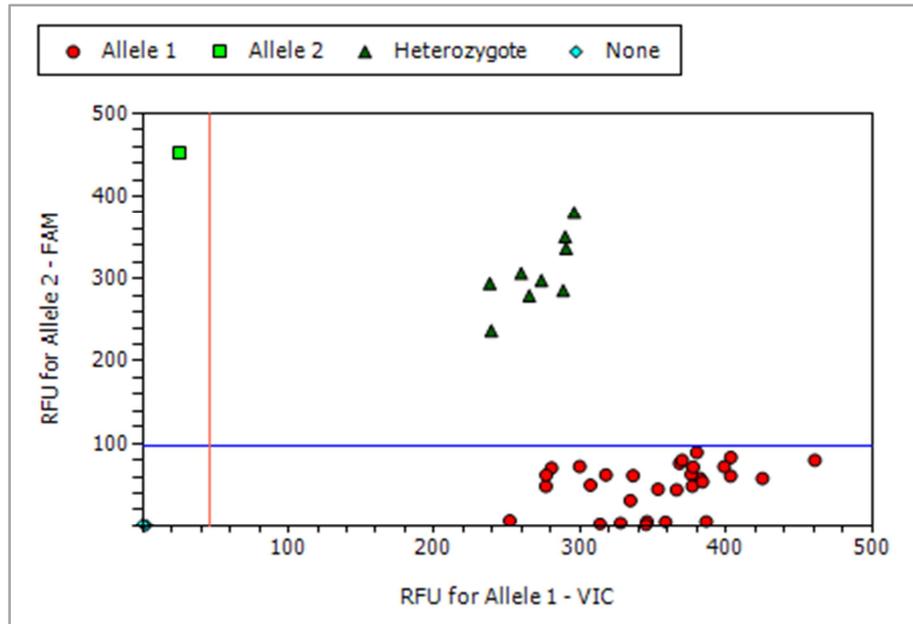


Figura 12: Resultados de iCycler. Se representa las URF de FAM frente a las URF de VIC.L os círculos rojos son los homocigotos normales, el cuadrado verde el homocigoto mutado y los triángulos verdes los heterocigotos. El círculo azul corresponde a una muestra de agua, que no se amplifica porque no hay ADN.

3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

3.5.1. Prevalencia de las variantes seleccionadas en los receptores y en los donantes de los órganos trasplantados

Se realiza un análisis descriptivo de frecuencias de cada genotipo para cada polimorfismo, tanto en donantes como en receptores, en el grupo de pacientes tratados con ciclosporina y en el grupo de pacientes tratados con tacrolimus. Además se estudia el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg.

3.5.2. Estudio de las variables farmacocinéticas

3.5.2.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables farmacocinéticas.

El estudio se realiza en el grupo de pacientes tratados con ciclosporina y en el grupo tratado con tacrolimus.

Análisis descriptivo

Se describen los datos mediante la media y desviación estándar de la dosis (D), la concentración (C) y la relación concentración/dosis (C/D) en los días 3, 7, 14, 30 y 90, para los portadores y los no portadores de las variantes genéticas estudiadas, tanto en donantes como en receptores. Para tener una representación más visual, se obtienen gráficas longitudinales que nos permiten tener una visión global de lo que ocurre a lo largo del tiempo.

Inferencia estadística

Dado que las variables concentración y dosis se recogen en diferentes momentos a lo largo de tres meses, se evalúan las diferencias entre genotipos (portador vs no portador) para cada SNP con un modelo lineal mixto (modelo de medidas repetidas que puede incluir efectos aleatorios y fijos). Este modelo incorpora la interdependencia de las observaciones de un mismo individuo en diferentes momentos (ya que las mediciones realizadas a un mismo paciente a lo largo del tiempo están relacionadas), incluyendo al individuo en sí como un efecto aleatorio (mediante algoritmos matemáticos) (168). El modelo incluye, como efectos fijos, el SNP, el tiempo y la interacción entre ambos. Si la interacción no es significativa ($p\text{-int} > 0,05$) nos indicaría, en caso de que el SNP tuviese un efecto significativo ($p\text{-snp} < 0,05$), que este efecto es constante en el tiempo. Si por el contrario, la interacción resulta significativa, indica que el efecto del SNP sobre la concentración es diferente en función del momento en el que se recoge esta medida.

El uso del modelo mixto permite evaluar simultáneamente si el SNP tiene algún efecto, y si este efecto es constante a lo largo del tiempo. Esto ayuda a ganar potencia estadística frente a otras estrategias más clásicas que se basan en pruebas independientes calculadas para cada momento del tiempo.

3.5.2.2. Estudio multivariante de medidas repetidas para las variables farmacocinéticas

El objetivo principal de este modelo es analizar si se mantiene o no la significación estadística de la influencia de los SNPs sobre las variables farmacocinéticas, después de incluir las variables confusoras. Este modelo, al igual que los comentados

anteriormente, también contempla la dependencia de las observaciones en diferentes momentos de un mismo individuo, incluyendo al individuo como efecto aleatorio.

Para la elección del modelo multivariante se procede de la siguiente manera:

1. Sólo se consideran los polimorfismos que en el estudio univariante tienen un valor p inferior a 0,2 ($p < 0,2$).
2. Se incluyen en el estudio las siguientes variables demográficas y clínicas (covariables o posibles variables confusoras): edad, sexo, peso, indicación del trasplante, presión arterial, y las siguientes magnitudes bioquímicas medidas previamente al trasplante (albúmina, creatinina, urea, MDRD, colesterol, triglicéridos y glucosa en suero; y leucocitos, hemoglobina, plaquetas y hemoglobina glicosilada en sangre).
3. Se realizan análisis univariantes para las potenciales covariables (o variables confusoras):
 - Correlación de Spearman para las covariables continuas.
 - ANOVA / test t de Student para las covariables categóricas.
4. Se consideran incluibles en el modelo las covariables que a nivel univariante tienen un valor p inferior a 0,2 ($p < 0,2$).
5. Se construye un modelo multivariante de medidas repetidas inicial con las variables que cumplen los apartados 1 y 4. El modelo de medidas repetidas incorpora la dependencia de las observaciones en diferentes momentos de un mismo individuo en el modelo, incluyendo el individuo como efecto aleatorio.
6. Se hace un análisis paso a paso eliminando en cada paso aquella variable con aporte insignificante en el modelo.

3.5.2.3. Efecto de la interacción conjunta de dos polimorfismos sobre las variables farmacocinéticas.

Para llevar a cabo una primera evaluación (a modo de cribado) de la interacción (epistasia) entre los efectos de cada pareja de SNPs se utilizan los tests de razón de verosimilitudes (*likelihood ratio tests*). Estas pruebas estadísticas se presentan en forma de gráficas que permiten seleccionar las interacciones de SNP que han resultado significativas según la escala de color, para posteriormente realizar el estudio específico de interacción (mediante un modelo lineal mixto) y observar la tendencia de dicha interacción.

El modelo de los test de razón de verosimilitud consiste en que, para cada par de SNPs (i, j), se calcula la verosimilitud del modelo nulo L_0 (ausencia de efecto); la verosimilitud de cada uno de los SNPs por separado $L(i)$ y $L(j)$; la verosimilitud de un modelo de SNPs aditivo $L_a(i, j)$; y la verosimilitud bajo un modelo que incluye la interacción SNP_i-SNP_j , $L_f(i, j)$. Se construyen gráficas que permiten visualizar todos los resultados simultáneamente. En ellas se representan los valores p mediante una gama de verdes: cuanto más oscuros, mayor significación estadística (el valor p de cada cuadrado es el correspondiente a cada test de verosimilitud). En la figura 13 se muestra una imagen de dicha gráfica a modo de ejemplo.

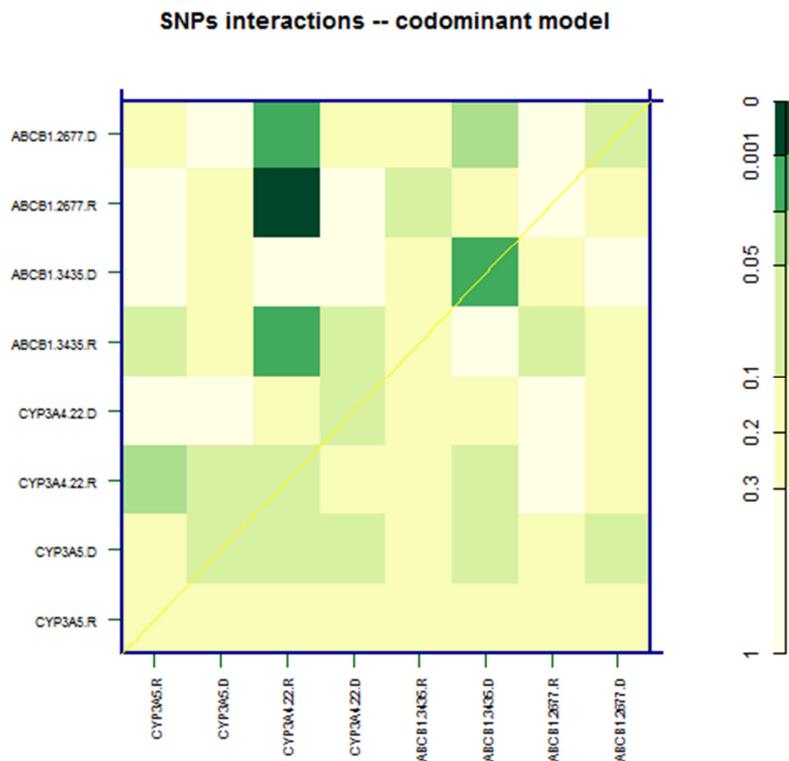


Figura 13. Ejemplo de gráfica de los test de razón de verosimilitud, donde se muestra cómo los valores p se representan mediante una gama de verdes, y el valor p de cada cuadrado es el correspondiente a cada test de verosimilitud.

En resumen, en estas gráficas se obtienen 3 tipos de análisis:

1.- La diagonal del gráfico que representa los valores p del efecto de cada SNP de forma individual sobre la variable de estudio (dosis, concentración o concentración/dosis).

2.- El triángulo inferior que contiene los valores p del análisis aditivo de pares de SNPs (no estudiado en el presente trabajo, pero se menciona por deferencia al aparecer en las gráficas).

3.- El triángulo superior que contiene los valores p del análisis para la interacción (epistasia) entre los pares de SNPs (es el análisis empleado en el presente trabajo).

Esta es una forma rápida de identificar potenciales interacciones significativas. Los valores p en las gráficas de los test de razón de verosimilitudes usan los datos medidos en cada momento del tiempo como si fueran independientes, y tienden a ser inferiores al valor p corregido por la dependencia de las observaciones de un mismo paciente medidos en diferentes momentos. Puesto que las interacciones con valores p superiores a 0,05 no serán significativas cuando se corrijan por la dependencia de los datos, permite descartar muchos estudios específicos de interacción.

A las interacciones entre SNPs significativas se les realiza un estudio específico de interacción mediante un modelo lineal mixto. Se obtienen unas gráficas que muestran la tendencia de dicha interacción entre las diferentes combinaciones de genotipos.

3.5.3. Estudio de las variables clínicas

3.5.3.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables clínicas.

Para evaluar dicha relación, se emplea el test exacto de Fisher. Los efectos, además, se ven representados de forma gráfica en la diagonal de las figuras que se explican en el apartado 3.5.2.2.

3.5.3.2. Efecto de la interacción conjunta de dos polimorfismos sobre las variables clínicas.

Se realiza el análisis de interacción de pares de polimorfismos con las variables clínicas mencionadas en el apartado 3.3.2. La estrategia empleada es la misma que la utilizada y explicada en detalle en el apartado 3.5.2.2.

3.5.4. Otros test estadísticos empleados

Para las comparaciones entre dos grupos se empleó el test t de Student para las variables que se ajustasen a una distribución gaussiana, y el de U de Mann-Whitney para las que no. Para el cálculo de las prevalencias genotípicas se analizó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para todos los análisis estadísticos se usa como nivel de significación un 5%. Todos los análisis se han hecho con SPSS versión 20 y R versión 2.15.1 (169).

3.6. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Para obtener los resultados de las magnitudes bioquímicas de los pacientes se empleó el programa de laboratorio Omega 3000 (Roche Diagnostics). Para recoger la información clínica se consultó la historia clínica del paciente en la estación de trabajo clínica del hospital (SAP) y las historias clínicas en formato papel de la Unidad de Trasplante Hepático (UTH). Además también se utilizaron los datos clínicos, analíticos e histológicos (recogidos de forma prospectiva durante el seguimiento de los pacientes con THO) en la base de datos informatizada Europa perteneciente a la UTH.

Para la interpretación de los resultados de PCR a tiempo real se trabajó con el programa iQ5 2.0 (Standard Edition Optical System Software V2.0, Bio-Rad).

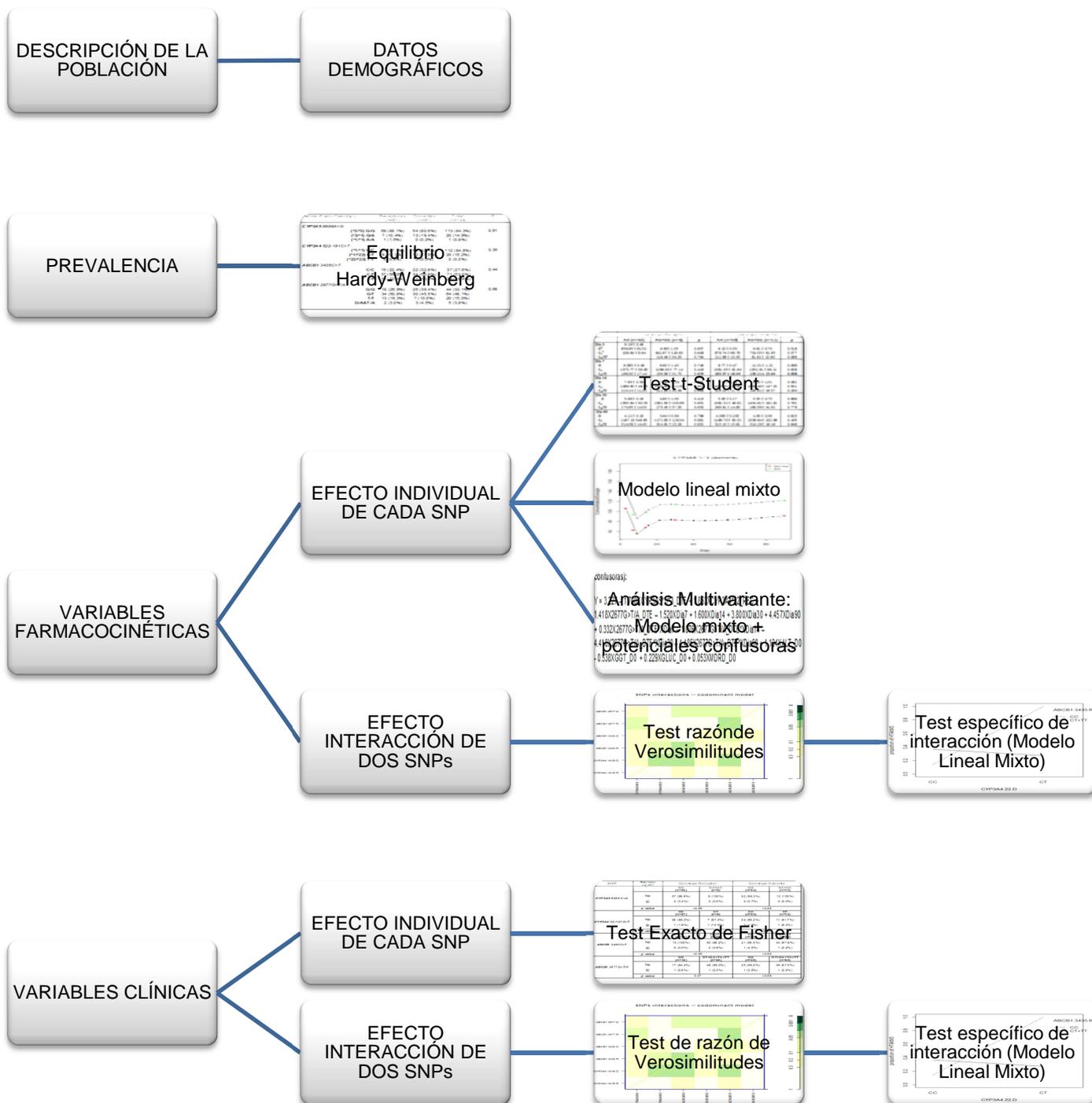
Para el estudio estadístico se empleó el programa SPSS versión 20 y el programa estadístico R, software versión 2.15.1 (169).

3.7. DIRECCIONES DE INTERNET

Toda la información relativa a los polimorfismos en estudio proviene de la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI)- National Institutes of Health (NIH) de Estados Unidos: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

4. Resultados

ESQUEMA DE LA PRESENTACIÓN DE LOS RESULTADOS



4.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Datos demográficos

Las características demográficas de la población estudiada se representan en las tablas 7 y 8, donde la edad (variable continua) se expresa en forma de media y desviación estándar, ya que la prueba de Kolmogorov-Smirnov constató que seguía una distribución normal, y el sexo (variable categórica) se expresa en forma de frecuencias (%).

Tabla7. Datos demográficos de los pacientes receptores en el grupo CSA.

Tamaño muestral	n=69
Edad, años (media \pm SD)	55,2 \pm 9,1
Sexo:	
Masculino	52 (75,4%)
Femenino	17 (24,6%)
Inmunosupresión	CSA \pm Prednisona
Prednisona 90 d (% S/N)	56/44
Tipo de Donante:	
Donante cadáver	68 (99%)
Donante vivo (dominó)	1 (1%)
Enfermedad original (indicación TH):	
Cirrosis hepática enólica	26 (38%)
Cirrosis hepática VHC	26 (38%)
Cirrosis hepática enólica + VHC	4 (6%)
Cirrosis biliar primaria	1 (1%)
Cirrosis biliar secundaria	2 (3%)
Cirrosis hepática VHB	6 (9%)
Hepatitis fulminante	3 (4%)
Cirrosis hepática criptogénica	1 (1%)
Raza	Caucásica

Tabla 7. SD: desviación estándar; d: días; S: sí; N: no; CSA: ciclosporina; TH: trasplante hepático; VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B.

- Grupo CSA (pacientes tratados con ciclosporina \pm prednisona), con un total de 69 pacientes seleccionados (de los 375 potenciales de los que se partía). La población seleccionada es de origen caucásico, con una media de edad de $55,2 \pm 9,1$ años (hombres 75,4 % (n=52) y mujeres 24,6 % (n=17) (tabla 7).
- Grupo TAC (pacientes tratados con tacrolimus \pm prednisona), con un total de 67 pacientes seleccionados (de los 154 potenciales de los que se partía). La población seleccionada es de origen caucásico, con una media de edad de $54,1 \pm 10,8$ años (hombres 70,1 % (n=47) y mujeres 29,9 % (n=20)) (tabla 8).

Tabla 8. Datos demográficos de los pacientes receptores en el grupo TAC.

Tamaño muestral	n=67
Edad, años (media \pm SD)	54,1 \pm 10,8
Sexo:	
Masculino	47 (70,1%)
Femenino	20 (29,9%)
Inmunosupresión	TAC \pm Prednisona
Prednisona 90 d (% S/N)	79/21
Tipo de Donante:	
Donante cadáver	65 (97%)
Donante vivo (dominó)	2 (3%)
Enfermedad original (indicación TH):	
Cirrosis hepática enólica	18 (27%)
Cirrosis hepática VHC	31 (46%)
Cirrosis hepática enólica + VHC	5 (7%)
Cirrosis biliar primaria	2 (3%)
Cirrosis biliar secundaria	2 (3%)
Cirrosis hepática VHB	1 (1%)
Hepatitis fulminante	2 (3%)
Polineuropatía amiloidótica familiar	3 (5%)
Cirrosis hepática criptogénica	3 (5%)
Raza	Caucásica

Tabla 8. SD: desviación estándar; d: días; S: sí; N: no; TAC: tacrolimus; TH: trasplante hepático; VHC: virus de la hepatitis C; VHB: virus de la hepatitis B.

4.2. PREVALENCIA DE LAS VARIANTES SELECCIONADAS EN LOS RECEPTORES Y EN LOS DONANTES DE LOS ÓRGANOS TRASPLANTADOS

Para el estudio de la prevalencia se analizaron, para el grupo CSA y para el grupo TAC, los siguientes SNPs:

- Grupo CSA:

- rs2740574 (*NM_017460.5:c.-392A>G*) del gen *CYP3A4* (*CYP3A4*1/*1B*)
- rs35599367 (*NM_017460.5:c.522-191C>T*) del gen *CYP3A4* (*CYP3A4*1/*22*)
- rs1045642 (*NM_000927.4:c.3435C>T*) del gen *ABCB1*.
- rs2032582 (*NM_000927.4:c.2677G>A/T*) del gen *ABCB1*.

- Grupo TAC:

- rs776746 (*NM_000777:c.6986A>G*) del gen *CYP3A5* (*CYP3A5*1/*3*).
- rs35599367 (*NM_017460.5:c.522-191C>T*) del gen *CYP3A4* (*CYP3A4*1/*22*).
- rs1045642 (*NM_000927.4:c.3435C>T*) del gen *ABCB1*.
- rs2032582 (*NM_000927.4:c.2677G>A/T*) del gen *ABCB1*.

En las tablas 9 y 10 se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas y la p correspondiente a la prueba del cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg para los dos grupos conjuntamente. Se considera que la población está en equilibrio si $p > 0,05$.

Tabla 9. Frecuencias de los genotipos de las variantes estudiadas en donantes y receptores en el grupo CSA.

Polimorfismo/Genotipo	Receptores (n=69)	Donantes (n=69)	Total (n=138)	P
CYP3A4 c.-392A>G:				
(*1/*1) A/A	63 (91,3%)	58 (84,0%)	121 (87,7%)	0,07
(*1/*1B) A/G	5 (7,2%)	10 (14,5%)	15 (10,9%)	
(*1B/*1B) G/G	1 (1,5%)	1 (1,5%)	2 (1,4%)	
CYP3A4 c.522-191C>T:				
(*1/*1) C/C	65 (94,2 %)	67 (97,1%)	132 (95,7%)	0,79
(*1/*22) C/T	4 (5,8%)	2 (2,9%)	6 (4,3%)	
(*22/*22) T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
ABCB1 c.3435C>T:				
C/C	21 (30,4%)	16 (23,2%)	37 (26,8%)	0,46
C/T	35 (50,8%)	38 (55,1%)	73 (52,9%)	
T/T	13 (18,8%)	15 (21,7%)	28 (20,3%)	
ABCB1 c.2677G>T/A:				
G/G	18 (26,1%)	24 (34,7%)	42 (30,5%)	0,22
G/T	34 (49,3%)	35 (50,8%)	69 (50,0%)	
T/T	9 (13,0%)	9 (13,0%)	18 (13,0%)	
G/A&T/A	8 (11,6%)	1 (1,5%)	9 (6,5%)	

p: p del equilibrio de Hardy-Weinberg correspondiente a la columna "Total"

Tabla 10. Frecuencias de los genotipos de las variantes estudiadas en donantes y receptores en el grupo TAC.

Polimorfismo/Genotipo	Receptores (n=67)	Donantes (n=67)	Total (n=134)	P
CYP3A5 c.6986A>G:				
(*3/*3) G/G	59 (88,1%)	54 (80,6%)	113 (84,3%)	0,91
(*3/*1) G/A	7 (10,4%)	13 (19,4%)	20 (14,9%)	
(*1/*1) A/A	1 (1,5%)	0 (0,0%)	1 (0,8%)	
CYP3A4 c.522-191C>T:				
(*1/*1) C/C	57 (87,7%)	55 (82,1%)	112 (84,8%)	0,35
(*1/*22) C/T	8 (12,3%)	12 (17,9%)	20 (15,2%)	
(*22/*22) T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
ABCB1 c.3435C>T:				
C/C	15 (22,4%)	22 (32,8%)	37 (27,6%)	0,44
C/T	37 (55,2%)	34 (50,8%)	71 (53,0%)	
T/T	15 (22,4%)	11 (16,4%)	26 (19,4%)	
ABCB1 c.2677G>T/A:				
G/G	18 (26,9%)	26 (39,4%)	44 (33,1%)	0,68
G/T	34 (50,8%)	30 (45,5%)	64 (48,1%)	
T/T	13 (19,3%)	7 (10,6%)	20 (15,0%)	
G/A&T/A	2 (3,0%)	3 (4,5%)	5 (3,8%)	

p: p del equilibrio de Hardy-Weinberg correspondiente a la columna "Total"

Las distribuciones de frecuencias genotípicas para todos los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, en ambos grupos. Se observan bajas frecuencias para los alelos *CYP3A4*1B* (alelo G) y *CYP3A5*1* (alelo A), con 2 y 1 individuos portadores de dichos alelos en homocigosis en los grupos CSA y TAC, respectivamente. Además, no se han encontrado portadores de la variante *CYP3A4*22* (alelo T) en homocigosis en la población estudiada para ninguno de los dos grupos.

Para este estudio se decidió agrupar a los participantes como portadores o no portadores de la variante para cada uno de los polimorfismos estudiados. Como se puede observar, el número de homocigotos para el alelo minoritario para los genes *CYP* es muy bajo o incluso nulo en la población estudiada. Así que en estos casos el criterio de agrupación en portadores y no portadores de la variante fue matemático. En el caso del gen *ABCB1*, aunque los tres genotipos estaban bien representados, se agruparon también en portadores y no portadores por homogeneidad del tratamiento estadístico. Por lo tanto, en todos los casos se agruparon los pacientes heterocigotos con los homocigotos para el alelo minoritario, formando el grupo de portadores de la variante. Una vez creados los grupos, se realizó un estudio para eliminar posibles valores aberrantes empleando el test estadístico de Grubbs. Se estudiaron los datos relativos a las variables incluidas en el estudio, pero no se encontró ningún valor aberrante.

4.3. VARIABLES ESTUDIADAS

A continuación se presentan las variables estudiadas divididas en 2 grupos: las variables farmacocinéticas (relacionadas con la respuesta farmacocinética) y las variables clínicas (relacionadas con la respuesta clínica).

4.3.1. Variables farmacocinéticas.

Tal como se desarrolla en el apartado 3.3 de material y métodos se han establecido las variables farmacocinéticas, Dosis (D), Concentración (C) y Concentración relativa a la Dosis (C/D) como indicadores de la exposición a ciclosporina y tacrolimus. La relación de los SNPs mencionados en el apartado 3.2.3 de material y métodos con estas variables se ha estudiado con el objetivo de identificar alguna influencia del genotipo del paciente en sus resultados farmacocinéticos.

Como se explica en el apartado 3.5 de material y métodos, esta influencia se ha estudiado para cada polimorfismo de forma individual y como interacción de dos polimorfismos de forma conjunta, tanto para donantes como para receptores, en los días 3, 7, 14, 30 y 90 post-trasplante.

A continuación se muestran las tablas, gráficas y figuras obtenidas, representando la D, la C y la C/D de los pacientes para cada polimorfismo agrupándolos en subgrupos en función del genotipo que presenten (portador vs no portador). Para el grupo CSA, no ha sido posible realizar el estudio estadístico del SNP *CYP3A4**1/*22 por tamaño muestral insuficiente de alguno de los subgrupos, por lo que no aparecen tablas ni gráficas de éste.

4.3.1.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables farmacocinéticas.

GRUPO CSA

Los resultados de las siguientes tablas representan medias \pm desviación estándar y los valores p que resultan del análisis de la t de Student para grupos independientes. Cuando la asunción de homogeneidad de varianzas no se cumple se usa la corrección sobre los grados de libertad de Welch.

CYP3A4*1/*1B

Tabla 11. Influencia del polimorfismo CYP3A4*1/*1B sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C₂), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C₂/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	AA (n=63) (*1/*1)	AG+GG (n=6) (*1/*1B + *1B/*1B)	p	AA (n=58) (*1/*1)	AG+GG (n=11) (*1/*1B + *1B/*1B)	p
Día 3						
D ^a	9,16 ± 0,49	9,93 ± 1,35	0,637	9,10 ± 0,53	9,91 ± 0,70	0,518
C ₂ ^b	856,65 ± 62,52	842,67 ± 218,60	0,948	878,74 ± 68,78	734,55 ± 91,65	0,377
C ₂ /D ^c	106,84 ± 8,64	116,49 ± 54,33	0,764	112,68 ± 10,33	81,82 ± 13,90	0,088
Día 7						
D	9,085 ± 0,48	9,60 ± 1,43	0,749	8,77 ± 0,47	11,01 ± 1,22	0,068
C ₂	1375,77 ± 59,60	1296,00 ± 77,14	0,429	1381,35 ± 62,64	1302,91 ± 98,12	0,508
C ₂ /D	186,00 ± 17,14	156,86 ± 31,70	0,609	193,57 ± 18,44	130,21 ± 13,64	0,008
Día 14						
D	7,65 ± 0,39	7,88 ± 1,26	0,862	7,38 ± 0,39	9,15 ± 1,01	0,082
C ₂	1489,90 ± 48,93	1528,50 ± 211,58	0,821	1475,91 ± 49,81	1583,46 ± 147,02	0,501
C ₂ /D	224,14 ± 11,30	221,60 ± 45,36	0,948	229,32 ± 11,73	195,91 ± 29,37	0,264
Día 30						
D	5,69 ± 0,26	4,90 ± 1,05	0,413	5,65 ± 0,27	5,53 ± 0,75	0,866
C ₂	1393,84 ± 50,33	1361,50 ± 205,99	0,852	1382,32 ± 49,82	1434,82 ± 161,81	0,762
C ₂ /D	270,95 ± 14,53	275,45 ± 57,33	0,933	269,61 ± 14,83	280,59 ± 41,92	0,779
Día 90						
D	4,12 ± 0,19	3,94 ± 0,59	0,789	4,063 ± 0,203	4,30 ± 0,36	0,625
C ₂	1197,10 ± 48,85	1172,83 ± 128,34	0,881	1166,70 ± 50,32	1338,64 ± 102,69	0,165
C ₂ /D	314,08 ± 14,45	324,62 ± 23,26	0,832	313,13 ± 15,62	324,26 ± 18,16	0,646

^a (mg/kg/ día); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/día)

No se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables cuando se comparan según el genotipo del receptor.

Cuando se comparan según el genotipo del donante, se observan diferencias significativas entre los portadores y los no portadores para la C₂/D en el día 7 (p=0,008). En los días 3, 14, 30 y 90 no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables (tabla 11).

ABCB1 c.3435C>T

Tabla 12. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.3435C>T sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C₂), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C₂/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	CC (n=21)	CT+TT (n=48)	p	CC (n=16)	CT+TT (n=53)	p
Día 3						
D ^a	8,57 ± 0,63	9,51 ± 0,60	0,345	8,74 ± 0,67	9,38 ± 0,56	0,556
C ₂ ^b	765,95 ± 91,45	895,38 ± 75,92	0,320	1021,25 ± 134,43	804,39 ± 65,29	0,124
C ₂ /D ^c	105,05 ± 15,01	108,87 ± 11,30	0,846	123,64 ± 18,15	102,78 ± 10,39	0,330
Día 7						
D	8,34 ± 0,78	9,48 ± 0,55	0,248	8,20 ± 0,86	9,41 ± 0,52	0,259
C ₂	1444,71 ± 87,48	1335,65 ± 68,87	0,364	1336,75 ± 103,00	1378,53 ± 64,66	0,750
C ₂ /D	217,75 ± 36,00	168,47 ± 16,34	0,155	227,86 ± 51,46	170,07 ± 13,54	0,292
Día 14						
D	6,69 ± 0,66	8,09 ± 0,44	0,084	7,71 ± 0,75	7,65 ± 0,43	0,950
C ₂	1534,86 ± 95,60	1474,75 ± 54,89	0,565	1466,44 ± 107,88	1501,58 ± 53,52	0,758
C ₂ /D	262,29 ± 21,95	206,77 ± 11,73	0,018	214,42 ± 21,45	226,84 ± 12,77	0,633
Día 30						
D	5,30 ± 0,52	5,79 ± 0,28	0,366	5,58 ± 0,55	5,65 ± 0,28	0,900
C ₂	1426,75 ± 85,67	1375,70 ± 59,77	0,636	1408,06 ± 105,52	1385,57 ± 55,56	0,846
C ₂ /D	301,128 ± 27,50	258,04 ± 15,88	0,156	278,24 ± 29,14	269,03 ± 16,08	0,779
Día 90						
D	4,08 ± 0,33	4,11 ± 0,21	0,923	3,97 ± 0,32	4,14 ± 0,21	0,673
C ₂	1212,45 ± 98,54	1187,47 ± 50,58	0,805	1200,13 ± 76,08	1193,29 ± 55,45	0,950
C ₂ /D	332,12 ± 31,31	307,33 ± 13,62	0,475	331,03 ± 29,04	309,79 ± 15,15	0,502

^a (mg/kg/día); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/día)

Según el genotipo del receptor, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los portadores y los no portadores para la C₂/D en el día 14 (p=0,018). En los días 3, 7, 30 y 90 no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables.

Según el genotipo del donante no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables (tabla 12).

ABCB1 c.2677G>T/A

Tabla 13. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.2677G>T/A sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C₂), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C₂/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=51)	p	GG (n=24)	GT+GA+TA+TT (n=45)	p
Día 3						
D ^a	8,08 ± 0,68	9,64 ± 0,57	0,132	9,06 ± 0,80	9,31 ± 0,56	0,799
C ₂ ^b	755,89 ± 99,60	891,24 ± 72,67	0,321	863,39 ± 108,01	851,33 ± 72,67	0,925
C ₂ /D ^c	106,83 ± 10,78	106,83 ± 10,78	0,875	112,43 ± 16,57	105,27 ± 10,80	0,710
Día 7						
D	8,13 ± 0,87	9,48 ± 0,52	0,187	8,71 ± 0,71	9,35 ± 0,58	0,505
C ₂	1310,94 ± 107,55	1389,28 ± 64,07	0,534	1281,58 ± 87,89	1415,38 ± 69,43	0,248
C ₂ /D	210,23 ± 42,48	174,03 ± 15,50	0,320	192,90 ± 35,72	178,44 ± 15,48	0,668
Día 14						
D	6,94 ± 0,69	7,92 ± 0,44	0,251	8,20 ± 0,59	7,38 ± 0,48	0,296
C ₂	1490,83 ± 119,15	1494,20 ± 49,73	0,979	1535,83 ± 82,56	1470,11 ± 58,95	0,515
C ₂ /D	243,57 ± 25,08	216,83 ± 11,83	0,284	208,33 ± 16,09	232,42 ± 14,41	0,296
Día 30						
D	5,50 ± 0,65	5,68 ± 0,26	0,794	5,77 ± 0,43	5,56 ± 0,31	0,689
C ₂	1446,94 ± 92,87	1371,90 ± 57,61	0,508	1409,67 ± 84,78	1380,49 ± 60,31	0,777
C ₂ /D	304,65 ± 32,43	260,41 ± 15,11	0,175	264,89 ± 21,29	275,05 ± 18,50	0,693
Día 90						
D	3,88 ± 0,38	4,17 ± 0,20	0,492	3,98 ± 0,26	4,18 ± 0,24	0,579
C ₂	1188,61 ± 106,76	1197,25 ± 49,41	0,934	1158,58 ± 80,97	1215,21 ± 55,49	0,556
C ₂ /D	342,79 ± 36,49	306,04 ± 13,31	0,357	303,59 ± 22,21	322,09 ± 16,88	0,506

^a (mg/kg/día); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/día)

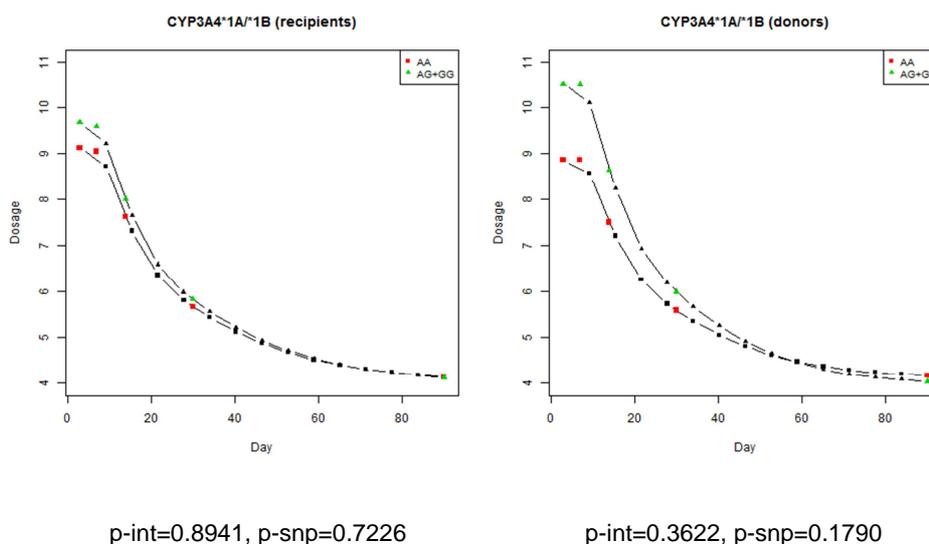
Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador, para ninguna de las variables, ni cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (tabla 13).

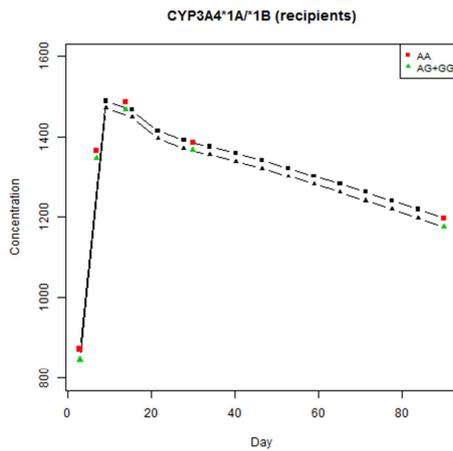
GRÁFICAS DE SEGUIMIENTO EN EL TIEMPO

A continuación se muestran las gráficas de seguimiento a lo largo del tiempo obtenidas aplicando el modelo lineal mixto. Los resultados de las siguientes gráficas muestran de una forma muy visual si hay diferencias con significación estadística entre genotipos para las variables D, C y C/D a lo largo del tiempo, y se cuantifica mediante el parámetro p-snp ($p < 0,05$). Además también se muestra el parámetro p-int, que informa sobre la interacción entre el SNP y el tiempo. Si la interacción no es significativa ($p\text{-int} > 0,05$) nos indicaría, en caso de que el SNP tuviese un efecto significativo ($p\text{-snp} < 0,05$), que este efecto es constante en el tiempo. Si, por el contrario, la interacción resulta significativa, indica que el efecto del SNP sobre la concentración es diferente en función del momento en el que se recoge esta medida.

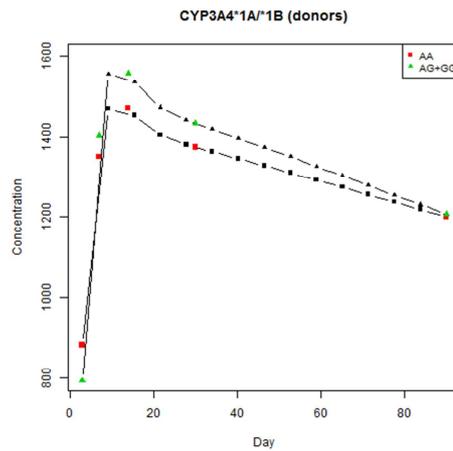
CYP3A4*1/*1B

Gráfica 1. Influencia del polimorfismo CYP3A4*1/*1B, sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C_2), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C_2/D).

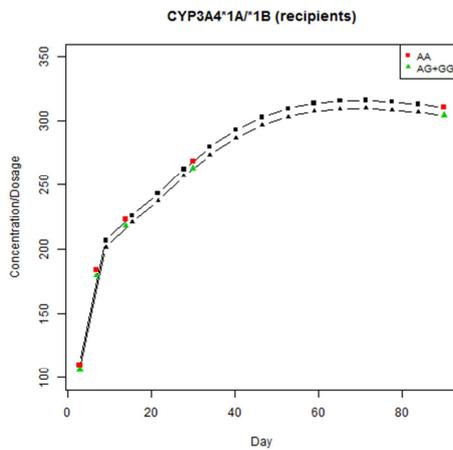




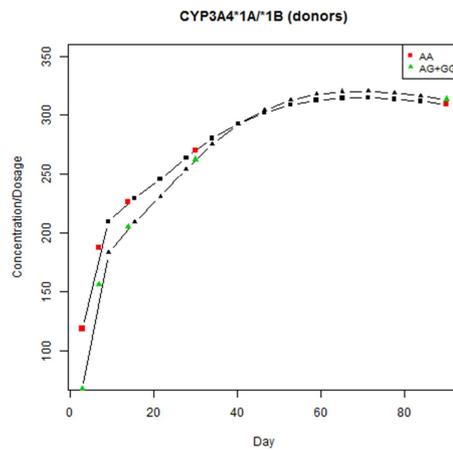
p-int=0.9996, p-snp=0.8236



p-int=0.5869, p-snp=0.7553



p-int=0.9994, p-snp=0.8738



p-int=0.2969, p-snp=0.3576

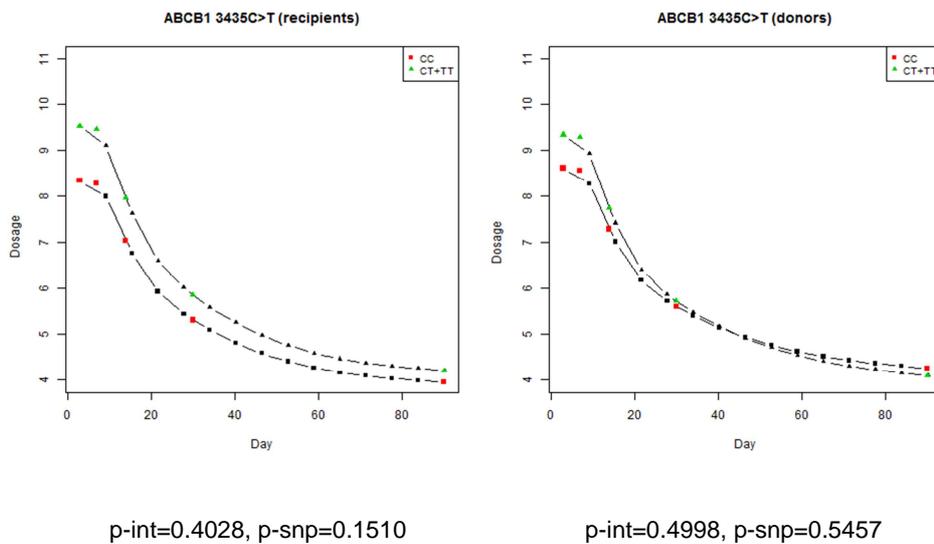
AA: grupo de pacientes no portadores; AG+GG: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D , C_2 y C_2/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$);

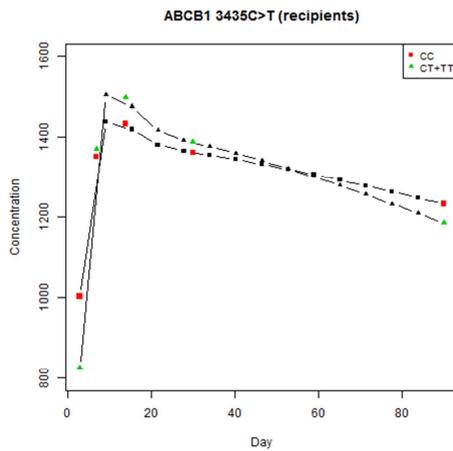
Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, ni cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (gráfica 1).

Los perfiles de las curvas de las gráficas, en general, muestran una disminución progresiva de las D a lo largo del tiempo que se acompañan de una disminución de las C_2 (donde sólo las D parece que tienden a estabilizarse). Las C_2/D muestran una tendencia a hacerse constantes a los 3 meses. Además, las curvas son casi coincidentes para las 3 variables en el grupo de pacientes tanto cuando son estudiados según el genotipo del receptor como del donante.

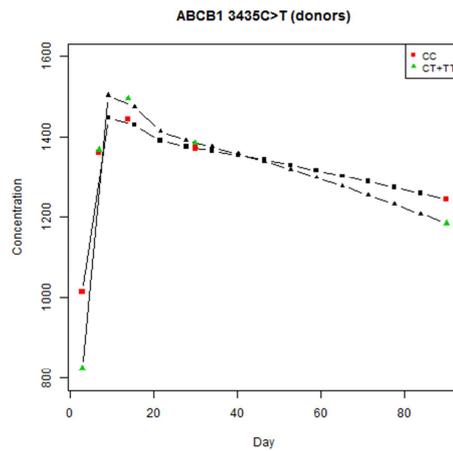
ABCB1 c.3435C>T

Gráfica 2. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.3435C>T sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C_2), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C_2/D).

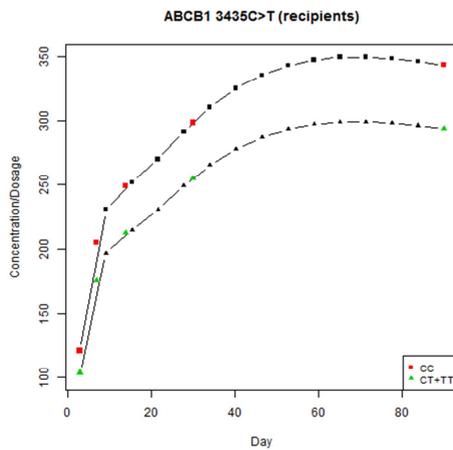




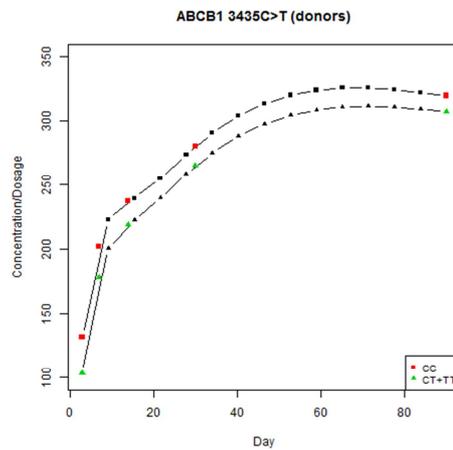
p-int=0.3099, p-snp=0.6929



p-int=0.2560, p-snp=0.5819



p-int=0.5356, p-snp=0.0720



p-int=0.8647, p-snp=0.3551

CC: grupo de pacientes no portadores; CT+TT: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

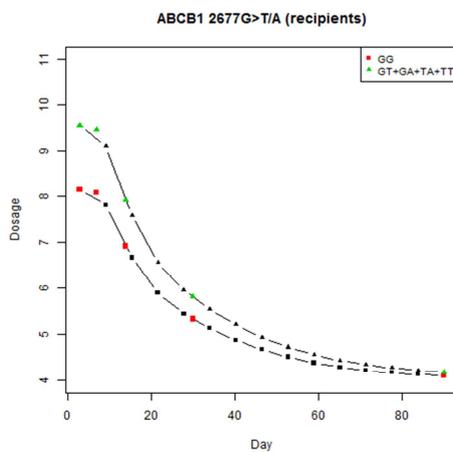
Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, ni cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (gráfica 2). Sin embargo, cabe destacar que, según el genotipo receptor, la C_2/D presenta una tendencia a la significación ($p\text{-snp}=0,07$), es decir que

los portadores tienden a presentar C_2/D más bajas, y que esa tendencia es constante a lo largo del tiempo ($p\text{-int}>0,05$).

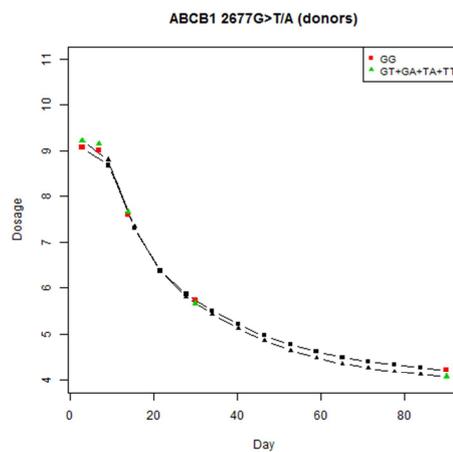
Los perfiles de las curvas de las gráficas, en general, muestran una disminución progresiva de las D a lo largo del tiempo que se acompañan de una disminución de las C_2 . Las C_2/D muestran un aumento importante al principio que tiende a estabilizarse a los 3 meses. Además, en el grupo de pacientes estudiados según el genotipo del receptor, para este último parámetro se hace visible la diferencia entre los portadores y no portadores.

ABCB1 c.2677G>T/A

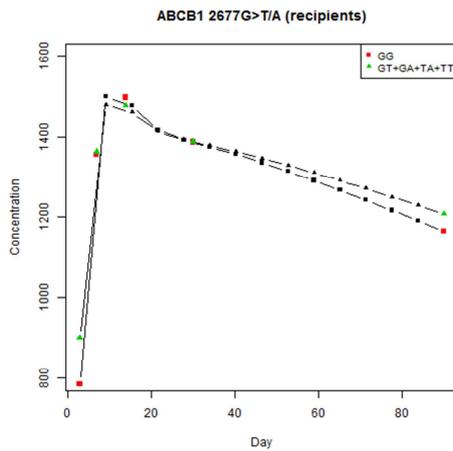
Gráfica 3. Influencia del polimorfismo c.ABCB1 2677G>T/A, sobre la dosis administrada de CSA (D), su concentración en sangre a las dos horas de su administración (C_2), y sobre la ratio de su concentración a las dos horas de su administración y la dosis administrada (C_2/D).



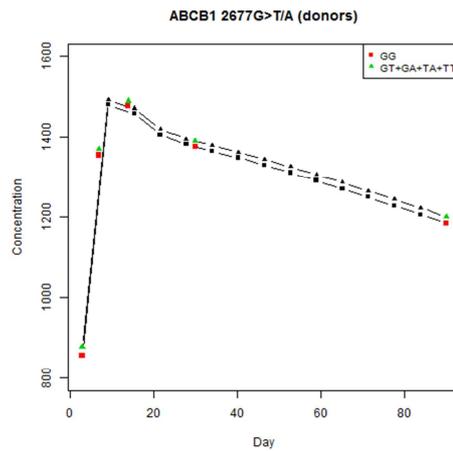
$p\text{-int}=0.2012$, $p\text{-snp}=0.1377$



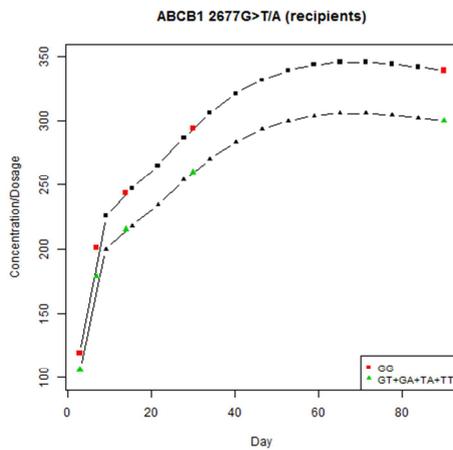
$p\text{-int}=0.9032$, $p\text{-snp}=0.9663$



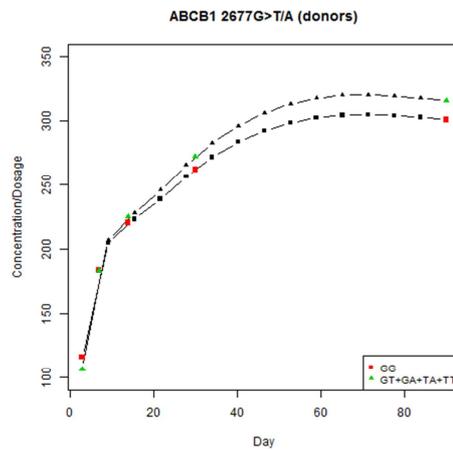
p-int=0.6275, p-snp=0.6254



p-int=0.9974, p-snp=0.7793



p-int=0.6819, p-snp=0.1871



p-int=0.6805, p-snp=0.8393

GG: grupo de pacientes no portadores; GT+GA+TA+TT: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, ni cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (gráfica 3).

Los perfiles de las curvas de las gráficas, en general, muestran una disminución progresiva de las D a lo largo del tiempo que se acompañan de una disminución de las

C₂. Las C₂/D muestran un aumento importante al principio que tiende a estabilizarse hacia los 3 meses. Además, según el genotipo del receptor, para este último parámetro se hace ligeramente visible la diferencia entre portadores y no portadores (sin significación estadística).

GRUPO TAC

Los resultados de las siguientes tablas representan medias \pm desviación estándar y los valores p que resultan del análisis de la t de Student para grupos independientes. (Nota estadística: cuando la asunción de homogeneidad de varianzas no se cumple se usa la corrección sobre los grados de libertad de Welch).

CYP3A5*1/*3

Tabla 14. Influencia del polimorfismo CYP3A5*1/*3 sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	GG (n=59) (*3/*3)	GA+AA (n=8) (*3/*3 + *1/*1)	p	GG (n=54) (*3/*3)	GA+AA (n=13) (*3/*3 + *1/*1)	p
Día 3						
D ^a	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,710	0,10 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,608
C ^b	10,58 \pm 0,88	8,86 \pm 1,49	0,498	11,06 \pm 0,88	7,85 \pm 1,74	0,101
C/D ^c	135,21 \pm 17,80	151,24 \pm 70,87	0,774	141,72 \pm 18,28	119,31 \pm 48,18	0,605
Día 7						
D	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,03	0,579	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02	0,504
C	9,53 \pm 0,56	7,63 \pm 1,40	0,233	9,79 \pm 0,60	7,31 \pm 0,79	0,057
C/D	87,06 \pm 9,30	60,24 \pm 18,57	0,333	88,95 \pm 9,72	59,56 \pm 14,81	0,207
Día 14						
D	0,15 \pm 0,01	0,20 \pm 0,03	0,119	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,03	0,181
C	11,52 \pm 0,62	11,50 \pm 1,79	0,992	11,53 \pm 0,63	11,46 \pm 1,51	0,962
C/D	93,26 \pm 7,90	68,36 \pm 9,47	0,064	92,26 \pm 7,96	81,85 \pm 17,17	0,599
Día 30						
D	0,15 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02	0,099	0,15 \pm 0,01	0,17 \pm 0,03	0,460
C	11,90 \pm 0,71	11,00 \pm 1,73	0,664	12,35 \pm 0,79	9,46 \pm 0,75	0,011
C/D	115,97 \pm 20,11	72,76 \pm 15,12	0,452	119,26 \pm 21,37	71,07 \pm 11,57	0,032
Día 90						
D	0,13 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02	0,313	0,13 \pm 0,01	0,16 \pm 0,09	0,249
C	12,33 \pm 0,62	14,25 \pm 2,04	0,293	12,62 \pm 0,66	12,33 \pm 1,45	0,852
C/D	120,89 \pm 13,57	105,16 \pm 22,79	0,677	126,25 \pm 14,55	90,52 \pm 16,78	0,024

^a (mg/kg/day); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/day)

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador (*3/*3) para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

Según el genotipo del donante, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los portadores y no portadores, para la C en el día 30 ($p=0,01$) y para la C/D en los días 30 y 90 ($p=0,03$ y $p=0,02$, respectivamente). Se observa que las C/D son más altas en el grupo de no portadores. En los días 3, 7 y 14 no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables (tabla 14).

CYP3A4*1/*22

Tabla 15. Influencia del polimorfismo CYP3A4*1/*22 (portadores CT) sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	CC (n=57)	CT (n=8)	p	CC (n=55)	CT (n=12)	p
Día 3						
D ^a	0,10 ± 0,006	0,09 ± 0,012	0,390	0,10 ± 0,042	0,09 ± 0,030	0,449
C ^b	10,46 ± 0,86	11,67 ± 2,50	0,660	10,48 ± 0,92	10,00 ± 1,58	0,814
C/D ^c	130,63 ± 17,22	224,31 ± 89,61	0,349	139,49 ± 20,86	126,75 ± 25,43	0,776
Día 7						
D	0,14 ± 0,009	0,14 ± 0,029	0,796	0,14 ± 0,010	0,13 ± 0,015	0,791
C	9,04 ± 0,50	12,00 ± 2,36	0,265	9,56 ± 0,60	8,17 ± 0,83	0,302
C/D	84,99 ± 9,84	87,80 ± 18,87	0,915	88,49 ± 10,17	64,57 ± 9,53	0,096
Día 14						
D	0,16 ± 0,011	0,13 ± 0,021	0,231	0,16 ± 0,011	0,14 ± 0,014	0,550
C	11,46 ± 0,63	13,00 ± 1,83	0,418	11,83 ± 0,67	10,08 ± 1,10	0,190
C/D	90,85 ± 8,04	94,69 ± 17,98	0,862	93,21 ± 8,14	78,56 ± 14,93	0,440
Día 30						
D	0,15 ± 0,011	0,14 ± 0,021	0,524	0,15 ± 0,011	0,16 ± 0,015	0,645
C	11,47 ± 0,68	15,13 ± 2,42	0,076	12,11 ± 0,78	10,33 ± 0,82	0,127
C/D	110,03 ± 21,50	128,76 ± 28,80	0,718	118,17 ± 20,98	71,17 ± 8,68	0,354
Día 90						
D	0,14 ± 0,011	0,12 ± 0,027	0,551	0,13 ± 0,012	0,15 ± 0,019	0,498
C	12,51 ± 0,61	13,38 ± 2,42	0,640	12,35 ± 0,66	13,80 ± 1,34	0,382
C/D	117,63 ± 13,76	134,20 ± 32,25	0,644	122,87 ± 13,91	95,51 ± 16,64	0,438

^a (mg/kg/day); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/day)

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, ni

cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (tabla 15).

ABCB1 c.3435C>T

Tabla 16. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.3435C>T sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	CC (n=15)	CT+TT (n=52)	p	CC (n=22)	CT+TT (n=45)	p
Día 3						
D ^a	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,757	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,459
C ^b	9,67 ± 1,24	10,62 ± 0,98	0,613	9,40 ± 1,31	10,86 ± 1,00	0,397
C/D ^c	123,99 ± 28,06	141,18 ± 21,34	0,677	117,65 ± 31,66	146,25 ± 21,03	0,448
Día 7						
D	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,276	0,16 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,068
C	9,87 ± 0,77	9,14 ± 0,63	0,560	8,46 ± 0,58	9,73 ± 0,72	0,251
C/D	99,62 ± 10,68	79,82 ± 10,50	0,344	56,68 ± 5,30	97,50 ± 11,91	0,003
Día 14						
D	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,309	0,19 ± 0,06	0,14 ± 0,01	0,012
C	11,67 ± 1,44	11,47 ± 0,63	0,889	10,73 ± 0,91	11,90 ± 0,75	0,344
C/D	107,97 ± 14,92	85,85 ± 8,12	0,209	74,20 ± 14,25	97,73 ± 8,09	0,133
Día 30						
D	0,12 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,100	0,20 ± 0,02	0,13 ± 0,01	<0,001
C	12,73 ± 1,33	11,52 ± 0,77	0,450	11,00 ± 0,98	12,78 ± 0,86	0,408
C/D	136,45 ± 29,34	103,65 ± 21,63	0,451	65,79 ± 12,01	127,33 ± 23,60	0,133
Día 90						
D	0,10 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,114	0,18 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,015
C	12,00 ± 1,14	12,74 ± 0,70	0,604	11,77 ± 1,08	13,00 ± 0,71	0,342
C/D	144,83 ± 32,12	112,33 ± 12,84	0,287	74,92 ± 15,89	138,39 ± 15,06	0,015

^a (mg/kg/day); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/day)

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

Según el genotipo del donante se observan diferencias estadísticamente significativas entre los portadores y no portadores para la D en los días 14, 30 y 90 (p=0,012, p<0,001 y p=0,015, respectivamente) y para la C/D en los días 7 y 90 (p=0,003 y p=0,015, respectivamente). Se observa que las C/D son más altas en el grupo de los portadores. En el día 3 no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables (tabla 16).

ABCB1 c.2677G>T/A

Tabla 17. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.2677G>T/A sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

	Genotipo Receptor			Genotipo Donante		
	GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=49)	p	GG (n=26)	GT+GA+TA+TT (n=40)	p
Day 3						
D ^a	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,417	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,548
C ^b	8,72 ± 1,15	11,07 ± 1,01	0,183	9,58 ± 1,16	11,14 ± 1,11	0,340
C/D ^c	103,55 ± 24,17	150,72 ± 22,36	0,223	111,26 ± 17,90	158,67 ± 27,56	0,155
Day 7						
D	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,824	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,027
C	8,89 ± 0,83	9,46 ± 0,65	0,629	8,15 ± 0,47	10,08 ± 0,80	0,043
C/D	75,02 ± 9,71	87,56 ± 11,21	0,519	68,21 ± 13,51	94,88 ± 11,16	0,137
Day 14						
D	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,305	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,013
C	11,06 ± 1,24	11,69 ± 0,66	0,633	11,08 ± 0,78	11,80 ± 0,85	0,534
C/D	80,48 ± 10,89	94,29 ± 8,97	0,400	82,04 ± 13,48	95,72 ± 8,21	0,361
Day 30						
D	0,17 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,438	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,008
C	13,56 ± 1,25	11,14 ± 0,77	0,107	13,27 ± 1,13	10,95 ± 0,80	0,091
C/D	116,49 ± 20,78	109,13 ± 22,64	0,859	98,19 ± 19,12	118,27 ± 26,04	0,597
Day 90						
D	12,96 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,777	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,107
C	13,22 ± 0,98	12,31 ± 0,74	0,501	13,96 ± 0,99	11,77 ± 0,73	0,075
C/D	145,31 ± 33,47	110,42 ± 11,96	0,343	135,45 ± 27,72	109,39 ± 10,70	0,390

^a (mg/kg/day); ^b (ng/mL); ^c (ng/mL)/(mg/kg/day)

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

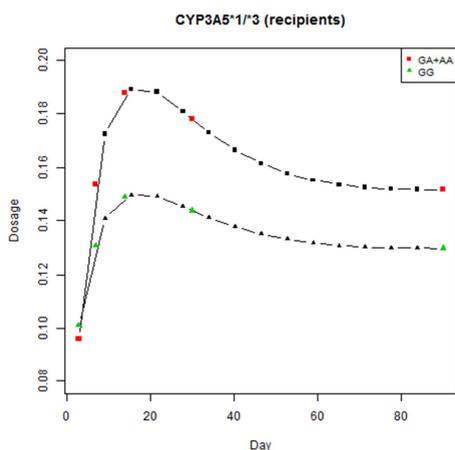
Según el genotipo del donante, se observan diferencias estadísticamente significativas entre los portadores y no portadores para la D en los días 7, 14 y 30 ($p=0,027$, $p=0,013$ y $p=0,008$, respectivamente) y para la C en el día 7 ($p=0,043$). En los días 3 y 90 no se observan diferencias con significación estadística para ninguna de las variables (tabla 17).

GRÁFICAS DE SEGUIMIENTO EN EL TIEMPO

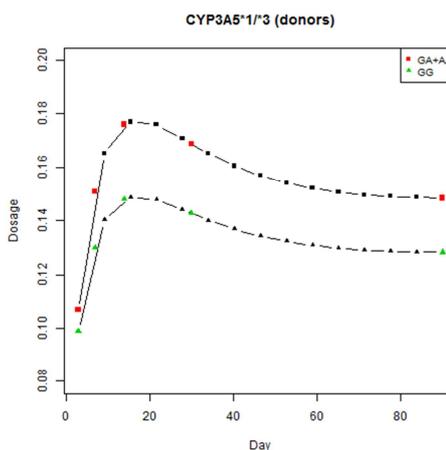
A continuación se muestran las gráficas de seguimiento a lo largo del tiempo obtenidas aplicando el modelo lineal mixto. Los resultados de las siguientes gráficas muestran de una forma muy visual si hay diferencias con significación estadística entre genotipos para las variables D, C y C/D a lo largo del tiempo, y se cuantifica mediante el parámetro p-snp ($p < 0,05$). Además también se muestra el parámetro p-int, que informa sobre la interacción entre el SNP y el tiempo. Si la interacción no es significativa ($p\text{-int} > 0,05$) nos indicaría, en caso de que el SNP tuviese un efecto significativo ($p\text{-snp} < 0,05$), que este efecto es constante en el tiempo. Si, por el contrario, la interacción resulta significativa, indica que el efecto del SNP sobre la concentración es diferente en función del momento en el que se recoge esta medida.

CYP3A5*1/*3

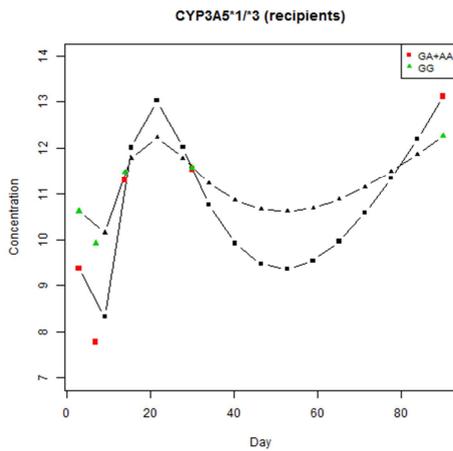
Gráfica 4. Influencia del polimorfismo CYP3A5*1/*3 sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).



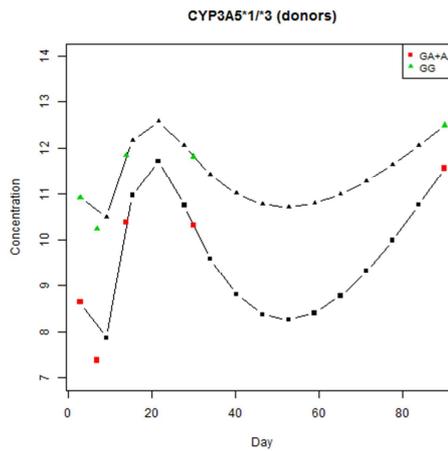
p-int=0.1254, p-snp=0.3537



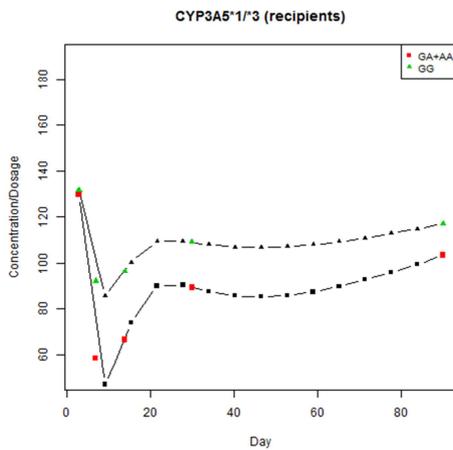
p-int=0.5345, p-snp=0.2462



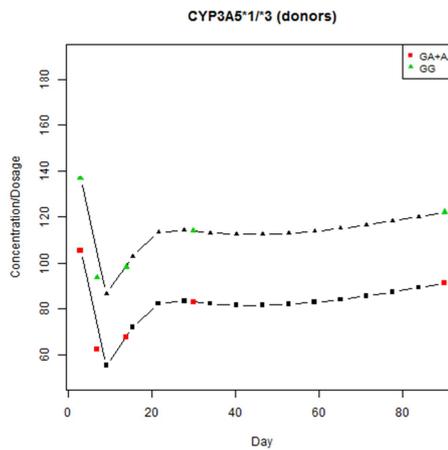
p-int=0.3953, p-snp=0.6348



p-int=0.5845, p-snp=0.0454



p-int=0.7465, p-snp=0.4932



p-int=0.9999, p-snp=0.0467

GG: grupo de pacientes no portadores (*3/*3); GA+AA: grupo de pacientes portadores (*1/*1 + *1/*3); p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

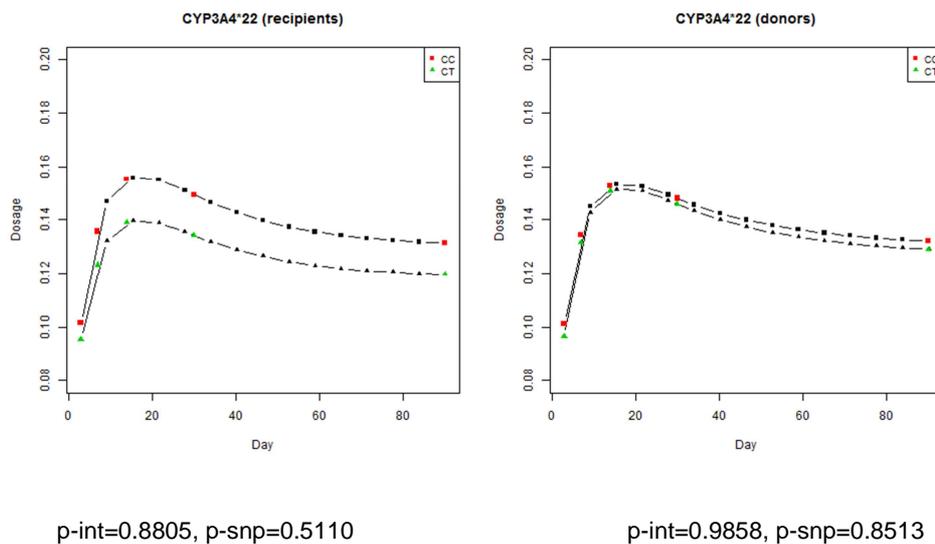
Según el genotipo del donante, se observan diferencias con significación estadística entre genotipos para las variables C y C/D ($p\text{-snp}=0,04$ y $p\text{-snp}=0,05$, respectivamente), y para ambos dichas diferencias son constantes en el tiempo (p -

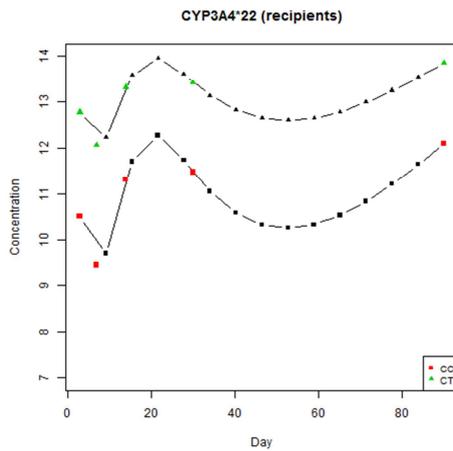
int>0,05). Los portadores presentan C y C/D más bajas que los no portadores (gráfica 4).

Los perfiles de las curvas de las gráficas, muestran un comportamiento similar en los pacientes tanto cuando son estudiados según el genotipo del donante como el del receptor. Para la C, destaca la diferencia entre genotipos que tiende a desaparecer a los 3 meses, a pesar de las diferencias mantenidas en las D administradas en función del genotipo. En cuanto a las C/D, se observa una diferencia mayor entre ser portador o no cuando se miran según el genotipo del donante, llegando a ser significativo.

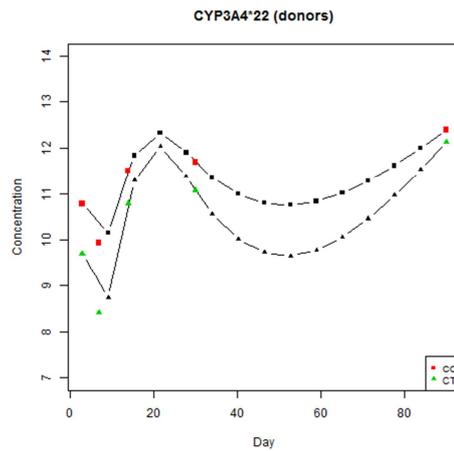
CYP3A4*1/*22

Gráfica 5. Influencia del polimorfismo CYP3A4*1/*22 (portadores CT) sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

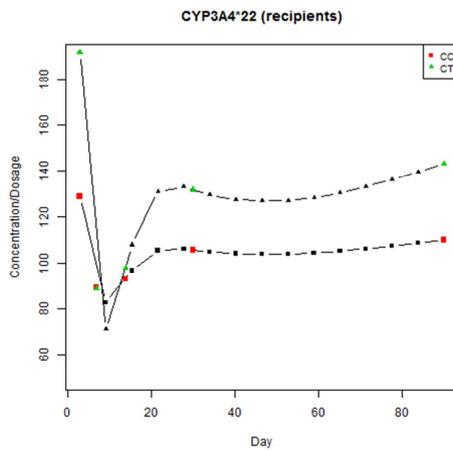




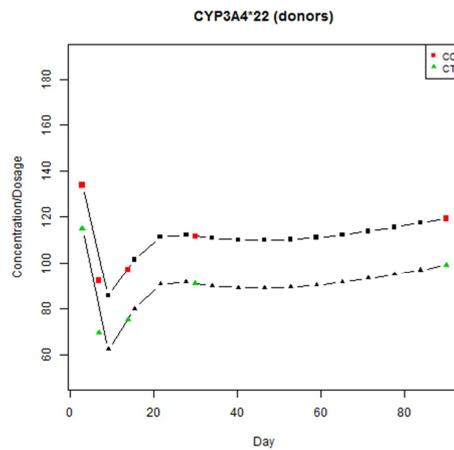
p-int=0.9297, p-snp=0.0591



p-int=0.8235, p-snp=0.3722



p-int=0.3510, p-snp=0.3435



p-int=0.9927, p-snp=0.3560

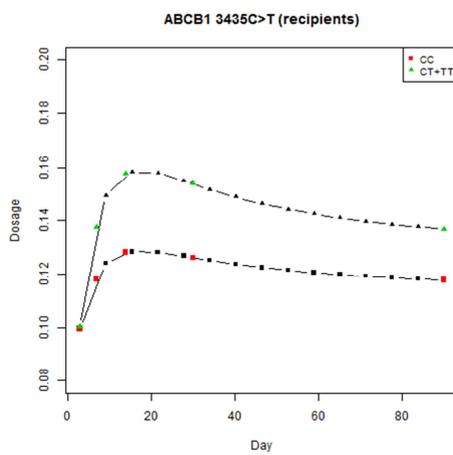
CC: grupo de pacientes no portadores; CT: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, ni cuando se estudian según el genotipo del receptor ni cuando se estudian según el genotipo del donante (gráfica 5). Sin embargo, cabe destacar, que para la variable C en el grupo de pacientes cuando son estudiados según el genotipo receptor se observan diferencias entre genotipos con una tendencia a la significación (p-

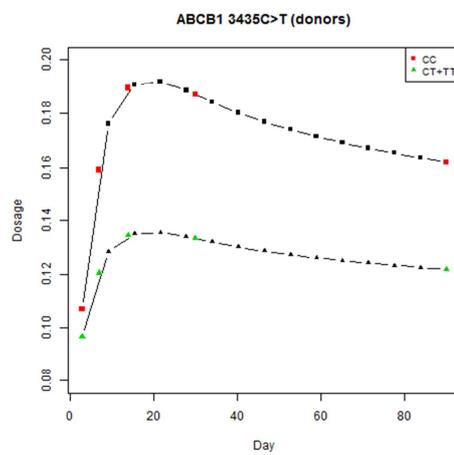
snp=0,06); además, dicha tendencia es constante a lo largo del tiempo ($p\text{-int}>0,05$). Los portadores presentan C más altas que los no portadores.

ABCB1 c.3435C>T

Gráfica 6. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.3435C>T sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).

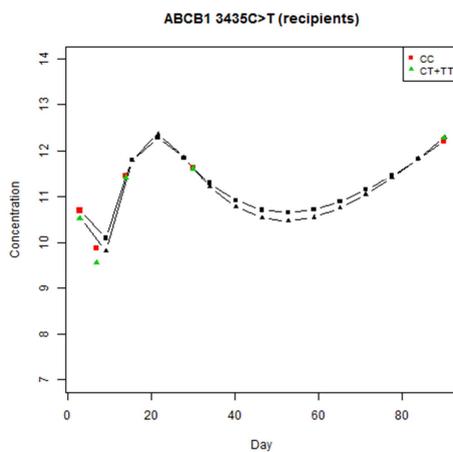


$p\text{-int}=0.2048$, $p\text{-snp}=0.2620$

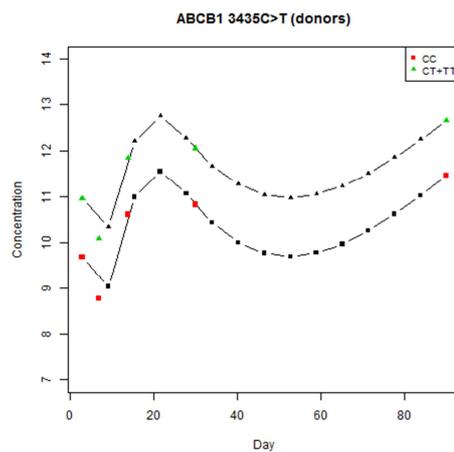


$p\text{-int}=0.0081$; $p\text{-d3}=0.606$, $p\text{-d7}=0.141$,

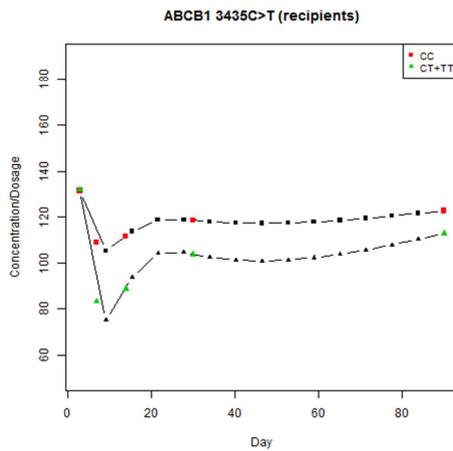
$p\text{-d14}=0.015$, $p\text{-d30}=0.002$, $p\text{-d90}=0.004$



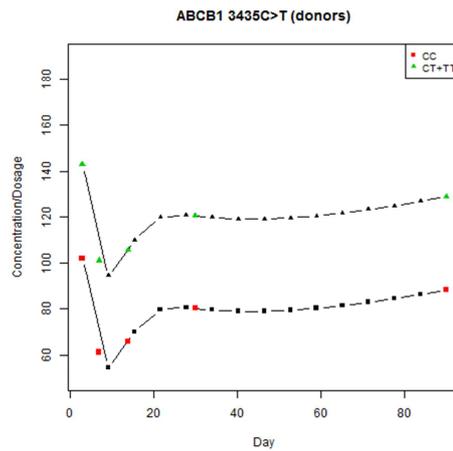
$p\text{-int}=0.9754$, $p\text{-snp}=0.9109$



$p\text{-int}=0.9961$, $p\text{-snp}=0.1020$



p-int=0.7111, p-snp=0.5221



p-int=0.9999, p-snp=0.0262

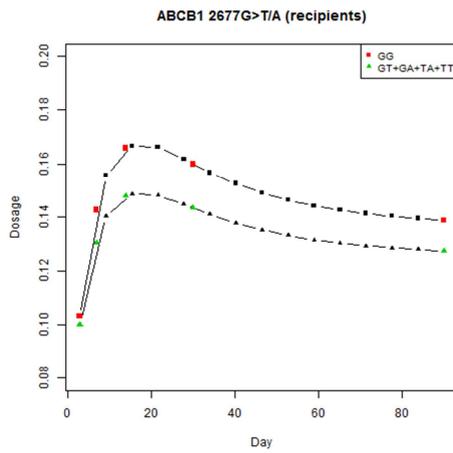
CC: grupo de pacientes no portadores; CT+TT: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

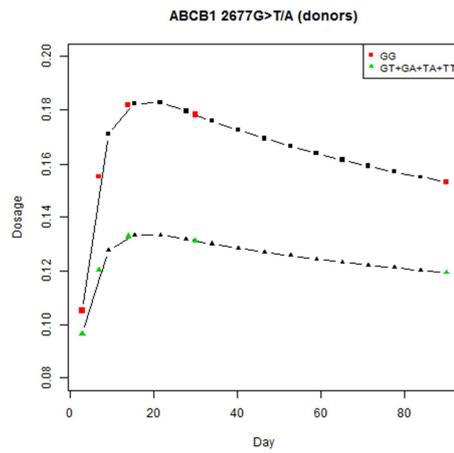
Según el genotipo del donante, se observan diferencias con significación estadística entre genotipos para las variables D y C/D ($p\text{-snp} < 0,05$ y $p\text{-snp} = 0,03$, respectivamente). Para la variable D, dichas diferencias se observan en los días 14, 30 y 90 ($p\text{-int} < 0,05$), donde los portadores muestran D más bajas que los no portadores. Para la variable C/D, dichas diferencias son constantes en el tiempo ($p\text{-int} > 0,05$), y los portadores muestran C/D más altas que los no portadores (gráfica 6).

ABCB1 c.2677G>T/A

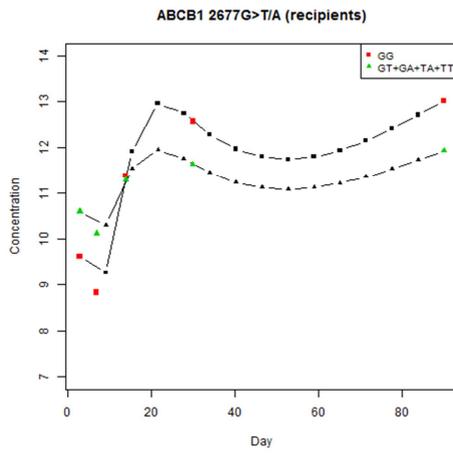
Gráfica 7. Influencia del polimorfismo ABCB1 c.2677G>T/A sobre la dosis administrada de TAC (D), su concentración basal en sangre (C), y sobre la ratio de su concentración basal y la dosis administrada (C/D).



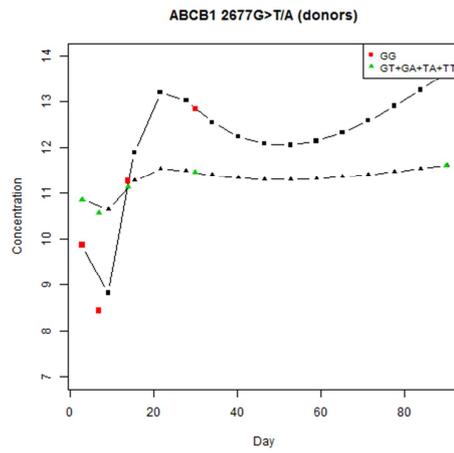
p-int=0.6361, p-snp=0.4249



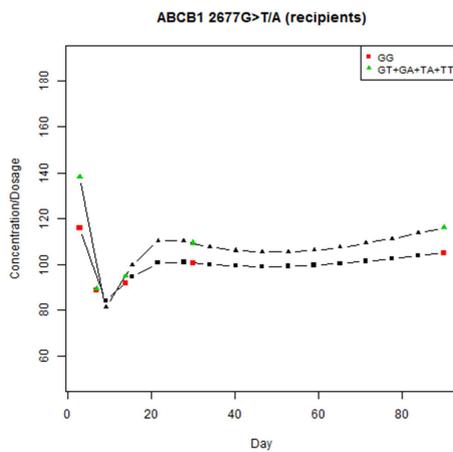
**p-int=0.0122: p-d3=0.679 , p-d7=0.070,
p-d14=0.021, p-d30=0.003, p-d90=0.046**



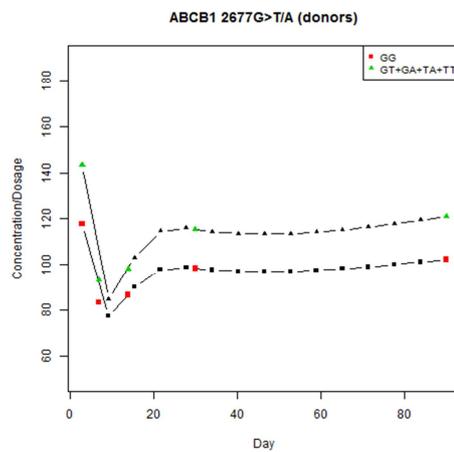
p-int=0.2871, p-snp=0.9695



**p-int=0.0186: p-d3=0.232 , p-d7=0.860,
p-d14=0.614, p-d30=0.021, p-d90=0.024**



p-int=0.8216, p-snp=0.6055



p-int=0.8744, p-snp=0.3261

GG: grupo de pacientes no portadores; GT+GA+TA+TT: grupo de pacientes portadores; p-snp: parámetro que indica si existe significación estadística entre las variables D, C y C/D y el genotipo; p-int: parámetro que indica si la significación estadística de p-snp es constante en el tiempo ($p > 0,05$).

Para el grupo de pacientes estudiado, no se observan diferencias con significación estadística entre ser portador y ser no portador para ninguna de las variables, cuando se estudian según el genotipo del receptor.

Según el genotipo del donante, se observan diferencias con significación estadística entre genotipos para las variables D y C ($p\text{-snp} < 0,05$). Para la variable D, dichas diferencias se observan en los días 14, 30 y 90 ($p\text{-int} < 0,05$), donde como se puede observar en la gráfica los portadores muestran D más bajas que los no portadores. En cuanto a la variable C, dichas diferencias se observan en los días 30 y 90 ($p\text{-int} < 0,05$), donde los portadores muestran concentraciones más bajas que los no portadores (gráfica 7).

En general, las gráficas muestran una mayor diferencia entre portadores y no portadores para las variables D, C y C/D, cuando los pacientes son estudiados según el genotipo del donante que según el genotipo receptor. Para la C/D no llegan a ser significativas.

4.3.1.2. Estudio multivariante de medidas repetidas para las variables farmacocinéticas

Se analiza si la influencia de los SNP sobre las variables farmacocinéticas mantiene o no la significación estadística, después de incluir las posibles variables confusoras en el análisis (descritas en el apartado 3.5.2.2 de material y métodos). Este modelo, además contempla la dependencia de las observaciones en diferentes momentos del seguimiento de un mismo individuo, incluyendo al individuo como efecto aleatorio (tal y como se detalla en el apartado 3.5.2.2 de material y métodos). En las tablas se muestran las variantes genéticas que influyen sobre las variables farmacocinéticas (D, C y C/D) y el parámetro “estimación del efecto” después de incluir a las variables confusoras en el modelo. Este parámetro indica el peso y el sentido de la influencia (si la hay) para cada variable.

En el grupo CSA no ha sido posible establecer ningún modelo multivariante ya que ningún polimorfismo tiene una influencia significativa en las variables farmacocinéticas, ni por sí sólo ni en conjunto con otros.

Para el grupo TAC se obtienen los siguientes modelos multivariantes, para cada una de las variables:

Variable Dosis

En la tabla 18 se muestran las variantes genéticas que tienen influencia sobre la Dosis administradas de tacrolimus, y la estimación de su efecto. En concreto, el parámetro estimación del efecto nos informa a nivel cuantitativo, de qué orden es la diferencia que existe entre las dosis medias observadas entre ambos grupos de pacientes (entre los portadores y no portadores) después de haber tenido en cuenta en el modelo las variables confusoras.

Tabla 18. Variantes genéticas que influyen sobre la Dosis y la estimación de su efecto en el modelo multivariante de medidas repetidas.

		Estimación Efecto ¹	Desviación Estandar	valor p
3435C>T_DTE	d3: (CT+TT) – (CC)	-0,002	0,015	0,885
	d7: (CT+TT) – (CC)	-0,026	0,030	0,143
	d14: (CT+TT) – (CC)	-0,043	0,031	0,011
	d30: (CT+TT) – (CC)	-0,058	0,032	0,001
	d90: (CT+TT) – (CC)	-0,052	0,032	0,003

DTE: donante; d: día; ¹ (mg/kg/ día).

Los resultados indican que la variante **c.3435C>T** presente en el donante mantiene su efecto significativo sobre la variable dosis, y que además este efecto varía en el tiempo. Los individuos que recibieron injertos de donantes portadores (genotipo CT+TT) recibieron dosis un 33% más bajas a partir de la segunda semana post-trasplante (día 14) (unos 0,051 mg/kg/día) respecto a los no portadores (genotipo CC). La dosis media fue de 0,156 mg/kg/día.

La influencia del SNP **c.2677G>T/A** del donante sobre la Dosis, pierde su significación estadística cuando se corrige por las variables confusoras.

Variable Concentración:

En la tabla 19 se muestran las variables que tienen influencia sobre la Concentración de TAC en sangre, y la estimación de su efecto. En concreto, el parámetro estimación del efecto nos informa a nivel cuantitativo, de qué orden es la diferencia que existe entre las concentraciones medias observadas entre ambos grupos de pacientes (entre los portadores y no portadores) después de haber tenido en cuenta en el modelo las variables confusoras.

Tabla 19. Variables que influyen sobre la Concentración de tacrolimus y la estimación de su efecto en el modelo multivariante de medidas repetidas.

Variabes	Categorías	Estimación Efecto ¹	Desviación Estándar	valor p
CYP3A5*1/*3_DTE	(GA+AA) - (GG)	-1,760	0,820	0,036
CYP3A4*22_REC	(CT) – (CC)	1,853	1,052	0,084
2677G>T/A_DTE	d3: (GT+GA+TA+TT) – (GG)	1,418	1,300	0,280
	d7: (GT+GA+TA+TT) – (GG)	1,813	3,030	0,848
	d14: (GT+GA+TA+TT) – (GG)	0,342	3,020	0,534
	d30: (GT+GA+TA+TT) – (GG)	-2,992	3,024	0,011
	d90: (GT+GA+TA+TT) – (GG)	-3,067	3,040	0,016
ALT_d0	Continua	1,134	0,430	0,011
GGT_d0	Continua	-0,538	0,228	0,022
GLUC_d0	Continua	0,299	0,125	0,021
MDRD_d0	Continua	0,053	0,018	0,005

DTE: donante; REC: receptor; d: día; ¹ (ng/mL); ALT: Srm—Alanina-aminotransferasa; c.cat.; GGT: Srm— γ -Glutamilttransferasa; c.cat.; GLUC: Srm—Glucosa; c.subst.; MDRD: Velocidad de filtración glomerular (MDRD-IDMS).

Los resultados indican que la presencia de las variantes **CYP3A5*1/*3** y **c.2677G>T/A** en el donante, y de **CYP3A4*22** en el receptor, mantienen un efecto significativo sobre la variable concentración; para **CYP3A5*1/*3** y **CYP3A4*22** dicho efecto es constante en el tiempo y para **c.2677G>T/A** varía en el tiempo.

Los individuos que recibieron injertos de donantes portadores de la variante CYP3A5*1 (genotipo GA+AA) presentan concentraciones un 54% más bajas que los pacientes que recibieron injertos de individuos no portadores (unos 1,760 ng/mL sobre la concentración media de los no portadores, que es de 3,227 ng/mL).

Los pacientes (receptores) portadores de la variante *CYP3A4*22* (genotipo CT) tienden a presentar concentraciones un 57% más altas (unos 1,853 ng/mL sobre la concentración media de 3,227 ng/mL) respecto a los no portadores.

Los individuos que recibieron injertos de donantes portadores de la variante *ABCB1 2677A/T* (genotipo GT+GA+TA+TT) presentan concentraciones un 93% más bajas (unos 3 ng/mL sobre la concentración media de 3,227 ng/mL) a partir del primer mes post-trasplante (día 30) respecto a los no portadores (genotipo GG).

Además de los SNPs mencionados, las variables **ALT**, **GGT**, **GLUC** y **MDRD** también muestran tener una influencia en el modelo con un aporte de 1,134 (35%), -0,528 (16%), 0,299 (9%) y 0,053 (2%), respectivamente, sobre la concentración media de 3,227 ng/mL. Es decir, por cada $\mu\text{kat/L}$ de ALT que tiene de más el paciente, la concentración de tacrolimus es 1,134 ng/mL más alta; por cada $\mu\text{kat/L}$ de GGT que tiene de más el paciente, la concentración de tacrolimus es 0,528 ng/mL más baja, por cada mmol/L de GLUC que tiene de más el paciente, la concentración de tacrolimus es un 0,299 ng/mL más alta; y por cada unidad de MDRD que tiene de más el paciente, la concentración de tacrolimus es un 0,053 más alta.

Variable Concentración/Dosis:

En la tabla 20 se muestran las variables que tienen influencia sobre las ratios de concentración relativa a las dosis administradas de tacrolimus, y la estimación de su efecto.

Tabla 20. Variables que influyen sobre la Concentración/Dosis de tacrolimus y la estimación de su efecto en el modelo multivariante de medidas repetidas.

Variables	Categorías	Estimación Efecto ¹	Desviación Estándar	valor p
CYP3A5*1/*3_DTE	(GA+AA) - (GG)	-22,663	18,384	0,096
3435C>T_DTE	(CT+TT) - (CC)	35,217	15,247	0,025
FAL_D0	Continua	-9,149	3,631	0,015
AST_D0	Continua	37,228	8,569	0,001

DTE: donante; REC: receptor; d: día; ¹ (ng/mL)/(mg/kg/día); FAL: Srm—Fosfatasa alcalina; c.cat.; TBIL: Srm—Bilirrubina; c.subst.:AST: Srm—Aspartato-aminotransferasa; c.cat.; PAD: Presión arterial diastólica (mmHg).

El polimorfismo **c.3435C>T** en el donante mantiene un efecto significativo sobre la relación concentración/dosis, y además dicho efecto es constante en el tiempo. Los individuos que recibieron injertos de donantes portadores del alelo T (genotipo CT+TT) presentan valores de C/D un 329% más altos respecto a los pacientes que recibieron injertos de individuos no portadores (genotipo CC) (unos 35,217 (ng/mL)/(mg/kg/día) sobre la relación concentración/dosis media de los no portadores, que es de 10,698 (ng/mL)/(mg/kg/día)).

El polimorfismo **CYP3A5*1/*3** en el donante, mantiene un efecto significativo sobre la relación concentración/dosis, y además dicho efecto es constante en el tiempo. Los individuos que recibieron injertos de donantes portadores del alelo A (genotipo GA+AA, es decir portadores de *1) tienden a presentar valores de C/D un 212% más bajos respecto a los pacientes que recibieron injertos de individuos no portadores (genotipo GG, *3/*3) (unos 22,663 (ng/mL)/(mg/kg/día) sobre la relación concentración/dosis media de los no portadores, que es de 10,698 (ng/mL)/(mg/kg/día)).

Además de éstas, las variables **FAL** y **AST**, también parecen tener una influencia en el modelo con un aporte de -9,149 (85%) y 37,228 (348%), respectivamente, sobre la relación concentración/dosis media de 10,698 ng/mL/mg/kg/día. Es decir, por cada $\mu\text{kat/L}$ de FAL y AST que tiene de más el paciente, la concentración de tacrolimus es 9,149 más baja y 37,228 más alta, respectivamente.

4.3.1.3. Efecto de la interacción de dos polimorfismos sobre las variables farmacocinéticas.

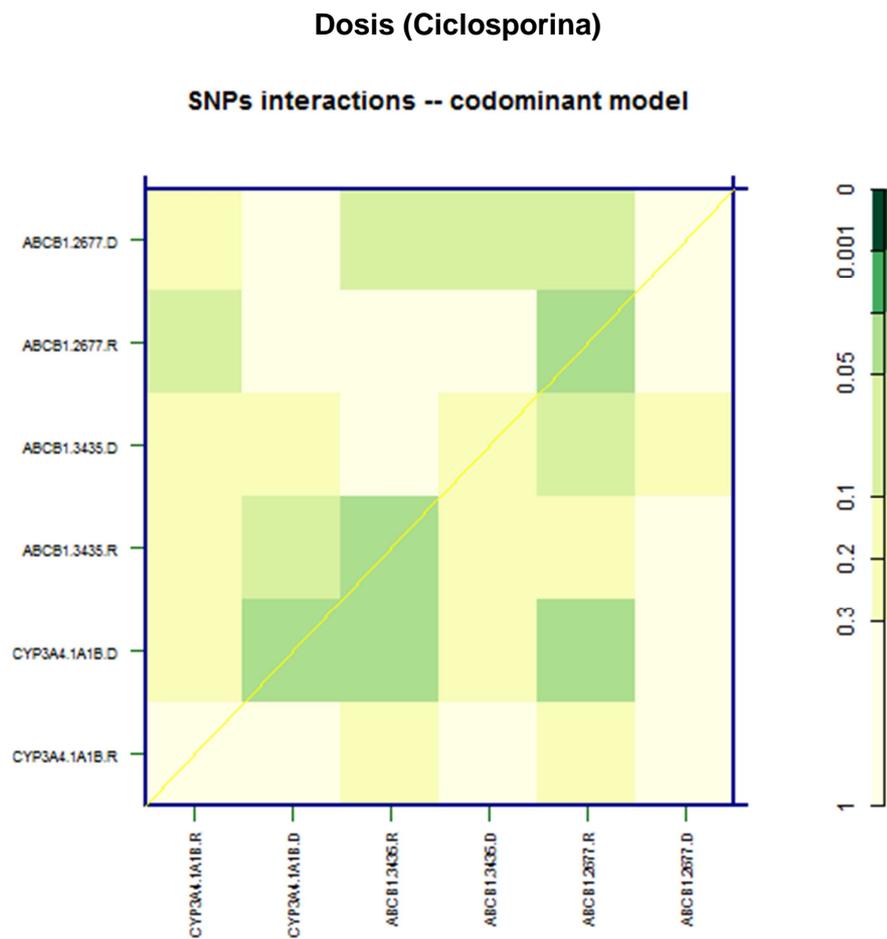
A continuación se muestran las figuras obtenidas después de realizar la primera evaluación de los datos a través de los tests de razón de verosimilitudes. Cada cuadrado se corresponde con cada valor p, representado en una gama de verdes: de oscuros (más significativos) a claros (ausencia de significación estadística). El triángulo superior contiene los valores p del análisis de la interacción entre los pares de SNPs. Los cuadros de la diagonal representan el efecto de cada SNP por sí solo sobre la D, la C y la C/D. Los datos para la D, la C y la C/D se expresan como datos acumulados de las sumas de todas las medidas recogidas para cada día. (Nota: para el grupo CSA, no es posible realizar el estudio estadístico del SNP **CYP3A4*1/*22** por tamaño muestral insuficiente, por lo que no aparecen tablas ni gráficas de éste).

Con ayuda de estas gráficas se identifican las posibles interacciones significativas, y sólo en éstas se lleva a cabo el estudio de interacción específico (teniendo en cuenta la dependencia de las medidas de cada variable realizadas a un mismo paciente en diferentes momentos, mediante un modelo lineal mixto, tal y como se explica en el apartado 3.5.2.2 de material y métodos). Sólo las interacciones cuyo estudio específico resulta estadísticamente significativo ($p < 0,05$) son representadas gráficamente para visualizar la tendencia de dicha interacción entre SNPs según genotipos.

Aunque a continuación se muestran las figuras de los tests de las razones de verosimilitud, que permiten identificar visualmente las interacciones significativas, los resultados y valores p expuestos son únicamente los obtenidos en los estudios definitivos (los específicos de interacción).

GRUPO CSA

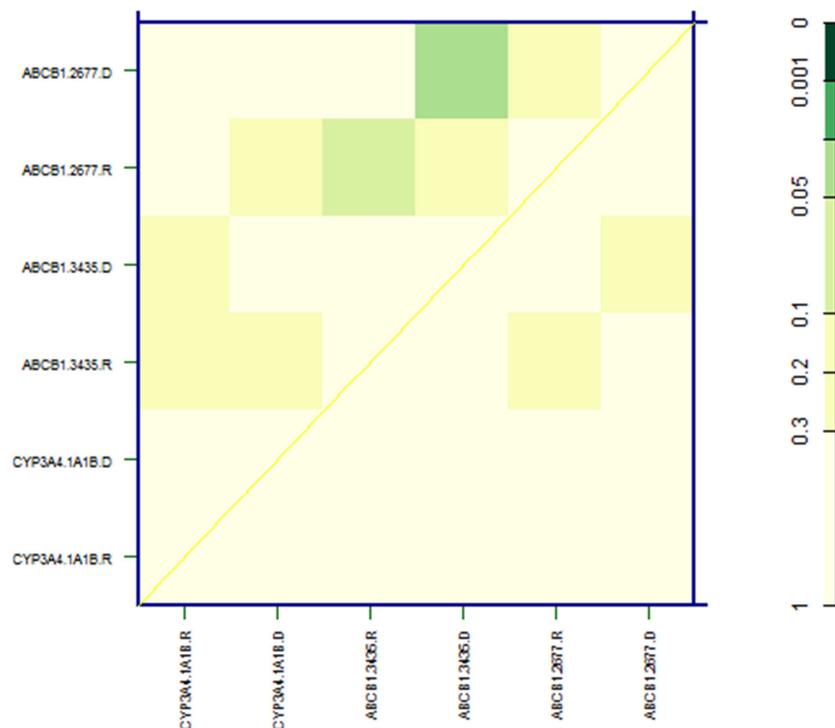
Figuras 14-16. Efecto de la interacción de los pares de SNPs CYP3A4*1/*1B, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A, en receptores, R, y donantes, D, sobre las variables farmacocinéticas en el grupo de pacientes tratados con ciclosporina.



No se observan diferencias con significación estadística ni como efecto individual ni para la combinación de genotipos.

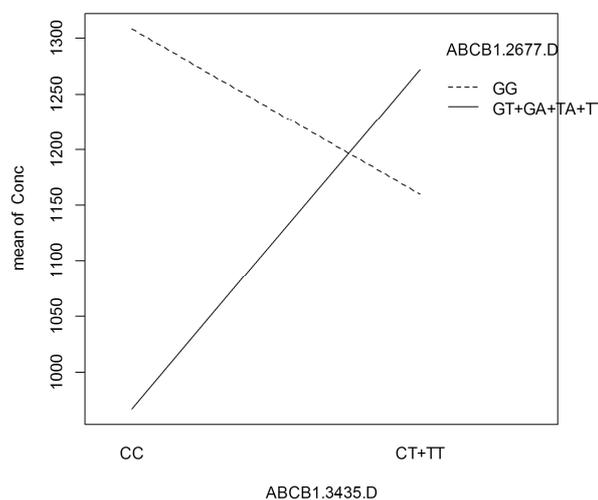
Concentración (C₂ Ciclosporina)

SNPs interactions -- codominant model

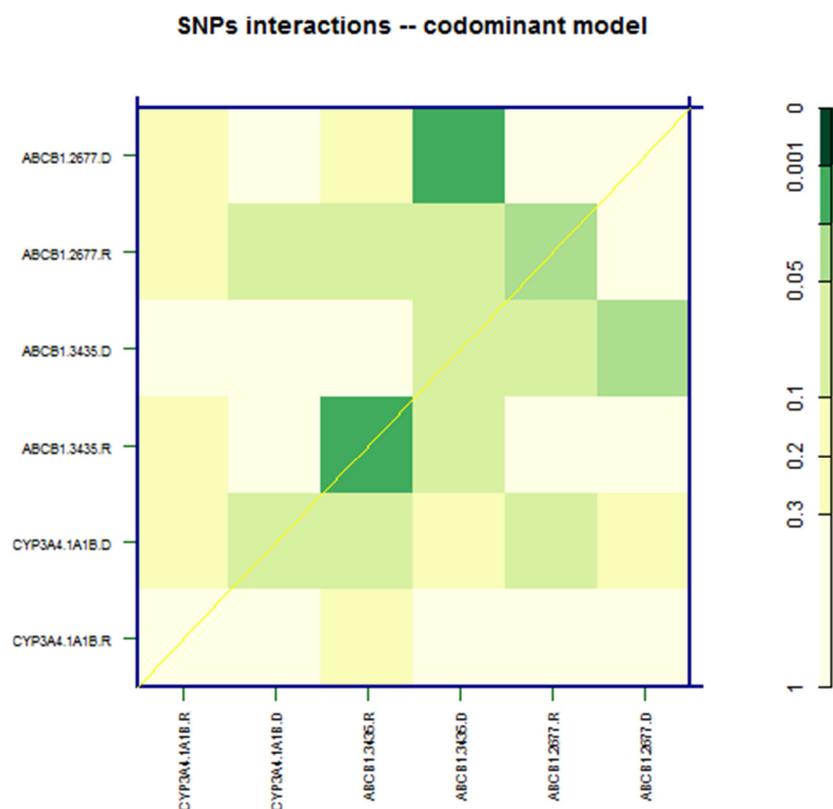


No se observan diferencias para ningún SNP como efecto individual. Sin embargo, se observan diferencias con significación estadística cuando se considera la combinación *ABCB1* 3435 + *ABCB1* 2677 en el donante ($p=0,05$). Los pacientes cuyos donantes eran portadores *ABCB1* 2677 (genotipos GT+GA+TA+TT) presentaron C₂ de ciclosporina significativamente más bajas cuando además eran homocigotos normales (genotipo CC) para el SNP *ABCB1* 3435 en comparación con el resto de combinaciones de genotipos de estas variantes (grafica 8).

Gráfica 8. Estudio específico de la interacción *ABCB1* c.3435C>T y *ABCB1* c.2677G>T/A en donantes para la C₂ en el grupo de pacientes tratados con CSA.



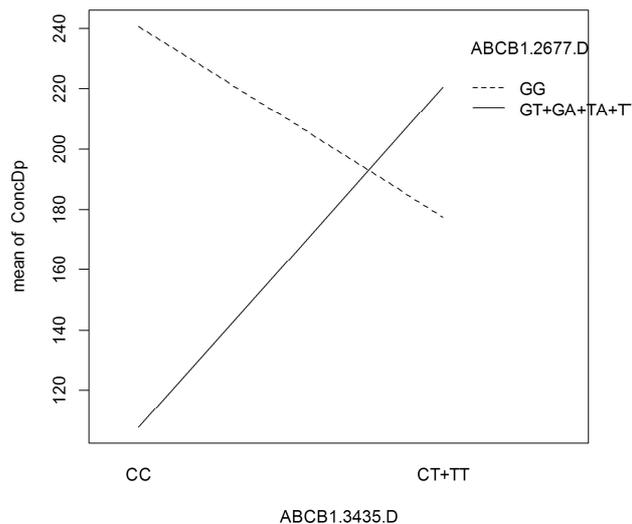
Concentración/Dosis (C_2/D Ciclosporina)



Según el genotipo receptor, los portadores del SNP *ABCB1* *c.3435C>T* muestran diferencias con los no portadores con una tendencia a la significación estadística ($p=0,072$), cuando se estudia como efecto individual. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en los apartados anteriores.

También se observan diferencias con significación estadística para la combinación de los SNPs *ABCB1* *c.3435C>T* + *ABCB1* *c.2677G>T/A* en el donante ($p=0,02$). Los pacientes cuyos donantes eran portadores *ABCB1* 2677 (genotipos GT+GA+TA+TT) presentan C_2/D de ciclosporina más bajas cuando además eran homocigotos normales (genotipo CC) para el SNP *ABCB1* 3435 en comparación con el resto de combinaciones de genotipos de estas variantes (gráfica 9).

Gráfica 9. Estudio específico de la interacción *ABCB1* c.3435C>T y *ABCB1* c.2677G>T/A en donantes para la C_2/D en el grupo de pacientes tratados con CSA.

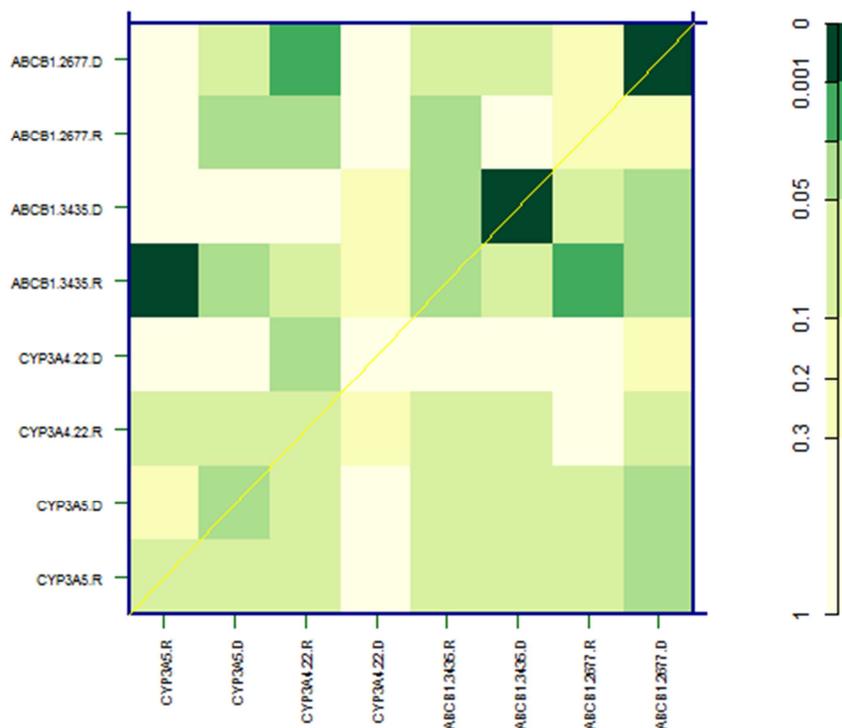


GRUPO TAC

Figuras 17-19. Efecto de la interacción de los pares de SNPs *CYP3A5**1/*3, *CYP3A4**1/*22, *ABCB1* c.3435C>T y *ABCB1* c.2677G>T/A, en receptores y donantes, sobre las variables farmacocinéticas en el grupo de pacientes tratados con tacrolimus.

Dosis (D Tacrolimus)

SNPs interactions -- dominant model



Se observan diferencias con significación estadística en los siguientes SNPs como efecto individual del genotipo del donante:

ABCB1 c.3435C>T ($p=0,029$)

ABCB1 c.2677G>T/A ($p=0,032$)

También se observan diferencias con significación estadística para la combinación:

*CYP3A5*1/*3 + ABCB1 c.3435C>T* en el receptor ($p=0,028$)

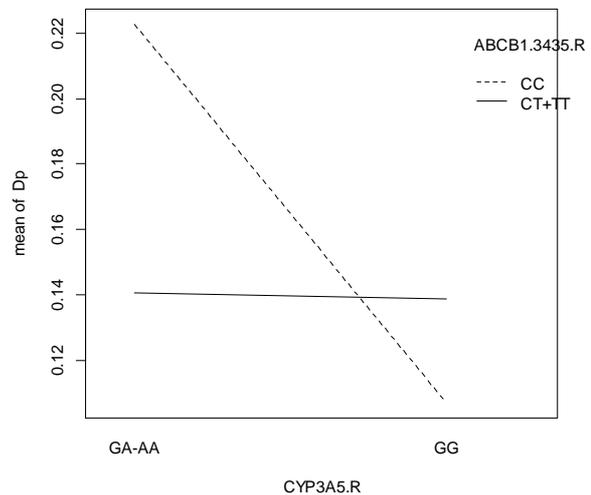
Tendencia a la significación:

*CYP3A4*1/*22* en receptor + *ABCB1 c.2677G>T/A* en donante ($p=0,075$)

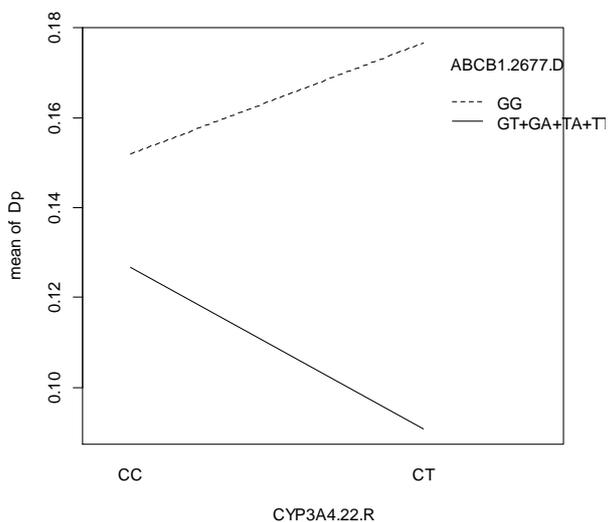
ABCB1 c.3435C>T + ABCB1 c.2677G>T/A en receptor ($p=0,103$).

CYP3A5*1/*3-R * ABCB1c.3435C>T-R ($p=0,028$): los pacientes (receptores) con genotipo portador *CYP3A5*1* (genotipo GA+AA) que además son no portadores *ABCB1 c.3435C>T* (genotipo CC), reciben dosis de tacrolimus más altas que si se considera el resto de combinaciones de genotipos entre ambos SNPs (Gráfica 10).

Gráfica 10. Estudio específico de la interacción *CYP3A5*1/*3 + ABCB1 c.3435C>T* en el receptor para la D en el grupo de pacientes tratados con TAC.



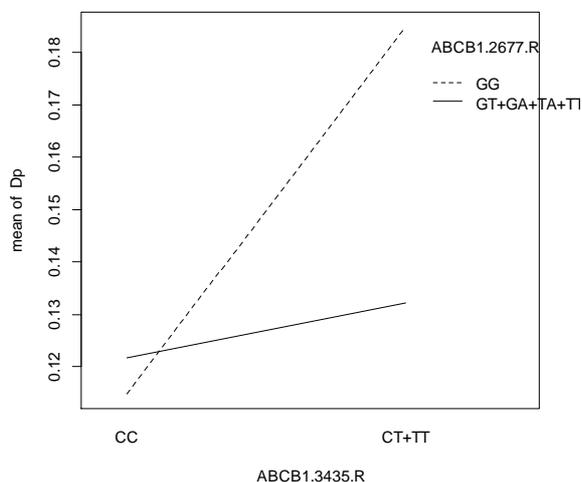
CYP3A4*1/*22-R * ABCB1c.2677G>T/A-D ($p=0,075$): los pacientes (receptores) con genotipo portador CYP3A4*22 (genotipo CT) que además recibieron injertos de donante portador ABCB1 2677T/A (genotipo GT+GA+TA+TT), reciben dosis de tacrolimus más bajas que los que son no portadores ABCB1 2677G (genotipo GG). A su vez, la dosis que recibieron los pacientes (receptores) con genotipo no portador CYP3A4*1 (genotipo CC) no se ve influenciada por el genotipo de ABCB1 c.2677G>T/A del donante (Gráfica 11).



Gráfica 11. Estudio específico de la interacción CYP3A4*1/*22 y ABCB1 c.2677G>T/A en receptor e injerto de donante respectivamente para la D en el grupo de pacientes tratados con TAC.

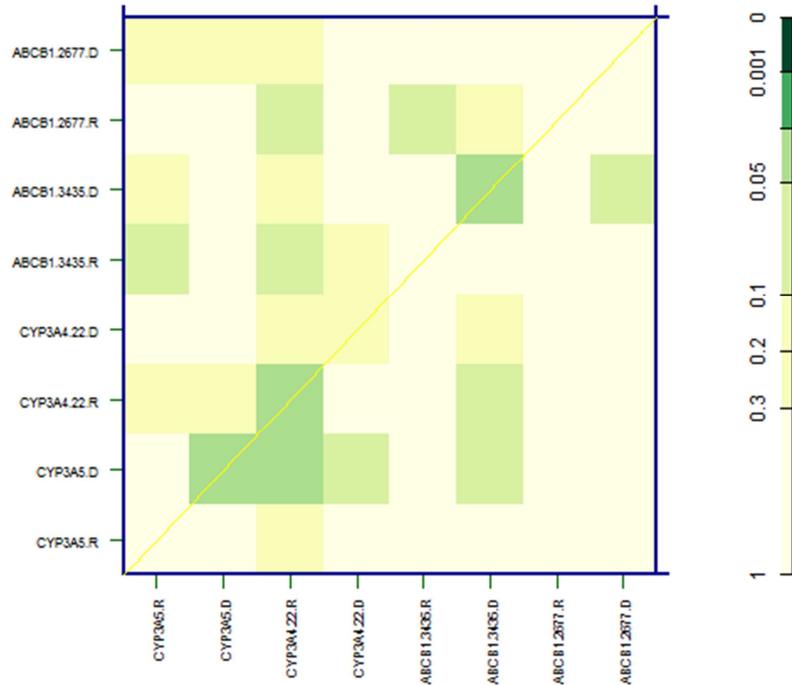
ABCB1c.3435C>T-R * ABCB1c.2677G>T/A-R ($p=0,103$): los pacientes (receptores) con genotipo portador ABCB1 3435T (genotipo CT+TT) que además son no portadores ABCB1 2677G (genotipo GG), reciben dosis de tacrolimus más altas que para el resto de combinaciones de genotipos entre ambos SNPs (Gráfica 12).

Gráfica 12. Estudio específico de la interacción ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en receptor para la D en el grupo de pacientes tratados con TAC.



Concentración (C₀ Tacrolimus)

SNPs interactions -- codominant model

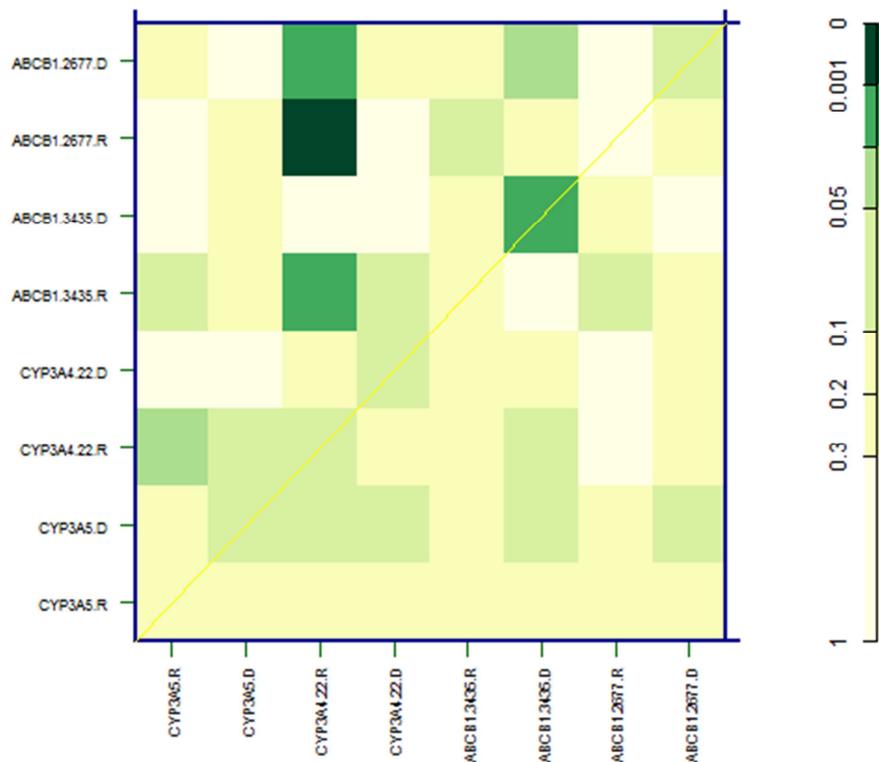


No se observan diferencias con significación estadística para la combinación de SNPs.

Se observan diferencias con significación estadística en los siguientes SNPs como efecto individual: *CYP3A5**1/*3 ($p=0,046$) y *ABCB1* c.3435C>T ($p=0,037$) en el donante, y *CYP3A4**1/*22 ($p=0,052$) en el receptor.

Concentración/Dosis (C_2/D Tacrolimus)

SNPs interactions -- codominant model



Se observan diferencias con significación estadística como efecto individual del genotipo del donante:

ABCB1 c.3435C>T (p=0,021)

Se observan diferencias con significación estadística para las siguientes combinaciones:

*CYP3A4**1/*22 + *ABCB1* c.3435C>T en receptor (p=0,016)

*CYP3A4**1/*22 + *ABCB1* c.2677G>T/A en receptor (p=0,007).

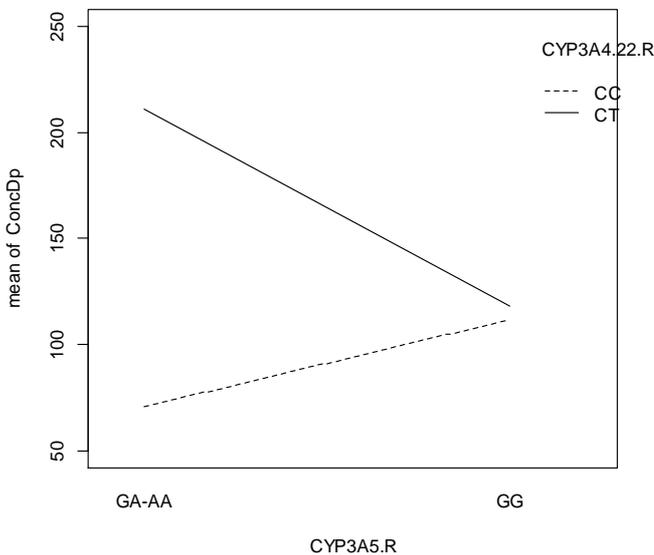
Y con tendencia a la significación para:

*CYP3A5**1/*3 + *CYP3A4**1/*22 en receptor (p=0,06)

*CYP3A4**1/*22 en receptor + *ABCB1* c.2677G>T/A en donante (p=0,06).

CYP3A5*1/*3-R * CYP3A4*1/*22-R (p=0,06): los pacientes (receptores) con genotipo portador CYP3A5*1 (genotipo GA+AA) que además son portadores CYP3A4*22

(genotipo CT), presentan C/D de tacrolimus más altas que los que son no portadores CYP3A4*1 (genotipo CC). A su vez, los que presentan genotipo receptor no portador CYP3A5*3 (genotipo GG) no se ven influenciados por el genotipo de CYP3A4*1/*22 (Gráfica 13).

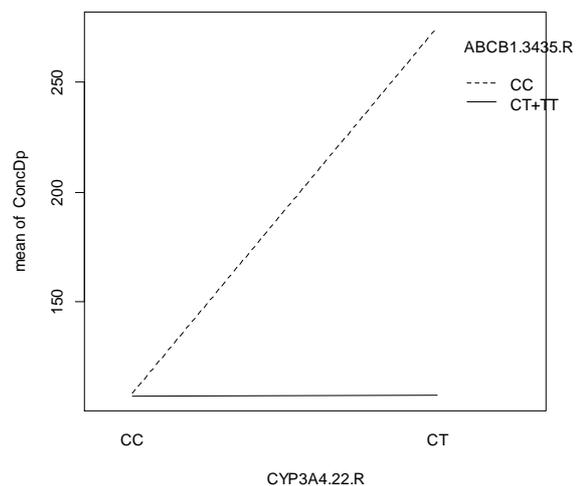


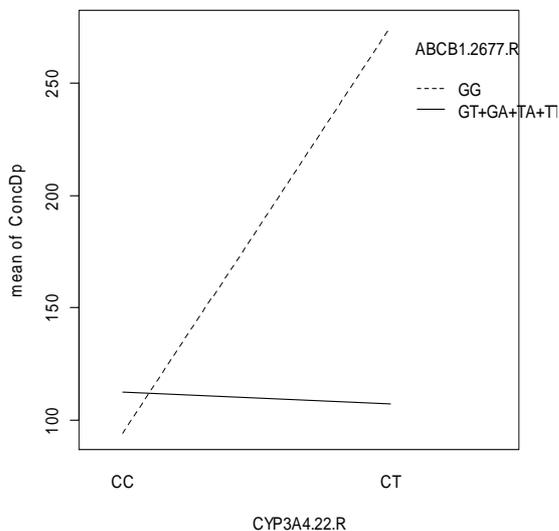
Gráfica 13. Estudio específico de la interacción CYP3A5*1/*3 y CYP3A4*1/*22 2677G>T/A en receptor para la C/D en el grupo de pacientes tratados con TAC.

CYP3A4*1/*22-R * ABCB1c.3435C>T-R

(p=0,016): los pacientes (receptores) con genotipo portador CYP3A4*22 (genotipo CT) que además son no portadores ABCB1 c.3435C>T (genotipo CC), presentan C/D de tacrolimus más altas que para el resto de combinaciones de genotipos entre ambos SNPs (Gráfica 14).

Gráfica 14. Estudio específico de la interacción CYP3A4*1/*22 y ABCB1 c.3435C>T en receptor para la C/D en el grupo de pacientes tratados con TAC.



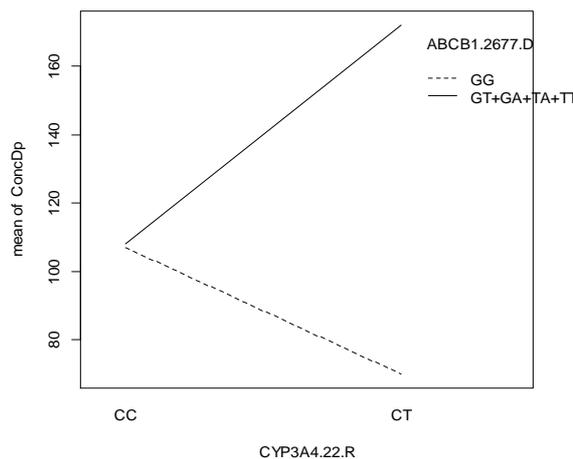


CYP3A4*1/*22-R * ABCB1c.2677G>T/A-R ($p=0,007$): los pacientes (receptores) con genotipo portador *CYP3A4*22* (genotipo CT) que además son no portadores *ABCB1 2677G* (genotipo GG), presentan C/D de tacrolimus más altas que para el resto de combinaciones de genotipos entre ambos SNPs (Gráfica 15).

Gráfica 15. Estudio específico de la interacción *CYP3A4*1/*22* y *ABCB1 c.2677G>T/A* en receptor para la C/D en el grupo de pacientes tratados con TAC.

CYP3A4*1/*22-R * ABCB1c.2677G>T/A-D ($p=0,06$): los pacientes (receptores) con genotipo portador *CYP3A4*22* (genotipo CT) que además recibieron injertos de donante portador *ABCB1 2677T/A* (genotipo GT+GA+TA+TT), presentan C/D de tacrolimus más altas que los que son no portadores *ABCB1 2677G* (genotipo GG). A su vez, el genotipo receptor no portador *CYP3A4*22* (genotipo CC) no se ve influenciado por el genotipo de *ABCB1 c.2677G>T/A* (Gráfica 16).

Gráfica 16. Estudio específico de la interacción *CYP3A4*1/*22* y *ABCB1 2677* en receptor e injerto de donante, respectivamente, para la C/D en el grupo de pacientes tratados con TAC.



4.3.2. Variables clínicas

En el apartado 3.3.2 de material y métodos se han definido las variables de interés clínico (incidencia de rechazo agudo, neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hipertensión arterial, diabetes *mellitus de novo* y recidiva por VHC) utilizadas para relacionar el genotipo del paciente con la eficacia o toxicidad del tratamiento con ciclosporina o tacrolimus tras el trasplante hepático.

Se ha estudiado la relación de las variables clínicas con los SNPs mencionados en el apartado 3.2.3 de material y métodos, con el objetivo de identificar alguna influencia del genotipo del paciente con la eficacia y seguridad de ambos fármacos, en términos de profilaxis del rechazo agudo y aparición de efectos adversos, respectivamente.

Dicha influencia se ha estudiado como se define en el apartado 3.5 de material y métodos, para cada polimorfismo de forma individual (test exacto de Fisher) y como interacción de dos polimorfismos de forma conjunta (test de razón de verosimilitudes), bien sea considerando el genotipo de los donantes o el de los receptores.

A continuación se muestran las tablas y figuras obtenidas para cada variable y para cada polimorfismo, agrupándolos en subgrupos en función del genotipo que presenten (portador vs no portador).

4.3.2.1. Efecto individual de cada polimorfismo sobre las variables clínicas

Rechazo agudo

Del total de pacientes en seguimiento, presentaron rechazo agudo, durante los 3 primeros meses post-trasplante, el 10,1% de los pacientes (n=7) en el grupo CSA y el 3% de los pacientes (n=2) en el grupo TAC. En las tabla 21 y 22 se muestra la influencia del genotipo en la incidencia de rechazo agudo para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 21 Influencia de los SNPs CYP3A4*1B, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en la incidencia de rechazo agudo en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	Rechazo Agudo	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=63)	AG+GG (n=6)	AA (n=58)	AG+GG (n=11)
CYP3A4 (-392A>G)	No	56 (88,9%)	6 (100%)	51 (87,9%)	11 (100%)
	Sí	7 (11,1%)	0 (0,0%)	7 (12,1%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	>0,99		0,59	
CYP3A4*22(-191C>T)		CC (n=64)	CT (n=4)	CC (n=67)	CT (n=2)
	No	57 (89,1%)	4 (100%)	60 (89,6%)	2 (100%)
	Sí	7 (10,9%)	0 (0,0%)	7 (10,4%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
ABCB1 c.3435C>T		CC (n=21)	CT+TT (n=48)	CC (n=16)	CT+TT (n=53)
	No	18 (85,7%)	44 (91,7%)	16 (100%)	46 (86,8%)
	Sí	3 (14,3%)	4 (8,3%)	0 (0,0%)	7 (13,2%)
<i>p</i>	0,67		0,19		
ABCB1 c.2677G>T/A		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=51)	GG (n=24)	GT+GA+TA+TT (n=45)
	No	16 (88,9%)	46 (90,2%)	23 (95,8%)	39 (86,7%)
	Sí	2 (11,1%)	5 (9,8%)	1 (4,2%)	6 (13,3%)
<i>p</i>	>0,99		0,41		

En el grupo CSA, cuando se estudia según el genotipo donante, se observa que para el SNP ABCB1 c.3435C>T existe una tendencia a la significación ($p=0,19$): cuando el donante es no portador (genotipo CC) se observa un menor porcentaje de pacientes (0%; $n=0$) con rechazo agudo del injerto en los 3 primeros meses post-trasplante.

Tabla 22. Influencia de los SNPs CYP3A5, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en la incidencia de rechazo agudo en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	Rechazo Agudo	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=59)	GA+AA (n=8)	GG (n=54)	GA+AA (n=13)
CYP3A5 (6986 A>G)	No	57 (96,6%)	8 (100%)	52 (96,3%)	13 (100%)
	Sí	2 (3,4%)	0 (0,0%)	2 (3,7%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	>0,99		>0,99	
CYP3A4*22(-191C>T)		CC (n=57)	CT (n=8)	CC (n=55)	CT (n=12)
	No	56 (98,2%)	7 (87,5%)	54 (98,2%)	11 (91,7%)
	Sí	1 (1,8%)	1 (12,5%)	1 (1,8%)	1 (8,3%)
<i>p</i>	0,23		0,33		
ABCB1 (c.3435C>T)		CC (n=15)	CT+TT (n=52)	CC (n=22)	CT+TT (n=45)
	No	15 (100%)	50 (96,2%)	21 (95,5%)	44 (97,8%)
	Sí	0 (0,0%)	2 (3,8%)	1 (4,5%)	1 (2,2%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
ABCB1 (c.2677G>T/A)		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=49)	GG (n=26)	GT+GA+TA+TT (n=40)
	No	17 (94,4%)	48 (98,0%)	25 (96,2%)	39 (97,5%)
	Sí	1 (5,6%)	1 (2,0%)	1 (3,8%)	1 (2,5%)
<i>p</i>	0,47		>0,99		

En el grupo TAC y para el resto de polimorfismos estudiados en el grupo CSA, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la incidencia de rechazo agudo ($p>0,05$), ni cuando son estudiados según el genotipo de donante ni de receptor.

Neurotoxicidad

Del total de pacientes en seguimiento presentaron aparición de síntomas de neurotoxicidad, durante los 3 primeros meses post-trasplante, el 7,2% de los pacientes (n=5) en el grupo CSA y el 7,5% de los pacientes (n=5) en el grupo TAC. En las tablas 23 y 24 se muestra la influencia del genotipo en la aparición de síntomas de neurotoxicidad para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 23. Influencia de los SNPs *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T/A* en la presencia de síntomas de neurotoxicidad en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	Neurotoxicidad	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=63)	AG+GG (n=6)	AA (n=58)	AG+GG (n=11)
<i>CYP3A4</i> (-392A>G)	No	60 (95,2%)	4 (66,7%)	53 (91,4%)	11 (100%)
	Sí	3 (4,8%)	2 (33,2%)	5 (8,6%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	0,05		0,58	
<i>CYP3A4*22</i> (-191C>T)	No	60 (93,8%)	3 (75,0%)	62 (92,5%)	2 (100%)
	Sí	4 (6,2%)	1 (25,0%)	5 (7,5%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	0,27		>0,99	
<i>ABCB1</i> (c.3435C>T)	No	19 (90,5%)	45 (93,8%)	16 (100%)	48 (90,6%)
	Sí	2 (9,5%)	3 (6,2%)	0 (0,0%)	5 (9,4%)
	<i>p</i>	0,64		0,58	
<i>ABCB1</i> (c.2677G>T/A)	No	16 (88,9%)	48 (94,1%)	23 (95,8%)	41 (91,1%)
	Sí	2 (11,1%)	3 (5,9%)	1 (4,2%)	4 (8,9%)
	<i>p</i>	0,60		0,65	

Según el genotipo de receptor, para el grupo CSA se observa una influencia del SNP *CYP3A4*1B*. En los pacientes portadores (genotipo AG+GG) se observa un mayor porcentaje de casos (33,2%; n=2) con aparición de síntomas de neurotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante.

Para el resto de polimorfismos estudiados, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la presencia de síntomas de neurotoxicidad ($p > 0,05$), ni cuando son estudiados según el genotipo de donante ni de receptor.

Tabla 24. Influencia de los SNPs CYP3A5, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en la presencia de síntomas de neurotoxicidad en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	Neurotoxicidad	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=59)	GA+AA (n=8)	GG (n=54)	GA+AA (n=13)
CYP3A5 (6986 A>G)	No	55 (93,2%)	7 (87,5%)	49 (90,7%)	13 (100%)
	Sí	4 (6,8%)	1 (12,5%)	5 (9,3%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	0,48		0,57	
CYP3A4*22 (-191C>T)		CC (n=57)	CT (n=8)	CC (n=55)	CT (n=12)
	No	52 (91,2%)	8 (100%)	51 (92,7%)	11 (91,7%)
	Sí	5 (8,8%)	0 (0,0%)	4 (7,3%)	1 (8,3%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
ABCB1 (c.3435C>T)		CC (n=15)	CT+TT (n=52)	CC (n=22)	CT+TT (n=45)
	No	18 (86,7%)	49 (94,2%)	19 (86,4%)	43 (95,6%)
	Sí	2 (13,3%)	3 (5,8%)	3 (13,6%)	2 (4,4%)
<i>p</i>	0,31		0,32		
ABCB1 (c.2677G>T/A)		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=49)	GG (n=26)	GT+GA+TA+TT (n=40)
	No	17 (94,4%)	45 (91,8%)	21 (80,8%)	40 (100%)
	Sí	1 (5,6%)	4 (8,2%)	5 (19,2%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	>0,99		0,01		

Para el grupo TAC se observa una influencia del genotipo del SNP ABCB1 c.2677G>T/A según el genotipo de donante. Es decir que cuando el donante es no portador (genotipo GG) se observa un mayor porcentaje de pacientes (19,2%; n=5) con aparición de síntomas de neurotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante.

Para el resto de polimorfismos estudiados, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la presencia de

síntomas de neurotoxicidad ($p>0,05$), ni cuando son estudiados según genotipo de donante ni de receptor.

Nefrotoxicidad

El 17,4% de los pacientes presentaron nefrotoxicidad durante los tres primeros meses post-trasplante ($n=12$), en el grupo CSA y el 16,4% de los pacientes ($n=11$) en el grupo TAC. De los cuales, el 17,4% ($n=4$) se confirmó mediante biopsia renal y el 82,6% ($n=19$) fue sospecha por presentar una disminución del MDRD < 60 mL/min/1,73 m² asociado a concentraciones elevadas de fármaco inmunosupresor en sangre. En las tabla 25 y 26 se muestra la influencia del genotipo en la presencia de nefrotoxicidad en los tres primeros meses post-trasplante para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 25. Influencia de los SNPs CYP3A4*1B, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en la presencia de nefrotoxicidad en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	Nefrotoxicidad	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=63)	AG+GG (n=6)	AA (n=58)	AG+GG (n=11)
CYP3A4 (-392A>G)	No	51 (81,0%)	6 (100%)	48 (82,8%)	9 (81,8%)
	Sí	12 (19,0%)	0 (0,0%)	10 (17,2%)	2 (18,2%)
	<i>p</i>	0,58		>0,99	
CYP3A4*22(-191C>T)	No	52 (81,2%)	4 (100%)	56 (83,6%)	1 (50,0%)
	Sí	12 (18,8%)	0 (0,0%)	11 (16,4%)	1 (50,0%)
	<i>p</i>	>0,99		0,32	
ABCB1 (c.3435C>T)	No	18 (85,7%)	39 (81,2%)	14 (87,5%)	43 (81,1%)
	Sí	3 (14,3%)	9 (18,8%)	2 (12,5%)	10 (18,9%)
	<i>p</i>	0,74		0,72	
ABCB1 (c.2677G>T/A)	No	14 (77,8%)	43 (84,3%)	21 (87,5%)	36 (80,0%)
	Sí	4 (22,2%)	8 (15,7%)	3 (12,5%)	9 (20,0%)
	<i>p</i>	0,50		0,52	

Tabla 26. Influencia de los SNPs CYP3A5, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A en la presencia de nefrotoxicidad en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	Nefrotoxicidad	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=59)	GA+AA (n=8)	GG (n=54)	GA+AA (n=13)
CYP3A5 (6986 A>G)	No	51 (86,4%)	5 (62,5%)	47 (87,0%)	9 (69,2%)
	Sí	8 (13,6%)	3 (37,5%)	7 (13,0%)	4 (30,8%)
	<i>p</i>	0,12		0,20	
CYP3A4*22(-191C>T)		CC (n=57)	CT (n=8)	CC (n=55)	CT (n=12)
	No	46 (80,7%)	8 (100%)	46 (83,6%)	10 (83,3%)
	Sí	11 (19,3%)	0 (0,0%)	9 (16,4%)	2 (16,7%)
<i>p</i>	0,33		>0,99		
ABCB1 (c.3435C>T)		CC (n=15)	CT+TT (n=52)	CC (n=22)	CT+TT (n=45)
	No	14 (93,3%)	42 (80,8%)	20 (90,9%)	36 (80,0%)
	Sí	1 (6,7%)	10 (19,2%)	2 (9,1%)	9 (20,0%)
<i>p</i>	0,43		0,32		
ABCB1 (c.2677G>T/A)		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=49)	GG (n=26)	GT+GA+TA+TT (n=40)
	No	17 (94,4%)	39 (79,6%)	24 (92,3%)	31 (77,5%)
	Sí	1 (5,6%)	10 (20,4%)	2 (7,7%)	9 (22,5%)
<i>p</i>	0,26		0,18		

En el grupo TAC, cuando se estudia según el genotipo de receptor, se observa que para el SNP CYP3A5 existe una tendencia a la significación ($p=0,12$). Los portadores (genotipo GA+AA) tienden a presentar un mayor porcentaje de casos de nefrotoxicidad (37,5%; $n=3$) en los 3 primeros meses post-trasplante.

En el grupo CSA y para el resto de polimorfismos estudiados en el grupo TAC, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la presencia de síntomas de nefrotoxicidad ($p>0,05$), ni según genotipo de donante ni de receptor.

Hipertensión arterial

Del total de pacientes en seguimiento, presentaron hipertensión arterial, durante los tres primeros meses post-trasplante, el 44,9% de los pacientes (n=31) en el grupo CSA y el 31,3% de los pacientes (n=21) en el grupo TAC. En las tablas 27 y 28 se muestra la influencia del genotipo sobre la hipertensión arterial para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 27. Influencia de los SNPs *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T/A* sobre la hipertensión arterial en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	HTA	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=63)	AG+GG (n=6)	AA (n=58)	AG+GG (n=11)
<i>CYP3A4</i> (-392A>G)	No	35 (55,6%)	3 (50,0%)	31 (53,4%)	7 (63,6%)
	Sí	28 (44,4%)	3 (50,0%)	27 (46,6%)	4 (36,4%)
	<i>p</i>	>0,99		0,74	
<i>CYP3A4*22</i> (-191C>T)		CC (n=64)	CT (n=4)	CC (n=67)	CT (n=2)
	No	33 (51,6%)	4 (100%)	36 (53,7%)	2 (100%)
	Sí	31 (48,4%)	0 (0,0%)	31 (46,3%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	0,12		0,50		
<i>ABCB1</i> (c.3435C>T)		CC (n=21)	CT+TT (n=48)	CC (n=16)	CT+TT (n=53)
	No	10 (47,6%)	28 (58,3%)	10 (62,5%)	28 (52,8%)
	Sí	11 (52,4%)	20 (41,7%)	6 (37,5%)	25 (47,2%)
<i>p</i>	0,44		0,57		
<i>ABCB1</i> (c.2677G>T/A)		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=51)	GG (n=24)	GT+GA+TA+TT (n=45)
	No	7 (38,9%)	31 (60,8%)	15 (62,5%)	23 (51,1%)
	Sí	11 (61,1%)	20 (39,2%)	9 (37,5%)	22 (48,9%)
<i>p</i>	0,17		0,45		

En el grupo CSA, cuando se estudian los pacientes según el genotipo del receptor, se observa que los SNPs *CYP3A4*22* y *ABCB1 2677* presentan una tendencia a la significación ($p=0,12$ y $p=0,17$, respectivamente). Para el SNP *CYP3A4*22*, los portadores (genotipo CT) tienden a presentar un menor porcentaje de casos (0,0%;

n=0) con hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante. Para el SNP *ABCB1* 2677, los no portadores (genotipo GG) tienden a presentar un mayor porcentaje de casos (61,1%, n=11) con hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante.

Para el resto de polimorfismos, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la presencia de hipertensión arterial ($p>0,05$), ni según genotipo de donante ni de receptor.

Tabla 28. Influencia de los SNPs *CYP3A5*, *CYP3A4*22*, *ABCB1* c.3435C>T y *ABCB1* c.2677G>T/A sobre la hipertensión arterial en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	HTA	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=59)	GA+AA (n=8)	GG (n=54)	GA+AA (n=13)
<i>CYP3A5</i> (6986 A>G)	No	43 (72,9%)	3 (37,5%)	40 (74,1%)	6 (46,2%)
	Sí	16 (27,1%)	5 (62,5%)	14 (25,9%)	7 (53,8%)
	<i>p</i>	0,10		0,09	
<i>CYP3A4*22</i> (-191C>T)		CC (n=57)	CT (n=8)	CC (n=55)	CT (n=12)
	No	39 (68,4%)	6 (75,0%)	38 (69,1%)	8 (66,7%)
	Sí	18 (31,6%)	2 (25,0%)	17 (30,9%)	4 (33,3%)
	<i>p</i>	>0,99		>0,99	
<i>ABCB1</i> (c.3435C>T)		CC (n=15)	CT+TT (n=52)	CC (n=22)	CT+TT (n=45)
	No	12 (80,0%)	34 (65,4%)	17 (77,3%)	29 (64,4%)
	Sí	3 (20,0%)	18 (34,6%)	5 (22,7%)	16 (35,6%)
	<i>p</i>	0,36		0,40	
<i>ABCB1</i> (c.2677G>T/A)		GG (n=18)	GT+GA+TA+TT (n=49)	GG (n=26)	GT+GA+TA+TT (n=40)
	No	15 (83,3%)	31 (63,3%)	18 (69,2%)	28 (70,0%)
	Sí	3 (16,7%)	18 (36,7%)	8 (30,8%)	12 (30,0%)
	<i>p</i>	0,15		>0,99	

En el grupo TAC, se observa que para el SNP *CYP3A5* (cuando se estudia tanto según el genotipo de receptor como del donante), y para el SNP *ABCB1* 2677 (sólo según el genotipo del receptor) existe una tendencia a la significación ($p=0,10$, $p=0,09$

y $p=0,15$, respectivamente). Para el SNP *CYP3A5*, los portadores (genotipo GA+AA, es decir los portadores *1) presentan un mayor porcentaje de pacientes (62,5% y 53,8%, $n=5$ y $n=7$, respectivamente) con hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante. Para el SNP *ABCB1 2677*, los no portadores (genotipo GG) presentan un menor porcentaje de casos (16,7%, $n=3$) con hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante.

Para el resto de polimorfismos, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la presencia de hipertensión arterial ($p>0,05$), ni en el grupo de donantes ni en el de receptores.

Diabetes mellitus

Del total de pacientes incluidos en el estudio, 18 pacientes eran diabéticos antes del trasplante, por tanto se excluyeron del análisis. Del resto, presentaron diabetes *mellitus de novo* el 9,7% de los pacientes ($n=6$) en el grupo CSA y el 12,5% de los pacientes ($n=7$) en el grupo TAC. En las tabla 29 y 30 se muestra la influencia del genotipo sobre la presencia de diabetes *mellitus de novo* para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 29. Influencia de los SNPs CYP3A4*1B, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A sobre la diabetes mellitus de novo en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	DM	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=56)	AG+GG (n=6)	AA (n=51)	AG+GG (n=11)
CYP3A4 (-392A>G)	No	51 (91,1%)	5 (83,3%)	47 (92,2%)	9 (81,8%)
	Sí	5 (8,9%)	1 (16,7%)	4 (7,8%)	2 (18,2%)
	<i>p</i>	0,47		0,29	
CYP3A4*22 (-191C>T)		CC (n=57)	CT (n=4)	CC (n=60)	CT (n=2)
	No	52 (91,2%)	4 (100%)	54 (90,0%)	2 (100%)
	Sí	5 (8,8%)	0 (0,0%)	6 (10,0%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
ABCB1 (c.3435C>T)		CC (n=17)	CT+TT (n=45)	CC (n=15)	CT+TT (n=47)
	No	16 (94,1%)	40 (88,9%)	15 (100%)	41 (87,2%)
	Sí	1 (5,9%)	5 (11,1%)	0 (0,0%)	6 (12,8%)
<i>p</i>	>0,99		0,32		
ABCB1 (c.2677G>T/A)		GG (n=15)	GT+GA+TA+TT (n=47)	GG (n=22)	GT+GA+TA+TT (n=40)
	No	14 (93,3%)	42 (89,4%)	21 (95,5%)	35 (87,5%)
	Sí	1 (6,7%)	5 (10,6%)	1 (4,5%)	5 (12,5%)
<i>p</i>	>0,99		0,41		

En el grupo CSA no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la aparición de diabetes *mellitus de novo* ($p>0,05$), ni según genotipo de donante ni de receptor.

Tabla 30. Influencia de los SNPs CYP3A5, CYP3A4*22, ABCB1 c.3435C>T y ABCB1 c.2677G>T/A sobre la diabetes mellitus de novo en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	DM	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=49)	GA+AA (n=7)	GG (n=48)	GA+AA (n=8)
CYP3A5 (6986 A>G)	No	43 (87,8%)	6 (85,7%)	41 (85,4%)	8 (100%)
	Sí	6 (12,2%)	1 (14,3%)	7 (14,6%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	>0,99		0,58	
CYP3A4*22 (-191C>T)		CC (n=48)	CT (n=6)	CC (n=46)	CT (n=10)
	No	42 (87,5%)	5 (83,3%)	40 (87,0%)	9 (90,0%)
	Sí	6 (12,5%)	1 (16,7%)	6 (13,0%)	1 (10,0%)
	<i>p</i>	>0,99		>0,99	
ABCB1 (c.3435C>T)		CC (n=13)	CT+TT (n=43)	CC (n=17)	CT+TT (n=39)
	No	12 (92,3%)	37 (86,0%)	13 (76,5%)	36 (92,3%)
	Sí	1 (7,7%)	6 (14,0%)	4 (23,5%)	3 (7,7%)
	<i>p</i>	>0,99		0,18	
ABCB1 (c.2677G>T/A)		GG (n=14)	GT+GA+TA+TT (n=42)	GG (n=20)	GT+GA+TA+TT (n=35)
	No	12 (85,7%)	37 (88,1%)	17 (85,0%)	31 (88,6%)
	Sí	2 (14,3%)	5 (11,9%)	3 (15,0%)	4 (11,4%)
	<i>p</i>	>0,99		0,70	

En el grupo TAC, se observa que existe una tendencia a la significación ($p=0,18$) para la relación entre el genotipo del SNP ABCB1 3435 en los donantes y la aparición de diabetes. Cuando el donante es no portador (genotipo CC) aparece un mayor porcentaje de casos (23,5%; $n=4$) de diabetes *mellitus de novo* en los 3 primeros meses post-trasplante.

Para el resto de polimorfismos estudiados en el grupo TAC, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la aparición de diabetes *mellitus de novo* ($p>0,05$), ni según genotipo de donante ni de receptor.

Recidiva Virus de la Hepatitis C (VHC)

Del total de pacientes incluidos en el estudio, 65 pacientes presentaban infección por el VHC antes del trasplante (27 del grupo CSA y 38 del grupo TAC). De estos 65 pacientes, presentaron recidiva del VHC el 25,9% de ellos (n=7) en el grupo CSA y el 7,9% (n=3) en el grupo TAC. En las tabla 31 y 32 se muestra la influencia del genotipo sobre la recidiva de VHC para los grupos CSA y TAC, respectivamente.

Tabla 31. Influencia de los SNPs *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T/A* sobre la recidiva de VHC en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo CSA.

SNP	VHC	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		AA (n=23)	AG+GG (n=4)	AA (n=22)	AG+GG (n=5)
<i>CYP3A4</i> (-392A>G)	No	17 (73,9%)	3 (75,0%)	15 (68,2%)	5 (100,0%)
	Sí	6 (26,1%)	1 (25,0%)	7 (31,8%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	>0,99		0,28	
<i>CYP3A4*22</i> (-191C>T)		CC (n=25)	CT (n=1)	CC (n=25)	CT (n=2)
	No	18 (72,0%)	1 (100%)	18 (72,0%)	2 (100%)
	Sí	7 (28,0%)	0 (0,0%)	7 (28,0%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
<i>ABCB1</i> (c.3435C>T)		CC (n=11)	CT+TT (n=16)	CC (n=7)	CT+TT (n=20)
	No	6 (54,5%)	14 (87,5%)	7 (100%)	13 (65,0%)
	Sí	5 (45,5%)	2 (12,5%)	0 (0,0%)	7 (35,0%)
<i>p</i>	0,08		0,14		
<i>ABCB1</i> (c.2677G>T/A)		GG (n=10)	GT+GA+TA+TT (n=17)	GG (n=8)	GT+GA+TA+TT (n=19)
	No	6 (60,0%)	14 (82,4%)	8 (100%)	12 (63,2%)
	Sí	4 (40,0%)	3 (17,6%)	0 (0,0%)	7 (36,8%)
<i>p</i>	0,36		0,07		

En el grupo CSA se observa que para los genotipos de los SNPs *ABCB1* 3435 en receptores y donantes, y *ABCB1* 2677 de donantes, existe una tendencia a la significación ($p=0,08$, $p=0,14$ y $p=0,07$, respectivamente). Para el SNP *ABCB1* 3435, en los receptores no portadores (genotipo CC) aparece un mayor porcentaje de

pacientes (45,5%; n=5) con recidiva por VHC en los 3 primeros meses post-trasplante. Cuando el genotipo del donante es portador (genotipo CT+TT) se observa un mayor porcentaje de casos (35,0%; n=7) con recidiva por VHC en los 3 primeros meses post-trasplante. Para el SNP *ABCB1* 2677, los portadores (genotipo GT+GA+TA+TT) presentan un mayor porcentaje de casos (36,8%, n=7) con recidiva por VHC en los 3 primeros meses post-trasplante.

Tabla 32. Influencia de los SNPs *CYP3A5*, *CYP3A4*22*, *ABCB1* c.3435C>T y *ABCB1* c.2677G>T/A sobre la recidiva de VHC en los tres primeros meses post-trasplante en el grupo TAC.

SNP	VHC	Genotipo Receptor		Genotipo Donante	
		GG (n=33)	GA+AA (n=5)	GG (n=31)	GA+AA (n=7)
<i>CYP3A5</i> (6986 A>G)	No	30 (90,9%)	5 (100,0%)	28 (90,3%)	7 (100%)
	Sí	3 (9,1%)	0 (0,0%)	3 (9,7%)	0 (0,0%)
	<i>p</i>	>0,99		>0,99	
<i>CYP3A4*22</i> (-191C>T)		CC (n=33)	CT (n=4)	CC (n=34)	CT (n=4)
	No	30 (90,9%)	4 (100%)	31 (91,2%)	4 (100%)
	Sí	3 (9,1%)	0 (0,0%)	3 (8,8%)	0 (0,0%)
<i>p</i>	>0,99		>0,99		
<i>ABCB1</i> (c.3435C>T)		CC (n=10)	CT+TT (n=28)	CC (n=8)	CT+TT (n=30)
	No	10 (100%)	25 (89,3%)	7 (87,5%)	28 (93,3%)
	Sí	0 (0,0%)	3 (10,7%)	1 (12,5%)	2 (6,7%)
<i>p</i>	0,55		0,52		
<i>ABCB1</i> (c.2677G>T/A)		GG (n=11)	GT+GA+TA+TT (n=27)	GG (n=14)	GT+GA+TA+TT (n=24)
	No	10 (90,9%)	25 (92,6%)	12 (85,7%)	23 (95,8%)
	Sí	1 (9,1%)	2 (7,4%)	2 (14,3%)	1 (4,2%)
<i>p</i>	>0,99		0,54		

En el grupo TAC y para el resto de polimorfismos estudiados en el grupo CSA, no se observa una relación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes y la recidiva por VHC ($p>0,05$), ni según genotipo de donante ni de receptor.

4.3.2.2. Efecto de la interacción de dos polimorfismos sobre las variables clínicas

A continuación se muestran las figuras obtenidas después de realizar la primera evaluación de los datos a través de los test de razón de verosimilitudes. Cada cuadrado se corresponde a cada valor p , representado en una gama de verdes oscuros (más significativos) a claros (ausencia de significación estadística). El triángulo superior contiene los valores p del análisis de la interacción entre los pares de SNPs. En la diagonal se representa el efecto de cada SNP por sí solo sobre las diferentes variables clínicas (se corresponde con los resultados obtenidos en el Test exacto de Fisher). (Nota: para el grupo CSA, no es posible realizar el análisis de interacción para la variable recidiva por VHC debido a tamaño muestral insuficiente en alguno de los subgrupos, por lo que no aparece la gráfica).

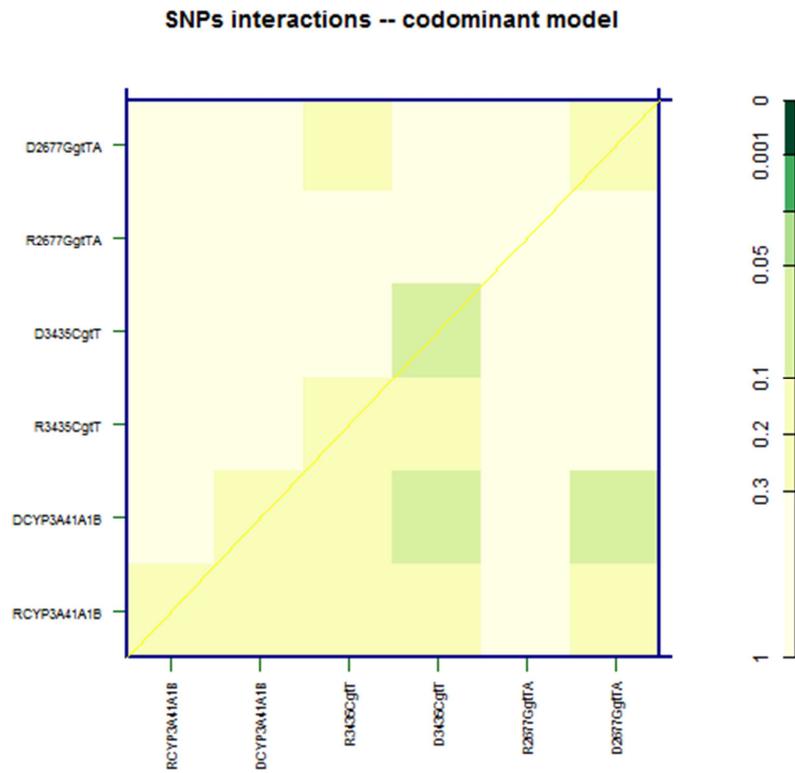
Después de identificar las posibles interacciones significativas para las variables clínicas mediante estas gráficas, se seleccionan las interacciones que han sido significativas. Sólo a éstas, se les realiza el estudio de interacción específico y sólo las interacciones cuyo estudio específico resulta estadísticamente significativo ($p < 0,05$) son representadas gráficamente para visualizar la tendencia de dicha interacción entre SNPs según genotipos.

Aunque a continuación se muestran las figuras de los test de las razones de verosimilitud, pudiendo identificar visualmente las interacciones significativas, los resultados y valores p expuestos son únicamente los obtenidos de los estudios definitivos (después de haber realizado los estudios específicos de interacción).

GRUPO CSA

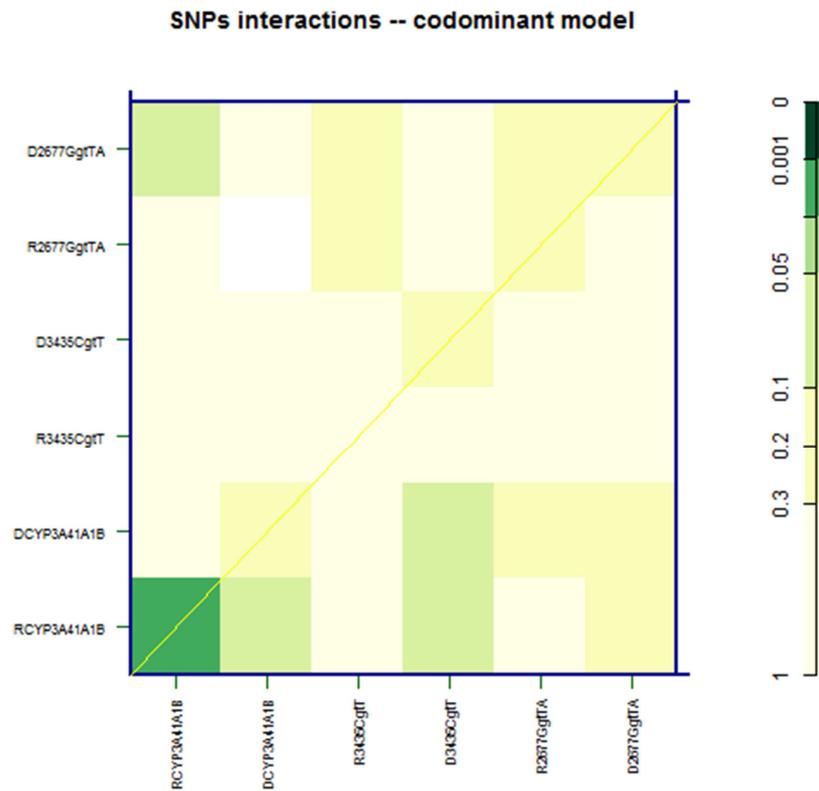
Figuras 20-25. Efecto de la interacción de los pares de SNPs *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T/A*, en receptores y donantes, sobre las variables clínicas en el grupo de pacientes tratados con ciclosporina.

Rechazo agudo en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable incidencia de rechazo agudo, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

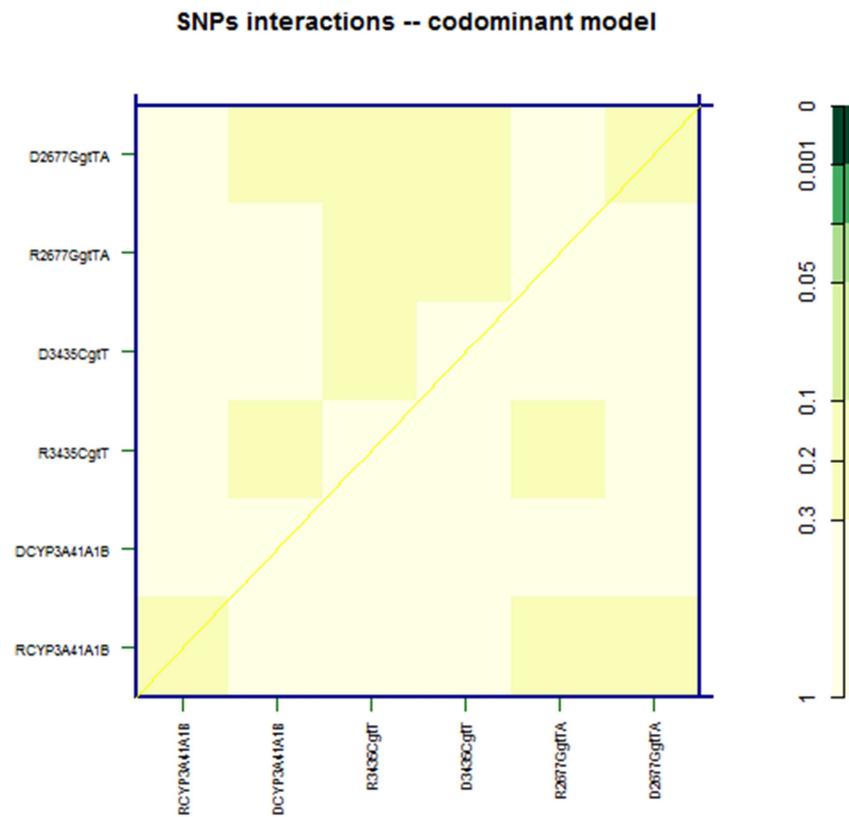
Neurotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable neurotoxicidad, no se observan diferencias con significación estadística para la combinación de genotipos.

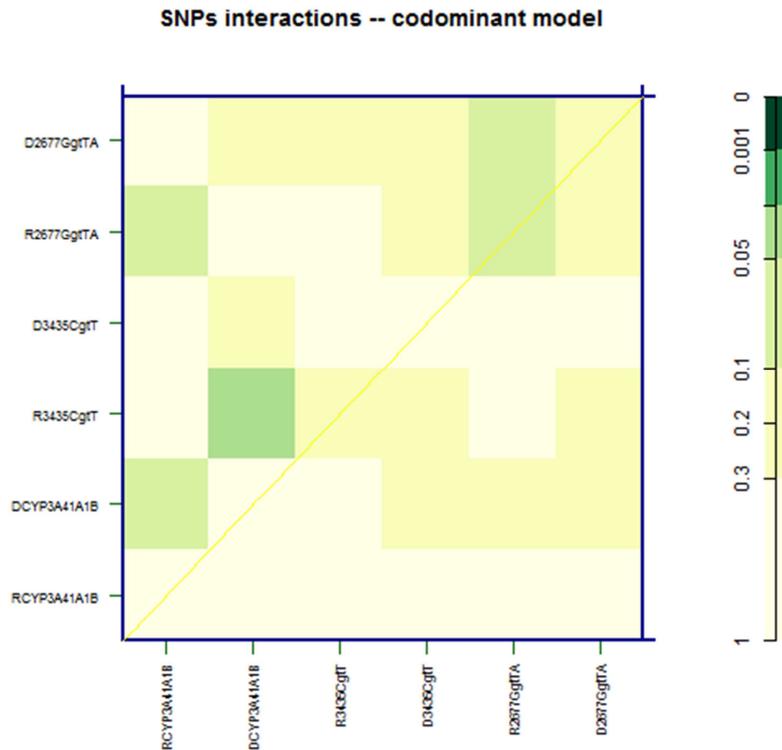
Se observan diferencias con significación estadística como efecto individual, en el SNP *CYP3A4*1B* ($p=0,05$) en el grupo de pacientes estudiado según el genotipo del receptor.

Nefrotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable nefrotoxicidad, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

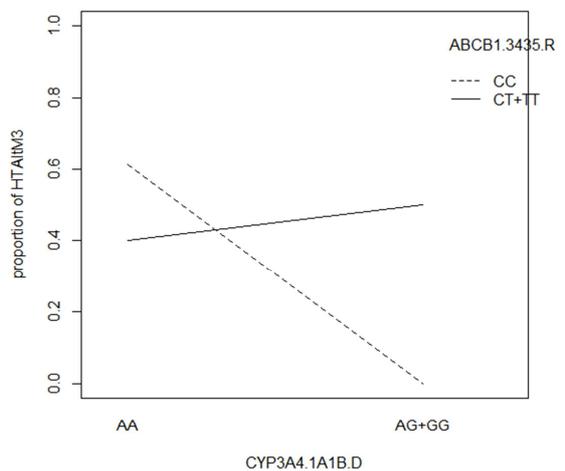
Hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante



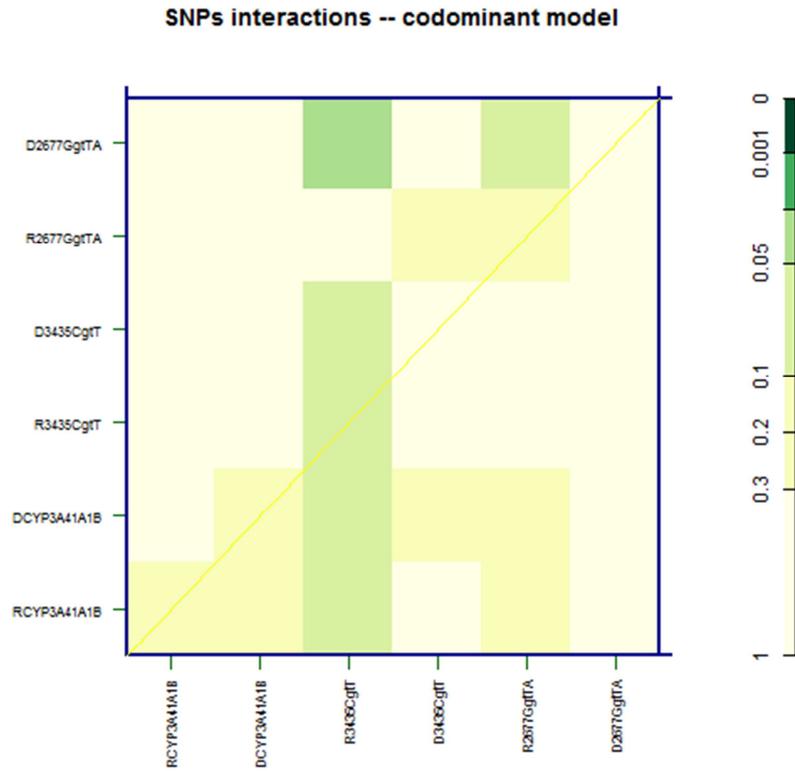
Para la variable hipertensión arterial, no se observan diferencias con significación estadística para ningún SNP como efecto individual.

Sin embargo, sí se observan diferencias con significación estadística para la siguiente combinación de SNPs: *CYP3A4*1B* en el donante y *ABCB1 3435* en el receptor ($p < 0,05$). Los pacientes que recibieron injertos de donantes portadores *CYP3A4*1B* (AG+GG) presentan menor incidencia de HTA *de novo* cuando además son receptores no portadores para *ABCB1 3435* (CC) (grafica 17).

Gráfica 17. Estudio específico de la interacción *CYP3A4*1B* en el donante y *ABCB1 3435* en el receptor para la HTA en el grupo de pacientes tratados con CSA.



Diabetes *mellitus de novo* en los 3 primeros meses post-trasplante



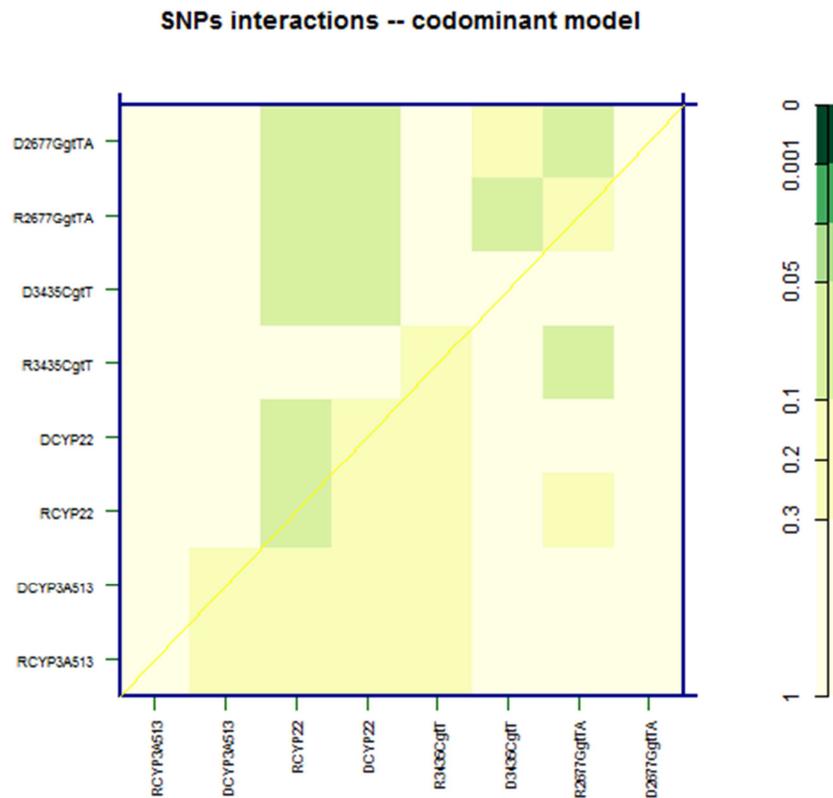
No se observan diferencias con significación estadística para ningún SNP como efecto individual.

Para la variable diabetes *mellitus de novo*, se observan diferencias con significación estadística para la siguiente combinación de SNPs: *ABCB1* 3435 en el receptor y *ABCB1* 2677 en el donante. Sin embargo, estos resultados son espurios ya que cuando se hacen los subgrupos no disponemos de pacientes suficientes para hacer inferencia estadística (no se muestran los datos).

GRUPO TAC

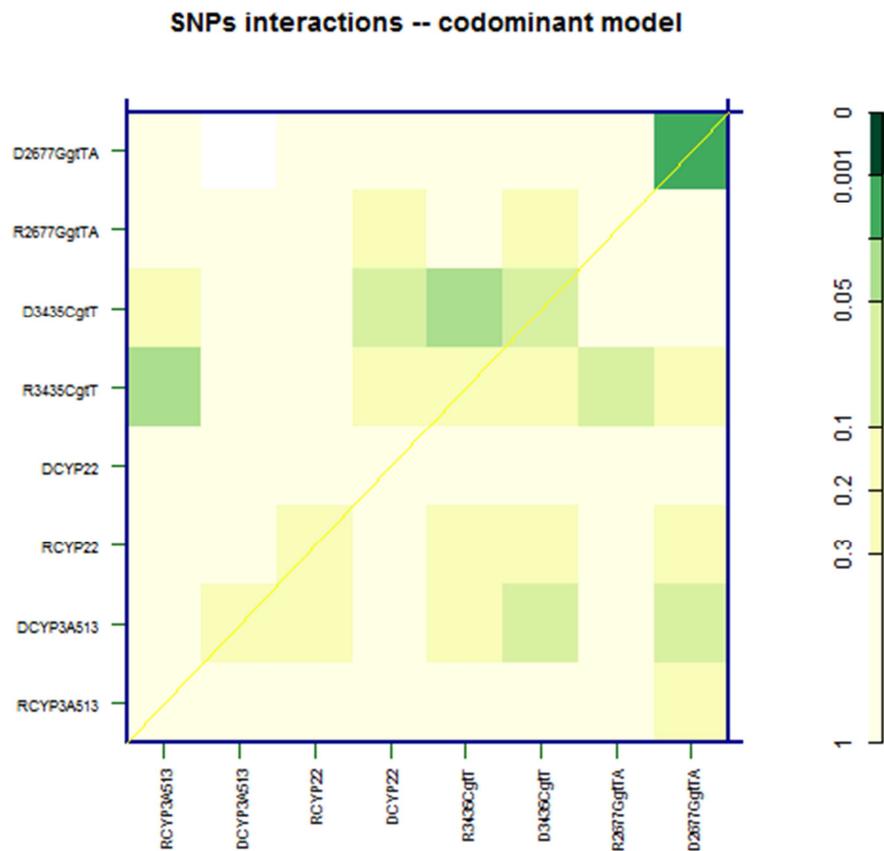
Figuras 26-31. Efecto de la interacción de los pares de SNPs *CYP3A5*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T/A*, en receptores y donantes, sobre las variables clínicas en el grupo de pacientes tratados con tacrolimus.

Rechazo agudo en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable incidencia de rechazo agudo, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

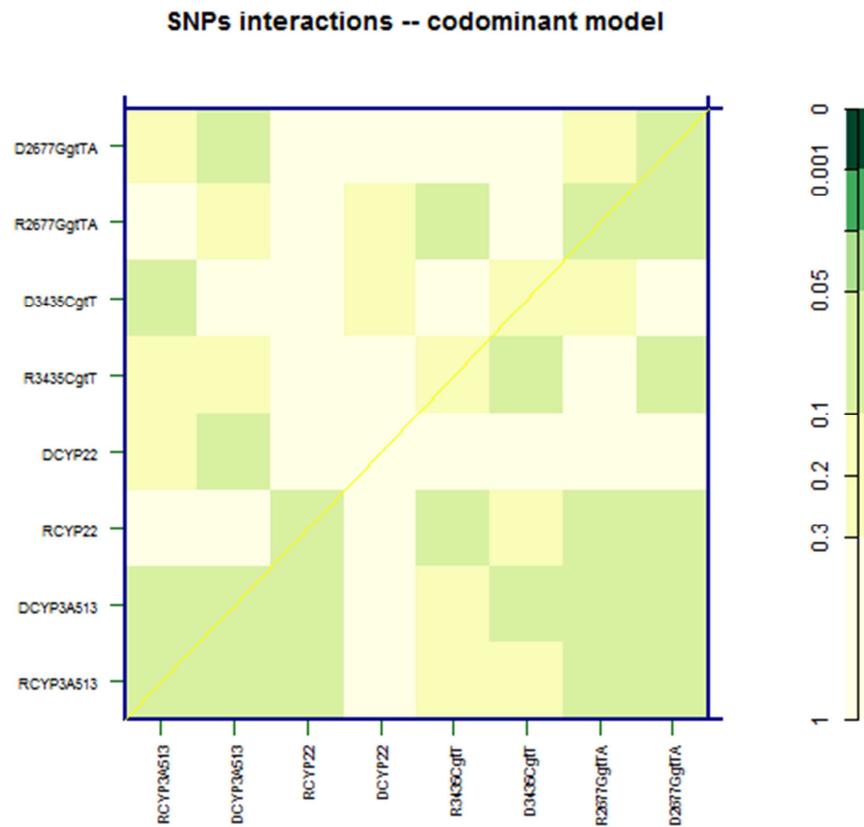
Neurotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable neurotoxicidad, se observan diferencias con significación estadística para la siguiente combinación de SNPs: *CYP3A5* + *ABCB1* 3435 en receptores y *ABCB1* 3435 en receptores + *ABCB1* 3435 en donantes. Sin embargo, estos resultados son espurios ya que cuando se hacen los subgrupos no disponemos de pacientes suficientes para hacer inferencia estadística (no se muestran los datos).

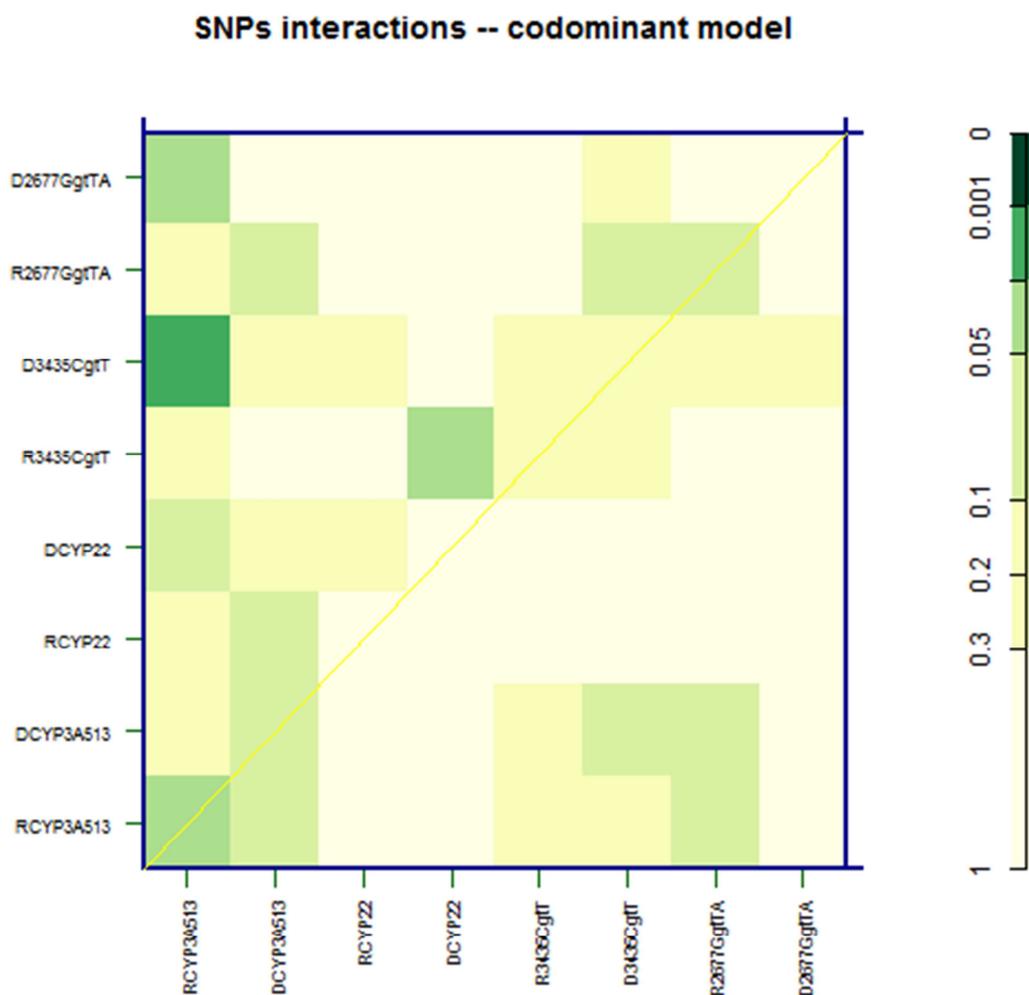
Se observan diferencias con significación estadística en los siguientes SNPs como efecto individual: *ABCB1* 2677 en donantes ($p=0,01$).

Nefrotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable nefrotoxicidad, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

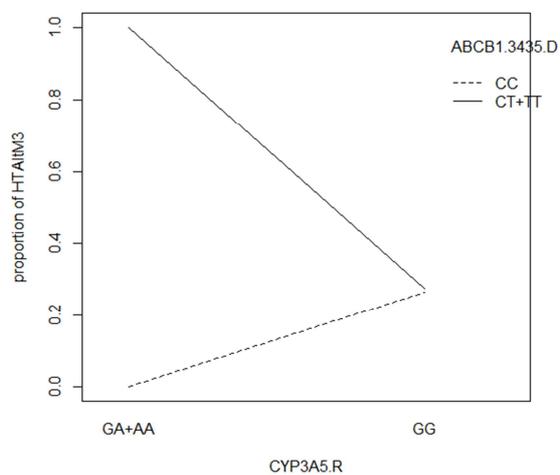
Hipertensión arterial en los 3 primeros meses post-trasplante



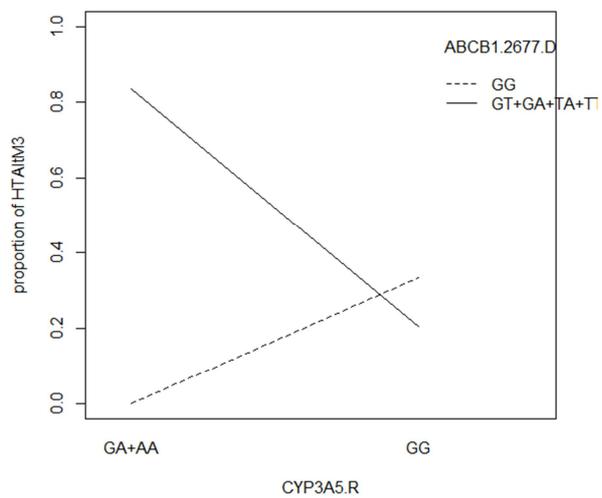
Para la variable hipertensión arterial, se observan diferencias con significación estadística para la siguiente combinación de SNPs: *CYP3A5* en receptores + *ABCB1* 3435 en donantes ($p < 0,05$); *CYP3A5* en receptores + *ABCB1* 2677 en donantes ($p < 0,05$); *CYP3A4*22* en donantes y *ABCB1* 3435 en receptores ($p < 0,05$). También se observan diferencias con significación estadística para el SNPs *CYP3A5* en receptores como efecto individual.

Los receptores portadores *CYP3A5* (genotipo GA+AA) presentan mayor incidencia de HTA *de novo* cuando además poseen injertos de donantes portadores para *ABCB1* 3435 (genotipo CT+TT) o para *ABCB1* 2677 (GT+GA+TA+TT) (gráfica 18 y 19, respectivamente).

Gráfica 18. Estudio específico de la interacción CYP3A5 en receptor y ABCB1 3435 en injerto de donante para la HTA de novo en el grupo de pacientes tratados con TAC.

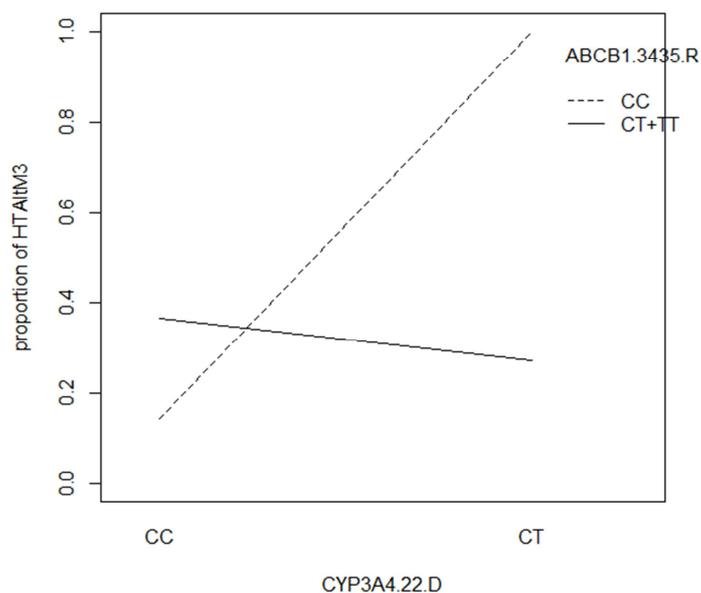


Gráfica 19. Estudio específico de la interacción CYP3A5 en receptor y ABCB1 2677 en injerto de donante para la HTA de novo en el grupo de pacientes tratados con TAC.

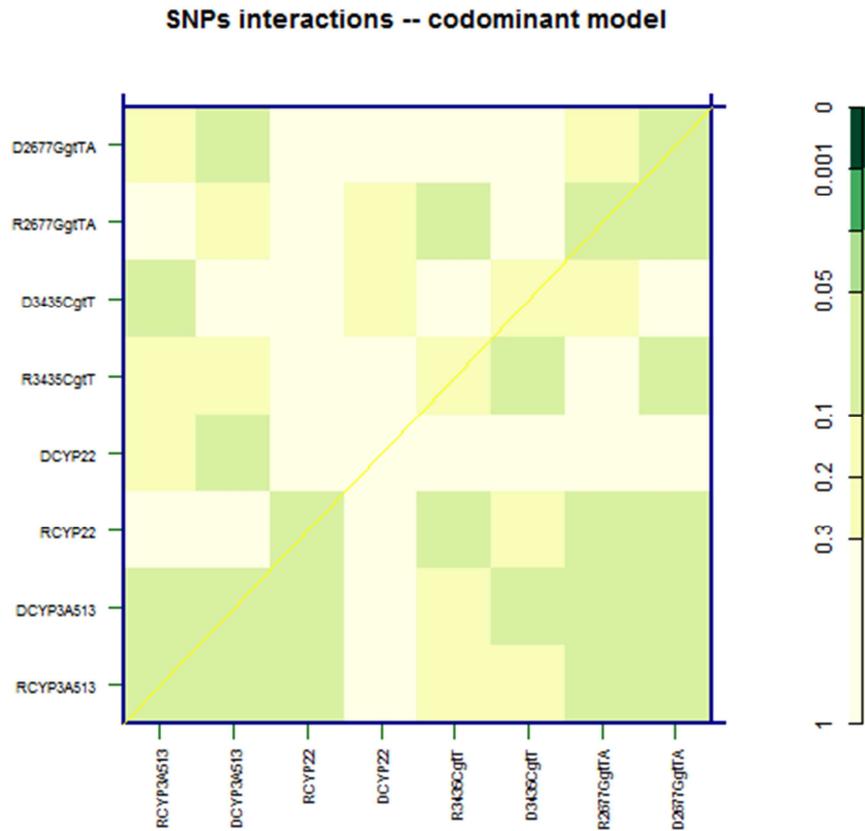


Los pacientes que poseen injertos de donantes portadores *CYP3A4*22* (genotipo CT) presentan mayor incidencia de HTA *de novo* cuando además son no portadores de *ABCB1 3435* (genotipo CC) (gráfica 20).

Gráfica 20. Estudio específico de la interacción *CYP3A4*22* y *ABCB1 3435* en injerto de donante para la HTA *de novo* en el grupo de pacientes tratados con TAC.

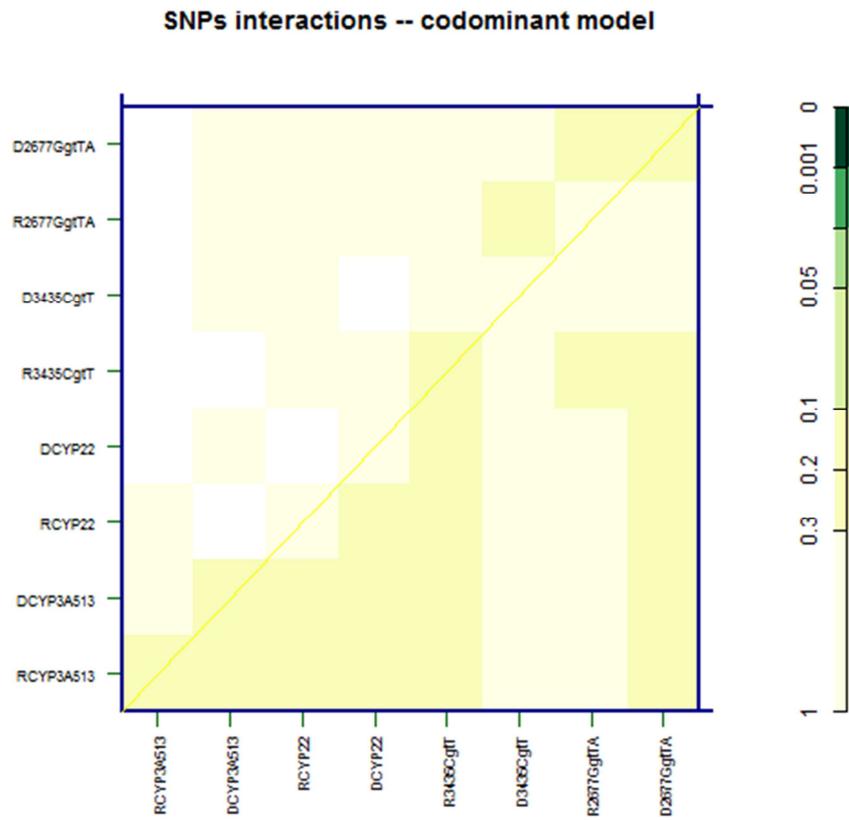


Diabetes mellitus de novo en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable diabetes *mellitus de novo*, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

Recidiva por VHC en los 3 primeros meses post-trasplante



Para la variable recidiva por VHC, no se observan diferencias con significación estadística ni para la combinación de genotipos ni para ningún SNP como efecto individual.

5. Discusión

5.1. Farmacogenética y Trasplante Hepático

Los inhibidores de calcineurina (ICN), ciclosporina y tacrolimus, son considerados la base de la terapia inmunosupresora en el trasplante hepático. Sin embargo, frecuentemente suelen estar asociados a la aparición de efectos adversos en el paciente trasplantado. Es amplio el conocimiento sobre su farmacocinética (absorción, distribución, metabolización y eliminación) y su farmacodinamia (modo de acción y efectos adversos), incluso han sido bien descritas las moléculas implicadas en estos procesos. En los últimos años también se han realizado numerosos estudios farmacogenéticos relacionados con estos fármacos, con el objetivo de identificar la mejor terapia para cada paciente. En ellos se evidencia una relación entre sus características farmacocinéticas y determinadas variantes en los genes que codifican para las enzimas metabolizadoras (como el citocromo P450) y proteínas transportadoras de membrana de estos fármacos (como la P-glicoproteína). Sin embargo, existe aún cierta discrepancia entre los resultados publicados hasta el momento.

Las dosis iniciales se basan generalmente en el peso del paciente o son dosis fijas predefinidas, y posteriormente se ajustan para conseguir el intervalo de concentración terapéutico preestablecido mediante la monitorización terapéutica (TDM). Sin embargo, esta estrategia no siempre asegura alcanzar rápidamente la concentración de fármaco dentro de un intervalo terapéutico eficaz y seguro.

Alcanzar una concentración en sangre correcta del ICN en el post-trasplante inmediato se convierte en el pilar básico de la inmunosupresión. En consecuencia, sería muy ventajoso poder disponer de información antes del trasplante que orientara sobre su previsible farmacocinética, así como también saber cuál de los dos posibles ICN podría ser el más adecuado para cada paciente (debido a sus posibles efectos adversos). Controlar este primer momento después del trasplante, parece ser de especial relevancia, ya que hay estudios en los que se evidencia que los eventos acontecidos durante los primeros días o semanas después del trasplante, marcan los eventos que ocurrirán durante los siguientes años (en cuanto a función renal, función hepática, función biliar, etc.) (170).

El estudio farmacogenético de la presente tesis pretende aportar la identificación de variantes de los genes *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1* que podrían utilizarse como

predictivas de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los ICN en el paciente trasplantado hepático.

5.2. Justificación del estudio

Tanto ciclosporina como tacrolimus son fármacos imprescindibles para la prevención del rechazo del trasplante hepático. Sin embargo, todavía está pendiente de explicar una gran parte de la variabilidad farmacocinética y farmacodinámica de estos fármacos. La inconsistencia general de los estudios realizados puede estar relacionada con la variabilidad étnica, con el pequeño número de pacientes incluidos en los estudios, con la inespecificidad de los sistemas de medida empleados para la determinación de la concentración de estos fármacos en sangre, con la variación en el punto del tiempo en el que se obtienen los resultados, y con el impacto del genotipo del donante (137). Por ello, en el presente trabajo se ha intentado minimizar las posibles variaciones debidas al diseño del estudio con el fin de ayudar a resolver parte de esta variabilidad y obtener resultados consistentes: incluyendo únicamente pacientes de la misma etnia y con un único inmunosupresor en monoterapia durante los tres primeros meses post-trasplante, realizando todas las medidas de la concentración de los fármacos inmunosupresores en sangre con el mismo sistema de medida, considerando el parámetro “ratio concentración dosis” (C/D) en el estudio, empleando modelos estadísticos que tienen en cuenta la dependencia de los datos de un mismo individuo en el tiempo e incluyendo el genotipo tanto del receptor como del donante.

Además la gran mayoría de los estudios descritos en la literatura hasta el momento se han centrado en un solo SNP por estudio. En el presente trabajo se ha pretendido investigar el papel potencial de los genotipos, tanto a nivel individual como en combinaciones de distintas variantes genéticas (haplotipos). Es posible que combinaciones de SNPs tengan efectos sinérgicos sobre la farmacocinética o farmacodinamia de tacrolimus y ciclosporina.

También se ha querido evaluar la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos, estudiando la influencia de dichas variantes genéticas sobre la eficacia clínica (incidencia de rechazo agudo) y/o sobre la seguridad (incidencia de aparición de los efectos adversos) en el paciente trasplantado hepático. El genotipar a los pacientes antes del tratamiento con estos fármacos inmunosupresores podría ayudar a prevenir

los efectos secundarios de éstos. Sin embargo, actualmente no hay genes (o variaciones dentro de estos genes) que muestren asociaciones consistentes con parámetros farmacodinámicos.

La farmacogenética de ciclosporina y tacrolimus es compleja, y como ya se ha comentado, hay un gran número de factores que probablemente contribuyen en su variabilidad farmacocinética y farmacodinámica. Mejorar la comprensión en esta área tendría un impacto significativo en la salud y el bienestar de los pacientes tratados con estos fármacos. Además, encontrar el equilibrio entre un efecto inmunosupresor óptimo con un mínimo riesgo de aparición de efectos secundarios, mediante la elección del fármaco más adecuado y de una dosis ajustada de éste, supondría una máxima efectividad del tratamiento, lo que se traduciría en una reducción de costes derivados no sólo de la disminución de la dosis administrada, sino también de la reducción de la aparición de los posibles efectos adversos y su tratamiento consecuente.

Realizar una inmunosupresión personalizada en función de las características farmacogenéticas del paciente, permitiría hacer una selección del tratamiento inmunosupresor más adecuado en función del perfil del paciente en el momento del trasplante (presencia de hipertensión arterial, diabetes *mellitus*, insuficiencia renal, etc.).

5.3. Discusión de los resultados obtenidos

En primer lugar se discutirán los resultados obtenidos para la prevalencia de las variantes seleccionadas en la población estudiada.

Posteriormente se discutirán el resto de los resultados obtenidos para el grupo de pacientes tratados con ciclosporina, y después para el grupo de pacientes tratados con tacrolimus. Dentro de cada grupo, se discutirán los resultados obtenidos comparándolos con los hallazgos descritos en la bibliografía.

Para facilitar la comprensión e interpretación de los comentarios de la discusión, en la tabla 33 se muestra un resumen general a modo de guía sobre el impacto esperado de las variantes de los SNPs estudiados en la PK de los ICN (137). Las flechas indican el aumento/disminución de la actividad enzimática debido al aumento/disminución de la expresión del correspondiente gen.

Tabla 33. Esquema sobre el impacto esperado de las variantes de los SNPs estudiados en la PK de los ICN.

Variante	Genotipo asociado	Efecto Proteína	Efecto esperado sobre la PK
<i>CYP3A4*1B</i>	<i>*1/*1B</i> <i>*1B/*1B</i>	↑ <i>CYP3A4</i>	↓ C/D
<i>CYP3A4*22</i>	<i>*1/*22</i>	↓ <i>CYP3A4</i>	↑ C/D
<i>CYP3A5*3</i>	<i>*1/*3</i> <i>*1/*1</i>	↑ <i>CYP3A5</i>	↓ C/D
<i>ABCB1</i> <i>3435C>T</i>	CT+TT	↓ P-glicoproteína	↑ C/D
<i>ABCB1</i> <i>2677G>T/A</i>	GT+GA+TT +AA+TA	Desconocido	?

PK: Farmacocinética; C/D: Concentración relativa a la dosis

5.3.1. Prevalencia de las variantes seleccionadas

Las distribuciones de frecuencias genotípicas para todos los polimorfismos estudiados se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, tanto para el grupo de pacientes tratados con ciclosporina como para el grupo de pacientes tratados con tacrolimus. Las frecuencias obtenidas coinciden con las esperadas en población de raza blanca. La baja frecuencia observada para los alelos *CYP3A4*1B* (alelo G) y *CYP3A5*1* (alelo A), confirma la descrita previamente en la literatura (138), con tan solo 2 y 1 individuos portadores de dichos alelos en homocigosis en los grupos CSA y TAC, respectivamente. Lo mismo puede decirse de la variante *CYP3A4*22* (alelo T) para la que no se han encontrado portadores en homocigosis en la población estudiada para ninguno de los dos grupos (138).

Nota: en cuanto al SNP *CYP3A4*1B* del grupo CSA, se observa un valor p de 0,07 para el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg. Aunque este valor p presenta una tendencia a la significación aparentemente por un exceso de homocigotos **1*, el verdadero motivo es que hay más individuos **1B/*1B* de los esperados. Sin embargo, como después se agrupan los genotipos **1/*1B* y **1B/*1B* para el estudio estadístico, esta situación deja de tener trascendencia.

5.3.2. Influencia de los genes estudiados sobre la farmacocinética y farmacodinamia de Ciclosporina.

A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados obtenidos sobre la farmacogenética de ciclosporina: la relación entre las diferentes variantes genéticas estudiadas y las variables relacionadas con su farmacocinética y farmacodinamia. Los resultados obtenidos se discuten para cada polimorfismo en particular en los siguientes apartados.

Tabla 34. Resumen de los resultados farmacogenéticos de Ciclosporina.

Variante	Genotipo asociado	PK1	PK2	PD1	PD2
CYP3A4*1B	*1/*1B *1B/*1B	NS (D: ↓C ₂ /D d7)	NS	↑ Neurotoxicidad en R	↓HTA: en D + 3435 CC en R
CYP3A4*22	*1/*22	-	-	↓ HTA en R ¹	NS
ABCB1 3435C>T	CT+TT	NS (R: ↓C ₂ /D d14)	NS	↑ Rechazo Agudo en D ¹ ↓ VHC en R ↑ VHC en D ¹	NS
ABCB1 2677G>T/A	GT+GA+TT +AA+TA	NS	↓C ₂ : en D + 3435 CC en D ↓C ₂ /D: en D + 3435 CC en D	↓ HTA en R ¹ ↑ VHC en D	NS

¹ tendencia a la significación;

PK1: Farmacocinética (estudio de variantes individuales); PK2: Farmacocinética (estudio de la combinación de 2 SNPs). Las variables PK son: Dosis (D), Concentración a las 2 horas de la administración del fármaco (C₂) y Concentración relativa a la dosis a las 2 horas de la administración del fármaco (C₂/D).

PD1: Farmacodinámica (PD) (estudio de variantes individuales); PD2: Farmacodinámica (estudio de la combinación de 2 SNPs). Las variables PD son: Rechazo agudo, Nefrotoxicidad, Neurotoxicidad, Hipertensión arterial (HTA), Diabetes mellitus de novo (DM), Recidiva VHC (VHC). La no mención de estas variables en el cuadro indica que son no significativas (NS).

D: donante; R: receptor; D: dosis; d: día; -: no hay datos.

5.3.2.1. Gen CYP3A4: rs2740574 (CYP3A4*1B) y rs35599367 (CYP3A4*22)

rs2740574 (CYP3A4*1B)

En general, el impacto de las variantes de CYP3A4 en la farmacocinética de ciclosporina se define en la literatura como controvertido (138,139). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que no existe asociación significativa entre el alelo *1B, de forma individual o combinada con los otros polimorfismos estudiados, y la farmacocinética de ciclosporina. Estos hallazgos coinciden con lo descrito en varios

estudios (139-142), aunque también se ha encontrado algún trabajo donde se ha relacionado este alelo con un aumento del aclaramiento del fármaco y un aumento de las necesidades de dosis (96).

Teniendo en cuenta que CYP3A4 es la enzima predominante en la metabolización de ciclosporina, y que la variante *1B se asocia a un aumento de la cantidad de enzima activa (como consecuencia de una actividad transcripcional aumentada del gen) (73) lo que se esperaría es una disminución de la C_2/D . Sin embargo, los resultados obtenidos no se corresponden con la hipótesis de que la variante *1B del gen CYP3A4 puede influir en la C_2/D de ciclosporina.

Cuando se revisan nuestros datos en detalle, se observa que aunque los pacientes que recibieron un injerto procedente de un donante portador del alelo *1B, presentaron C_2/D más bajas hasta el día 7 (donde se hacen estadísticamente significativas), después las C_2/D tienden a igualarse entre portadores y no portadores a partir del día 14. Además, cuando se aplica el modelo lineal mixto sobre los datos (modelo que presenta una mayor potencia estadística ya que tiene en cuenta la dependencia de los datos en el tiempo) dicha significación se pierde, pudiendo considerarse un dato aislado.

Es posible que los factores no genéticos jueguen un papel más importante que los genéticos en la determinación de la respuesta farmacocinética del paciente a ciclosporina. Un estudio de epidemiología genética ha estimado la heredabilidad de la actividad del CYP3A4 en un 66%, lo que sugiere que los factores genéticos deberían representar un papel importante sobre la respuesta farmacocinética; sin embargo, factores ambientales como el tabaquismo y el índice de masa corporal también pueden influir significativamente en la actividad enzimática (171). En el presente trabajo no se puede contrastar esta información porque dichos datos no fueron recopilados.

En cuanto a la farmacodinamia de ciclosporina, se observa una relación entre la variante *1B en el receptor y una mayor frecuencia de aparición de síntomas de neurotoxicidad en los 3 primeros meses tras el trasplante. En general, un 15-30% de los pacientes trasplantados de hígado presentan convulsiones, encefalopatía, cefaleas y alteraciones de la consciencia (172), con imágenes de resonancia magnética (RNM) típicas, que muestran la lesión de la sustancia blanca (173). Aunque los resultados obtenidos podrían ayudar a explicar la aparición de estos síntomas, es difícil contrastarlo con la literatura, ya que el efecto de este alelo sobre los parámetros farmacodinámicos se ha analizado en muy pocos estudios, y no se ha encontrado

ninguna relación en este aspecto (28,139). Además es complejo postular una hipótesis para encontrar justificación a la aparición de estos síntomas, cuando la relación que muestra la variable *1B con la PK de ciclosporina no es significativa. CYP3A4 ha sido identificada en cerebro (174), y una posible hipótesis sería que tal vez el aumento de su actividad enzimática asociada a este alelo en el receptor esté produciendo un acúmulo de metabolitos de ciclosporina a nivel del tejido nervioso, siendo éstos los que estén generando la toxicidad.

En cuanto a la influencia de combinaciones de genotipos, sólo hay un estudio en el que se ha analizado la influencia del haplotipo *CYP3A4*1B* con el rs1045642 (c.3435C>T) de *ABCB1* sobre la farmacodinamia de ciclosporina, y no se vieron resultados significativos (141). En el presente trabajo, sin embargo, se ha encontrado que los pacientes que han recibido un injerto de un donante con la variante *1B para *CYP3A4* y que además son no portadores de la variante c.3435C>T (genotipo CC), presentan una menor incidencia de HTA de novo. El interés de estos resultados radica en que son coherentes con la teoría de que la suma de una mayor actividad enzimática de CYP3A4 junto con una función no reducida de la P-glicoproteína podría relacionarse con una mayor eliminación del fármaco y por lo tanto con un menor riesgo de aparición de HTA de novo reduciendo la vasoconstricción de la arteriola aferente, la consecuente retención de sodio, el aumento del volumen intravascular y la supresión de renina. La discrepancia con los datos publicados puede ser debida a que el estudio mencionado (141) sólo consideró el genotipo del receptor. Puesto que la actividad principal de CYP3A4 se da en el hígado, el aumento de actividad debido a la variante *1B sería más notable si se considera su presencia en el donante. Conocer de antemano que en un determinado trasplante se da esta combinación de genotipos entre donante y receptor serviría de ayuda para valorar el riesgo de una determinada elección del fármaco inmunosupresor. Hay que tener en cuenta, además, que la incidencia de HTA como efecto secundario es mayor en pacientes tratados con ciclosporina que con tacrolimus (43,175).

rs35599367 (CYP3A4*22)

Aunque se ha descrito en la literatura que para el rs35599367 (*CYP3A4*22*) se ha observado la existencia de asociación con la farmacocinética de ciclosporina (145), dichos hallazgos no se han podido evaluar en el presente trabajo debido al tamaño muestral insuficiente que presentaban algunos de los subgrupos.

En cuanto al estudio de la influencia de esta variante en la farmacodinamia de ciclosporina, los resultados obtenidos indican que los pacientes portadores de *CYP3A4**22 presentan una menor incidencia de HTA de novo en los 3 primeros meses post-trasplante (tendencia a la significación). Podría ser que una menor actividad de la enzima *CYP3A4* originara menor cantidad de metabolitos de ciclosporina reduciendo los factores que desencadenan la aparición de HTA en el paciente TH. No se han encontrado trabajos que permitan contrastar estos resultados. Hay un estudio reciente sobre el efecto de esta variante en pacientes con trasplante renal en el que se encontró que el alelo *22 estaba asociado con un mayor riesgo de peor función del injerto en comparación con los homocigotos *1 (146). Los resultados de ese estudio, a diferencia de los nuestros, sí concuerdan con el hallazgo de que los portadores *22 reducen los niveles de ARNm de *CYP3A4* y de su actividad enzimática (134).

Con respecto a las influencias de esta variante en combinación con otras, no se han observado resultados significativos.

5.3.2.2. Gen *ABCB1* (rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A))

En general, el impacto de las variantes de *ABCB1* en la farmacocinética de ciclosporina también es controvertido según lo descrito en la literatura (138,139). Los resultados obtenidos sobre la influencia de los SNPs rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A) de *ABCB1* en el presente trabajo, indican que no existe asociación significativa entre ser portador de los alelos T y A/T, respectivamente, cuando son estudiados de forma individual, y los parámetros farmacocinéticos de ciclosporina. Estos hallazgos coinciden con lo descrito en la mayoría de los estudios (42,138). Dado el gran número de resultados negativos, es probable que estos SNPs de *ABCB1* expliquen sólo una pequeña cantidad de la variación.

En cuanto al rs1045642 (c.3435C>T), teniendo en cuenta que la P-glicoproteína participa activamente en la depuración sanguínea de ciclosporina y que la variante T se asocia a la presencia de una menor cantidad de P-glicoproteína (como consecuencia de una menor expresión del gen) o de una P-glicoproteína menos funcional (73), se esperaría un aumento de la C_2/D . Sin embargo, los resultados obtenidos no lo confirman. Cuando se revisan nuestros datos en detalle, se observa que los pacientes portadores del alelo 3435T presentan C_2/D con una tendencia a ser

más bajas desde el día 7 hasta el día 90 (siendo sólo estadísticamente significativas en el día 14). Estos resultados no coinciden con lo esperado y en estos momentos no es posible encontrar una explicación para ello, ya que probablemente estén interviniendo otros factores. Además, cuando se aplica el modelo lineal mixto sobre los datos (modelo que presenta una mayor potencia estadística porque incluye la dependencia de los datos en el modelo) dicha significación se pierde.

En los trabajos de Crettol *et al.* y Capron *et al.* (177,178) se expone que podría existir una fuerte asociación, pero sólo cuando se consideran las concentraciones intracelulares de ciclosporina y no las de sangre. Los portadores del alelo 3435T tuvieron mayores concentraciones basales de ciclosporina intracelulares, en comparación con los no portadores. Para el rs2032582 (c.2677G>T/A) no se observaron resultados significativos.

En cuanto a las combinaciones de genotipos, los resultados del presente trabajo indican que existe una influencia combinada de rs2032582 (c.2677G>T/A) y rs1045642 (c.3435C>T) de *ABCB1*. Cuando el injerto procede de un donante con la combinación portador de los alelos 2677A/T y no portador de 3435T (genotipo CC), los pacientes presentan C_2 y C_2/D de ciclosporina significativamente más bajas.

Esto es lo que cabría esperar con respecto a c.3435C>T (los homocigotos CC deberían estar relacionados con una disminución de C_2 y C_2/D); con respecto a c.2677G>T/A, aunque todavía no se ha publicado información sobre su efecto en la expresión de P-glicoproteína, el hecho de que la presencia de 2677T/A potencie la acción de 3435CC, hasta convertir la disminución de C_2 y C_2/D en significativa, indica que los alelos 3435C y 2677T/A presentan un efecto en el mismo sentido. O lo que es equivalente: que las variantes minoritarias 3435T y 2677T/A presentan un efecto opuesto. Por lo tanto, estos resultados apoyarían la hipótesis de que el efecto del rs2032582 (c.2677G>T/A) de *ABCB1* sobre la P-glicoproteína (todavía desconocido (137)) produciría un aumento de la depuración de los ICN en sangre, lo que podría relacionarse con un aumento de la actividad de la P-glicoproteína. Además se pone de manifiesto la importancia del genotipo del donante para esta proteína transportadora en el paciente trasplantado de hígado. No se han encontrado publicados estudios previos que corroboren estos resultados.

Los estudios que han analizado la relación entre los alelos de *ABCB1* y la farmacodinamia de ciclosporina han mostrado resultados tanto a favor como en contra

de que exista. Los resultados obtenidos en el presente trabajo relacionan la presencia del alelo 3435T en el donante con un aumento de la incidencia de rechazo agudo (tendencia a la significación) y un aumento de la incidencia de recidiva por VHC (tendencia a la significación). Sorprendentemente, la presencia de este alelo en el receptor presenta el efecto inverso, asociándose con una disminución en la incidencia de la reinfección por VHC.

El aumento de la incidencia de recidiva por VHC puede estar asociado al aumento de las dosis de corticoides administradas, debido al aumento de la incidencia de rechazo agudo en este grupo de pacientes. Aunque se habría esperado que hubiera ocurrido menos rechazo en este grupo de pacientes, en estos momentos no somos capaces de justificar estos resultados si se asume que el rechazo sólo depende de la concentración de ciclosporina. En este caso, hay que tener en cuenta que pueden haberse dado otros factores que no hayan sido considerados y que pudieran haber influido en la incidencia de rechazo.

Tal vez, el efecto real sea que este alelo esté realmente asociado a una disminución de la incidencia del VHC aunque no hayamos podido encontrar ningún estudio con resultados similares en la literatura para poder contrastarlos con los nuestros.

En cuanto al rs2032582 (c.2677G>T/A), los resultados indican que los pacientes que recibieron un injerto procedente de donante portador de los alelos A/T presentan un aumento de la incidencia de recidiva por VHC y una disminución de la incidencia de HTA de novo (esta última, con una tendencia a la significación).

Los resultados observados para la incidencia de HTA, coincidirían con la hipótesis de que una función aumentada de la P-glicoproteína podría relacionarse con una mayor eliminación del fármaco y por lo tanto con un menor riesgo de aparición de HTA *de novo*. En cuanto a los resultados observados para la incidencia de recidiva por VHC, no disponemos de ninguna hipótesis para poder justificar estos resultados, ni de estudios descritos en la literatura para poder contrastarlos con los nuestros.

Con respecto a la influencia de combinaciones de genotipos, no se han descrito en la literatura resultados significativos para TH. Sin embargo, para trasplante renal sí que se encuentran algunos estudios (149,179,180). En uno de ellos, con una población relativamente grande que incluyó 237 pacientes con trasplante renal, se encontró que

el genotipo TT de c.2677G>T/A estaba asociado con un riesgo tres veces mayor de padecer rechazo agudo confirmado por biopsia en comparación con los otros genotipos (179). Se vio que este SNP se encontraba en un alto desequilibrio de ligamiento con el rs1045642 (*ABCB1* c.3435C>T) y el rs1128503 (*ABCB1* c.1236C>T), y estos dos SNPs también mostraron estar asociados con el rechazo agudo, pero sólo antes del ajuste para el SNP rs2032582 (*ABCB1* c.2677G>T/A) (179). Por el contrario, en un estudio con 832 pacientes trasplantados renales tratados con tacrolimus o ciclosporina se encontró que el haplotipo T-T-T estaba asociado con un menor riesgo de rechazo agudo, excepto en el caso en el que se comparó contra el haplotipo T-G-C (para los SNPs c.3435 C>T, c.2677G>T/A y c.1236C>T, respectivamente) (149). En otro estudio diferente con 68 receptores de trasplante renal también se encontró una asociación entre el genotipo TT de c.2677G>T/A y un mayor riesgo de nefrotoxicidad (180). En otros estudios de población menor no se encontró ninguna asociación entre las variantes de *ABCB1* y el seguimiento clínico (que se resumen en *Staatz et al.* (144)).

En el trasplante renal, el genotipo de estos SNPs en el donante podría ser de gran relevancia, ya que la P-glicoproteína presenta una elevada expresión en las células epiteliales del túbulo proximal renal, por lo que la actividad en el riñón del donante podría afectar el desarrollo de los efectos adversos relacionados con los efectos secundarios de ciclosporina (150,151,181). Si esto es así, en otros tipos de trasplante, como el hepático, debería ponerse de manifiesto una relación entre estos genotipos en el receptor y la presencia de nefrotoxicidad. Sin embargo, dicha hipótesis no ha podido ser evidenciada en nuestros resultados para el fármaco ciclosporina.

Resumen de la discusión para Ciclosporina

En general, se observa una falta de correlación entre los resultados PK y los resultados PD. En principio, no se observan diferencias significativas para las variables PK, excepto para la combinación de genotipos de *ABCB1* en donantes, aunque no llega a traducirse en ningún efecto clínico. Sin embargo, sí se observan resultados significativos para las variables PD cuando se estudian los SNPs de forma individual, destacando los efectos adversos encontrados en nuestra población en estudio. Aunque algunos de ellos no sean consistentes con lo descrito en la literatura, en la mayoría de los estudios encontrados no se tuvo en cuenta el genotipo del donante en trasplante hepático. El genotipo del donante parece ser crítico en los estudios

farmacogenéticos. La falta de más resultados significativos para la PD cuando los SNPs se estudian en conjunto, posiblemente sea debida a la necesidad de un tamaño muestral mayor. Según algunos estudios, podría haber una correlación mayor de PK y PD de ciclosporina si se midieran las concentraciones intracelulares del fármaco (al menos para *ABCB1*).

Es importante mencionar que la trascendencia de estos resultados queda en desuso, ya que la principal ventaja que ofrecía el fármaco ciclosporina como tratamiento IS frente a los pacientes VHC se ha perdido, debido a los nuevos fármacos que han surgido para el tratamiento de esta enfermedad.

5.3.3. Influencia de las variantes estudiadas sobre la farmacocinética y farmacodinamia de Tacrolimus.

A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados obtenidos sobre la farmacogenética de tacrolimus: la relación entre las diferentes variantes genéticas estudiadas y las variables relacionadas con la farmacocinética y farmacodinamia. Los resultados obtenidos se discuten para cada polimorfismo en particular en los siguientes apartados.

Tabla 35. Resumen de los resultados farmacogenéticos de Tacrolimus.

Variante	Genotipo asociado	PK1	PK2	PD1	PD2
<i>CYP3A5</i> *3	*1/*3 *1/*1	D: ↓C y ↓C/D (d30,90)	↑D: en R + 3435 CC R ↑C/D: en R + *22 R ¹	↑ Nefrotoxicidad en R ¹ ↑ HTA en D ¹ y R ¹	↑ HTA: en R + 3435 T D ↑ HTA: en R + 2677 T/A D
<i>CYP3A4</i> *22	*1/*22	R: ↑C ¹	↑C/D: en R + 3435 CC R ↑C/D: en R + 2677 GG R	NS	↑ HTA: en D + 3435 CC R
<i>ABCB1</i> 3435C>T	CT+TT	D: ↓D y ↑C/D	↑D: en R + 2677 GG R ¹	↑ DM en D ¹	NS
<i>ABCB1</i> 2677G>T/A	GT+GA+TT +AA+TA	D: ↓D ² y ↓C	↓D: en D + *22 R ¹ ↑C/D: en D + *22 R ¹	↓ Neurotoxicidad en D ↑ HTA en R ¹	NS

¹ tendencia a la significación; ² no se mantiene la significación estadística después de incluir las variables confusoras en el modelo multivariante;

PK1: Farmacocinética (estudio de variantes individuales); PK2: Farmacocinética (estudio de la combinación de 2 SNPs). Las variables PK son: Dosis (D), Concentración basal del fármaco (C) y Concentración basal relativizada a la dosis (C/D)).

PD1: Farmacodinámica (PD) (estudio de variantes individuales); PD2: Farmacodinámica (estudio de la combinación de 2 SNPs). Las variables PD son: Rechazo agudo, Nefrotoxicidad, Neurotoxicidad, Hipertensión arterial (HTA), Diabetes mellitus de novo (DM), Recidiva VHC (VHC). La no mención de estas variables en el cuadro indica que son no significativas (NS).

D: donante; R: receptor; D: dosis; d: día; -: no hay datos.

5.3.3.1. Gen CYP3A5: rs776746 (CYP3A5*3)

Aunque el SNP CYP3A5*3 ha mostrado tener una fuerte asociación con la farmacocinética de tacrolimus (152,155,156), existen muy pocas evidencias consistentes descritas en la literatura de que afecte a su farmacodinamia. La asociación entre el genotipo de CYP3A5 y el metabolismo de tacrolimus se replica una vez más con el presente trabajo, del mismo modo que una gran variedad de distintos estudios (recopilados en Swen *et al.* (157)). En concreto, los pacientes con injertos procedentes de donantes portadores de la variante *1 muestran C_0 y C_0/D más bajas que los no portadores. Estas diferencias se hacen estadísticamente significativas a partir del día 30 post-trasplante y se confirman con la aplicación del modelo lineal mixto (en el que se tiene en cuenta la dependencia de los datos en el tiempo). Estos resultados son consistentes con la teoría de que el alelo *3 está asociado a una menor actividad enzimática de CYP3A5 que lleva a una menor necesidad de dosis (debido a C_0 y C_0/D más altas).

Existen numerosos estudios en los que se ha examinado el efecto del genotipo del donante y del receptor sin tener en cuenta su influencia combinada. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en un estudio con 50 receptores de hígado en los que se observó que, cuando los donantes eran portadores del alelo *1 de CYP3A5, tenían ratios C_0/D significativamente menores en la semana 2 y en el mes 1 post-trasplante, en comparación con los no portadores (homocigotos *3) (186). Otros dos estudios de 60 (182) y 70 (183) pacientes trasplantados de hígado, encontraron que el genotipo de CYP3A5 del donante afectaba significativamente la ratio C_0/D en las semanas 1, 2 y 3 para un estudio (183), y en los meses 1-12 para el otro (182).

Aunque parece que el genotipo del donante juega un papel significativo en la farmacocinética de tacrolimus, no está claro en qué momento se convierte en relevante. Varios estudios muestran que el genotipo del donante altera significativamente los valores de la ratio C_0/D en la primera semana post-trasplante (186,183), otros muestran que no comienza a jugar un papel relevante hasta la segunda semana o incluso hasta el sexto mes post-trasplante (184,185).

En cuanto al efecto del genotipo del receptor, en el estudio de los 50 receptores de hígado, y al igual que en el nuestro, no se observó efecto del genotipo CYP3A5 del receptor sobre la ratio C_0/D en ninguno de los puntos de tiempo estudiados (186). En el estudio de Yu *et al.* (185) tampoco se observó efecto del genotipo CYP3A5 del

receptor sobre la ratio C_0/D en ninguno de los puntos de tiempo estudiados, en su cohorte de receptores de hígado, cuando se consideró el genotipo de donante y receptor por separado. Además, mientras que el estudio realizado en 60 pacientes encontró que el genotipo del receptor sólo fue significativo en las semanas 1 y 2 (182), en el estudio de los 70 pacientes se vio que el genotipo del receptor no tuvo efecto sobre la ratio C_0/D en ningún momento (183).

Por lo tanto, sobre el papel del genotipo del receptor, unos pocos estudios muestran que no es relevante (186), mientras que otros muestran que sí, pero sólo hasta el momento en el que el genotipo del donante se vuelve significativo (182,183,186).

En cuanto a la influencia de las combinaciones de genotipos, los requerimientos de dosis más altos observados en pacientes con genotipo portador del alelo *1 de *CYP3A5* y no portador (genotipo CC) del rs1045642 (c.3435C>T), son consistentes con la teoría de que ambos estarían asociados a una mayor actividad de las proteínas para las que codifican dichos genes (135,136). Por otro lado, se obtienen C_0/D más altas en los individuos (receptores) portadores de la combinación del alelo *1 de *CYP3A5* y del alelo *22 de *CYP3A4*. Esto resulta contradictorio, ya que ambos presentan efectos esperados opuestos sobre la metabolización de los ICN, y no es posible encontrar una explicación para justificar estos resultados (sin embargo se ha de tener en cuenta que la n es muy baja y la que la p no llega a ser significativa ($p=0,06$)).

Es de notar que, sorprendentemente, el alelo *1 no presenta ningún efecto sinérgico cuando se combina con otros genotipos. Tal vez esto sea debido al bajo número de individuos de este grupo.

Para finalizar el apartado relacionado con la PK de tacrolimus con respecto a *CYP3A5*, cabe destacar que la influencia del alelo *1 del donante sobre la C_0/D , se mantuvo (aunque sólo con una tendencia a la significación) cuando se introdujeron en el modelo multivariante las variables confusoras. También se mantuvo en el modelo el efecto del alelo 3435T (genotipo del donante), mostrando una influencia en el sentido opuesto al anterior (C_0/D más altas). Estos resultados son coherentes con lo descrito en la literatura en cuanto a sus efectos sobre las proteínas para las que codifican, y pondrían de manifiesto unas necesidades de dosis más altas para los individuos portadores de un injerto con el alelo *1 y unas necesidades de dosis más bajas para

los portadores del alelo 34357. Para los portadores de la combinación de ambos alelos se esperaría que los efectos sobre la PK de tacrolimus estuvieran contrarrestados.

En cuanto a la farmacodinamia de tacrolimus, los resultados parecen indicar que existe una influencia de la variante *1 del receptor, relacionándose con una mayor aparición de síntomas de nefrotoxicidad en los 3 primeros meses post-trasplante (tendencia a la significación). Además también se evidencia un aumento en la incidencia de HTA de novo cuando se considera tanto el genotipo del donante como del receptor (tendencia a la significación). Como ya se ha comentado, nefrotoxicidad e HTA son eventos clínicos importantes en el paciente trasplantado que pueden ir ligados (187-castellote).

Aunque estos resultados, a priori, no se correlacionarían con una influencia de las variables PK según nuestros resultados, son consistentes con lo observado en varios estudios realizados con pacientes de trasplante renal, incluyendo uno relativamente grande de 304 participantes, donde se mostró una asociación entre el alelo *CYP3A5**3 y una disminución en el riesgo de nefrotoxicidad (159,188,189). El mecanismo que existe detrás de este efecto farmacodinámico no está claro, pero podría deberse a una exposición sistémica menor al fármaco debido a los requisitos de dosis más bajas para los individuos portadores del alelo *3 (189), así como a una reducción potencial en la formación de metabolitos a nivel renal (159). *CYP3A5* es el principal responsable de la transformación de tacrolimus en sus metabolitos, y existen experimentos in vitro que han demostrado que la formación del metabolito de tacrolimus 13-O-desmetiltacrolimus fue 13,5 veces mayor en microsomas de riñón humanos con el genotipo *CYP3A5* *1/*3, que en aquellos con el genotipo *CYP3A5* *3/*3 (71). Es posible que una mayor cantidad de estos metabolitos en las células renales de los portadores del alelo *1 puedan inducir o agravar tanto la nefrotoxicidad como la HTA (159). Esto indicaría que la presencia del alelo *3 tendría un efecto protector en cuanto a nefrotoxicidad e HTA, o lo que es lo mismo, que los individuos portadores del alelo *1 presentan un mayor riesgo de sufrir dichos efectos secundarios. En contraste con estos resultados, un estudio más reducido en pacientes trasplantados renales encontró que los homocigotos para el alelo *3 tenían una mayor incidencia de nefrotoxicidad (188). Además, en otro estudio con pacientes trasplantados de hígado también se encontró que el receptor con genotipo *CYP3A5* *3/*3 se asoció con un mayor riesgo de nefrotoxicidad. No se observaron resultados significativos cuando se tuvo en cuenta el genotipo de los donantes. Los autores sugirieron que la enzima

CYP3A5 activa en el riñón puede ayudar a reducir la exposición de las células renales a tacrolimus, ejerciendo de este modo un papel protector (182).

En cuanto a la influencia de genotipos combinados, el efecto observado sobre el aumento de la incidencia de HTA de novo para los portadores del alelo *1 estaría potenciado por la presencia en el injerto de los alelos 3435T y 2677T/A de *ABCB1*.

En conjunto se puede decir, según nuestros resultados, que el alelo *1 está asociado con requerimientos de dosis más altas, que pueden asociarse a un aumento de la nefrotoxicidad y de la HTA (probablemente debido a un acúmulo de los metabolitos de tacrolimus a nivel renal), y que además esta última se ve potenciada cuando además se es portador del alelo T del rs1045642 (c.3435 C>T) o del alelo A/T del rs2032582 (c.2677 G>T/A).

En vista de todos estos resultados, se esperaría que disponer de la información genética para el SNP *CYP3A5* tanto del donante como del receptor fuera beneficioso. Sin embargo, como tacrolimus está sometido a una cuidadosa vigilancia de las dosis, el predecir con precisión la dosificación en base al genotipo de *CYP3A5* queda relegado a una trascendencia clínica relativa. De hecho, Thervet *et al.* (190) encontraron que, aunque los pacientes que recibieron dosis de tacrolimus adaptadas al genotipo tuvieron concentraciones sanguíneas basales dentro del objetivo terapéutico con más frecuencia que los de la dosificación estándar, esto no dio lugar a ninguna mejora en aspectos clínicos tales como la disminución de la incidencia de rechazo o de nefrotoxicidad.

5.3.3.2. Gen *CYP3A4*: rs35599367 (*CYP3A422)**

A diferencia de *CYP3A4**1B, el rs35599367 (*CYP3A4**22) no está en desequilibrio de ligamiento con el rs776746 (*CYP3A5**3) y contribuye parcialmente a la variación de los requisitos de dosis de tacrolimus independientemente del alelo *CYP3A5**3 (145). Nuestros resultados indican que, según el genotipo del receptor, los portadores del alelo *22 presentan concentraciones basales de tacrolimus más altas (que se mantienen al introducir las variables confusoras en el modelo multivariante), y por consiguiente requerirían dosis más bajas. Dichos resultados son consistentes con la reducción de la actividad de *CYP3A4* y lo descrito en la literatura (134,160).

Además, los resultados del presente trabajo indican que el SNP *CYP3A4**22 influye de manera combinada con otros genotipos tanto en la PK como en la PD de tacrolimus.

Dichas influencias combinadas se comentan en detalle en el siguiente apartado del gen *ABCB1*.

No se han encontrado muchos estudios sobre la asociación entre el alelo *CYP3A4*22* y la farmacodinamia de tacrolimus, y los pocos que han estudiado dicha influencia, no han podido demostrar una implicación clínica (191,192). En nuestro trabajo, sí que se observa una influencia de este alelo, pero sólo cuando se considera su efecto en combinación con otros genotipos (comentado en detalle en el siguiente apartado).

5.3.3.3. Gen *ABCB1* (rs1045642 y rs2032582)

En general, el impacto de las variantes de *ABCB1* en la farmacocinética de tacrolimus es controvertido, con estudios que no han encontrado evidencias consistentes de asociación entre las C_0/D y las variantes rs1045642 (c.3435C>T) (161) y rs2032582 (c.2677G>T/A) (138). En contraposición, los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que existe asociación significativa cuando son estudiados de forma individual o en combinación con otros genotipos. Sin embargo, cabe destacar que algunos de los resultados obtenidos son contradictorios, y se discuten en detalle a continuación.

Si el donante es portador de la variante 3435T, los pacientes trasplantados reciben dosis más bajas y muestran C_0/D más altas que si los donantes son no portadores. Para el caso del rs2032582 (c.2677G>T/A), si los donantes son portadores, los pacientes muestran concentraciones basales más bajas (la significación estadística para la variable dosis se pierde cuando se introducen las variables confusoras en el modelo multivariante).

Los resultados obtenidos para el rs1045642 (c.3435C>T) son consistentes con los publicados en un estudio en el que se demostró que existía una fuerte correlación inversa entre la ratio de la C/D de tacrolimus y los niveles de ARNm de *ABCB1*, durante los primeros días tras el trasplante hepático (193,194). En cuanto al rs2032582 (c.2677G>T/A), una vez más se pone de manifiesto en el presente trabajo que podría estar ejerciendo un efecto positivo sobre la P-glicoproteína (es decir, aumentando su producción o incrementando su actividad). Sin embargo, como ya se ha comentado, no se han encontrado estudios hasta el momento que aporten información al respecto para poder contrastar esta hipótesis.

En un estudio retrospectivo de 81 pacientes con trasplante renal se encontró que los homocigotos para el alelo T de los SNPs rs1045642 (c.3435C>T) y rs2032582 (c.2677G>T/A) tuvieron C₀/D más altas en comparación con los no portadores del alelo, 1 mes después de la introducción de tacrolimus (195). En otro estudio, en 83 pacientes con trasplante de pulmón se encontró que los portadores del alelo 2677T también tuvieron mayores C/D en comparación con los homocigotos GG, pero sólo en el primer mes después del trasplante (196). Aunque estos resultados no coinciden con los observados en el presente trabajo, cabe destacar que estos estudios sólo tuvieron en cuenta el genotipo del receptor y además se realizaron en trasplantes distintos a los de hígado. Por tanto, no puede descartarse que exista una influencia del genotipo del injerto, es decir, del donante, en el paciente trasplantado de hígado.

Según nuestros resultados, el papel del genotipo del donante para las variantes de *ABCB1* también podría ser relevante, aunque en la mayoría de los estudios descritos en la literatura sólo se ha tenido en cuenta el genotipo del receptor. Una posible explicación sería que la P-glicoproteína, además de estar presente en altas concentraciones en el extremo de las vellosidades de los enterocitos del intestino delgado (89,90), de las células renales (92,93) y de la barrera hematoencefálica (197,198), se ha demostrado que también transporta fármacos a través de las membranas de los hepatocitos (91).

En cuanto a la influencia de combinaciones de genotipos, además de las ya comentadas en el apartado anterior para el SNPs *CYP3A5*, se obtienen varios resultados significativos y con tendencia a la significación. Para exponerlos, se dividen entre los que son consistentes con lo descrito en la literatura, y los que no los son, y se enumeran a continuación.

Entre los que son consistentes con lo descrito, se encuentra la combinación del alelo *22 y el genotipo GG del rs2032582 (c.2677G>T/A) en los pacientes receptores, en los que se observan C/D más altas.

Entre los que no son consistentes, se encuentra la combinación del alelo *22 de *CYP3A4* en el receptor con la variante 2677A/T en el donante, que está asociada a requerimientos de dosis más bajos y a C/D más altas; el alelo *22 en el receptor con el genotipo CC del rs1045642 (c.3435C>T) en el receptor, que también muestra C/D más altas; y la combinación de la variante 3435T y del genotipo GG del rs2032582 (c.2677G>T/A) ambos en el receptor, que muestran requerimientos de dosis más altos.

Algunos estudios no han encontrado relación entre las combinaciones de genotipos de *ABCB1*, incluyendo uno en el que las asociaciones del haplotipo no fueron significativas después de que se tuviera en cuenta el genotipo para *CYP3A5* (162). Aunque esto sugiere que estos alelos probablemente juegan un papel menor sobre la farmacocinética de tacrolimus comparado con el efecto de los alelos *CYP3A5* (162), en el presente trabajo se mantiene la significación incluso teniendo en cuenta el genotipo de *CYP3A5*.

Hay publicados análisis haplotípicos con los tres principales alelos de *ABCB1*: en trasplante renal se encontró que los pacientes con el haplotipo C-G-C para los SNPs rs1045642 (c.3435C>T), rs2032582 (c.2677G>T/A) y rs1128503 (c.1236C>T), respectivamente, requerían dosis diarias de tacrolimus más altas en comparación con aquellos con el haplotipo T-T-T (195). Los estudios sugieren que estos tres alelos están hasta cierto punto, en desequilibrio de ligamiento (92,179,199), por lo tanto, es difícil saber cuál de estos tres alelos es el responsable de la asociación con parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos para los ICN, o bien si lo es más de uno de ellos. En concreto, el rs1045642 y el rs2032582, han mostrado un fuerte ligamiento entre ellos (179,92). Además, el rs2032582 es un SNP no sinónimo, mientras que los otros dos SNPs son sinónimos (dan lugar a mutaciones silenciosas), lo que sugiere que puede ser el principal efector detrás de cualquier influencia en el gen (199). A pesar de esto, sólo el rs1045642 (c.3435C>T) ha demostrado que afecte a la expresión de *ABCB1* (136).

La variante rs1045642 ha demostrado reducir la expresión y la función intestinal de la P-glicoproteína, y por lo tanto tenía a priori el potencial de afectar la biodisponibilidad del fármaco (136). Una posible explicación para la inconsistencia de los resultados observados en el presente trabajo, podría ser la existencia de un factor importante relacionado con la ubicación de la P-glicoproteína: ésta está también relacionada con el transporte de fármacos dentro de los linfocitos (90,94). La concentración real disponible de los ICN con efecto inmunosupresor dentro de estas células podría estar influenciada por su contenido en P-glicoproteína.

Por lo tanto, es posible que los alelos de *ABCB1* puedan desempeñar un papel más importante en cuanto a la influencia sobre la concentración intracelular de tacrolimus dentro de los linfocitos. En un estudio de 2010 de Capron *et al.* (177) con 96 pacientes con trasplante renal se encontró que los portadores del alelo 3435T tuvieron un aumento de 1,3 veces en la concentración basal intracelular de tacrolimus en PBMCs

(células mononucleares de sangre periférica) en comparación con los no portadores. Este hallazgo coincide con el supuesto efecto del alelo T, que es una reducción de la expresión y función de la P-glicoproteína (136). Los autores también encontraron que los portadores de los alelos 2677T/A de *ABCB1* mostraron un aumento significativo de la concentración en PBMCs en comparación con los no portadores (177). En este caso, tanto el alelo 3435T como el 2677T/A de *ABCB1*, parecen reducir la actividad de la P-glicoproteína. Cabe señalar que sólo el rs1045642 permaneció significativamente asociado con concentraciones intracelulares después del análisis multivariante; se sugirió que la asociación inicial del rs2032582 fue debida al desequilibrio de ligamiento con el rs1045642. Ninguno de los tres alelos se asoció con la concentración de tacrolimus en sangre, lo que llevó a los autores a concluir que los polimorfismos del gen *ABCB1* pueden tener una mayor influencia en las concentraciones intracelulares que en las concentraciones en sangre. De hecho, los autores también observaron que las concentraciones intracelulares en PBMC no se correlacionaban significativamente con las concentraciones en sangre, lo que demuestra que estas últimas pueden no reflejar con precisión la concentración de tacrolimus con capacidad de inmunosupresión dentro de los linfocitos. Desgraciadamente, aunque se ha demostrado la existencia de un vínculo entre las concentraciones intracelulares y el rechazo del injerto, los autores no pudieron encontrar asociación entre estos polimorfismos de *ABCB1* y el rechazo del injerto en la población. Esto podría ser debido a la baja incidencia de episodios de rechazo en el grupo, de sólo el 6% (177). Como las concentraciones intracelulares han demostrado ser predictores significativos de rechazo agudo, entender más sobre el papel de las variantes de *ABCB1* y su efecto sobre las concentraciones de fármaco en linfocitos podría potencialmente ayudar a reducir el riesgo de rechazo del injerto en el futuro.

Aunque la mayoría de los estudios que han analizado la relación entre los alelos de *ABCB1* y la farmacodinamia de tacrolimus no han podido demostrar asociación entre el rs1045642 y/o el rs2032582, y ningún parámetro farmacodinámico, también existen algunos en los que sí se ha demostrado (resumidos en Staatz *et al.* (144)). Los resultados obtenidos en el presente trabajo relacionan la presencia del alelo 3435T del rs1045642 en el injerto del donante con un aumento de la incidencia de diabetes mellitus de novo (tendencia a la significación).

También se relaciona la presencia del alelo 2677T/A del rs2032582 en el donante con una disminución de la neurotoxicidad, y con un aumento de la incidencia de HTA de novo en el receptor (tendencia a la significación).

Los estudios publicados sobre la asociación con neurotoxicidad ofrecen resultados contradictorios: en un caso, se encontró que los homocigotos para la variante mayoritaria, genotipo GG para el rs2032582, tenían un mayor riesgo de eventos neurotóxicos al tomar tacrolimus (200); sin embargo, otros dos estudios encontraron el efecto contrario, ya que era la presencia del alelo mutante 2677T en el rs2032582 (201) la que estaba asociada con un mayor riesgo de neurotoxicidad. Es importante tener en cuenta que, dentro de los estudios de neurotoxicidad, el primer trabajo incluyó a 103 pacientes, mientras que los dos últimos incluyeron 17 y 63 pacientes, respectivamente. Aquí, probablemente se ponga en evidencia el importante papel que está desempeñando la presencia de la P-glicoproteína en la barrera hematoencefálica.

En cuanto a los resultados obtenidos para la HTA, coincidirían una vez más en el presente trabajo con la hipótesis de que la presencia del alelo 2677T/A puede estar asociada con una función aumentada de la P-glicoproteína y por lo tanto que podría relacionarse con una mayor eliminación del fármaco y un menor riesgo de aparición de HTA *de novo*.

No se han encontrado estudios para poder contrastar los resultados obtenidos sobre la variante 3435T del rs1045642 y la incidencia de DM. Su efecto puede estar asociado a que las C/D de tacrolimus más altas en sangre ejerzan un efecto inhibitor de la secreción de insulina e inductor de la resistencia periférica a ésta (75). Sería interesante considerar esta variante antes de pautar tacrolimus, ya que está bien descrito que este IS es más diabetógeno que ciclosporina (75).

Aunque para el resto de variables clínicas estudiadas no se han observado asociaciones significativas para estos SNPs, como por ejemplo, en el estudio de Capron *et al.* (177) donde no se encontró ninguna asociación entre las tres variantes de *ABCB1* y el rechazo, existen algunos estudios en los que sí que se han visto. En un estudio realizado en 117 receptores de trasplante de pulmón, se encontró que los homocigotos 3435TT tenían una menor incidencia de rechazo agudo (202). Además, en un estudio con 120 receptores hepáticos se encontró que el alelo 2677T del rs2032582 estaba asociado con un menor riesgo de disfunción renal crónica en comparación con los genotipos GG, GT, AG, AT (203).

En general, los estudios relacionados con los alelos de *ABCB1* y la farmacocinética y farmacodinamia de tacrolimus son inconsistentes, y la falta de evidencia mecanicista

que respalde las asociaciones hace difícil determinar qué conjuntos de resultados son válidos.

Además, todavía tiene que aclararse cuál es la contribución que tiene la expresión alterada de la P-glicoproteína en los linfocitos sobre el efecto inmunosupresor de los fármacos. Junto con la falta de correlación observada con las concentraciones de fármaco en sangre, tal vez, éstas sean las claves para justificar la inconsistencia y controversia puesta de manifiesto tanto en nuestros propios resultados para poder correlacionar los resultados observados entre los parámetros PK y PD, como en los encontrados en la literatura.

Resumen de la discusión para Tacrolimus

En general, los resultados observados para la PK de los SNPs estudiados son consistentes con lo descrito en la literatura cuando se estudian como efecto individual. Además, en el caso de *CYP3A5* y *ABCB1* (*c.3435C>T*), se observa correlación con un aumento del riesgo de aparición de eventos clínicos, resultados que podrían ser de gran trascendencia. Aun así, todavía no se ha podido demostrar que disponer de esta información a priori reduzca el riesgo de aparición de estos eventos.

Cabe destacar el papel de la variante *c.2677G>A/T* del gen *ABCB1* observado en nuestros resultados: la hipótesis que se propone es que los alelos A/T podrían estar correlacionados con un aumento de la actividad de la P-glicoproteína, no descrito en la literatura hasta el momento.

Los resultados observados para las combinaciones de SNPs cuando interviene *ABCB1* parecen contradictorios. Esta heterogeneidad entre los resultados obtenidos sería compatible con la teoría expuesta por algunos autores, los cuales indican que las variantes de *ABCB1* se correlacionan más con las concentraciones de fármaco en linfocitos que en sangre.

Entre los efectos adversos encontrados en nuestra población en estudio, se encuentran los siguientes a destacar:

- El efecto del alelo *CYP3A5*1* sobre la disminución de la C/D de tacrolimus en donantes y su relación con un aumento de la nefrotoxicidad y de la HTA en receptores, donde ésta última se potencia cuando además se es portador de la variante 3435T en el donante.

- También el efecto del alelo 3435T en donante sobre el aumento de la C/D de tacrolimus que se traduce en un aumento de la DM.
- Y por último, una disminución de la Concentración para los portadores de los alelos 2677A/T en donantes, que se traduce en una disminución de la neurotoxicidad.

No se han encontrado influencias claras en cuanto al genotipo del receptor, remarcando una vez más la importancia fundamental del genotipo del donante, al menos en el TH.

Aunque no era uno de los objetivos cuando se diseñó la presente tesis, hemos encontrados algunos resultados interesantes que permiten la comparación entre grupos, y se ha aprovechado para hacer un pequeño inciso y compararlos con lo descrito en el literatura.

Consideraciones sobre los efectos adversos observados en los grupos CSA y TAC.

Aunque los dos fármacos tienen un perfil similar de efectos secundarios, la frecuencia de aparición de dichos efectos es distinta para ambos. Nuestros resultados muestran que, tal y como ya está descrito en la literatura, el tratamiento con tacrolimus se asocia a una menor incidencia de rechazo agudo (204,205) e HTA (206), y una mayor incidencia de DM (207) (aunque en esta última los resultados no fueron estadísticamente significativos). Para la incidencia de neurotoxicidad y nefrotoxicidad no se observan diferencias entre ambos grupos (207). A pesar de estas concordancias, y de que hay que tener en cuenta que nuestros resultados sólo contemplan los tres primeros meses post-trasplante, en TH se suele observar que lo que pasa en las primeras semanas marca la evolución del injerto y del paciente para toda la vida (170).

En general, tacrolimus presenta una mayor probabilidad de causar alopecia (208), temblores (209), y diabetes mellitus *de novo* (210), mientras que ciclosporina se asocia con hiperlipidemia (211), hipertricosis e hiperplasia gingival (212). La idea de que tacrolimus es menos nefrotóxico que ciclosporina genera controversia (213), ya que particularmente muchos de los estudios de daño renal están basados en la evaluación de pacientes trasplantados de riñón, haciendo difícil discriminar entre el daño inducido

por el fármaco y otras causas de disfunción del órgano (214). En un estudio reciente en pacientes receptores de trasplante pancreático, donde se compararon las biopsias de riñón al inicio y los 5 años post-trasplante, se vio que los efectos de nefrotoxicidad crónica de tacrolimus y ciclosporina eran similares (213). Estos resultados son concordantes con los observados en el presente trabajo, ya que tampoco se observan diferencias entre ambos grupos. En cuanto al RA, el uso de tacrolimus parece estar asociado a una ratio de rechazo del aloinjerto inferior comparado con ciclosporina (204,205).

En contraposición, en la recidiva por VHC se observa una mayor incidencia en el grupo CSA que en el grupo TAC (25,9 vs 7,9 %), mientras que en la literatura se ha descrito lo opuesto (215-217) o que no existen diferencias significativas (218,219). Una posible explicación para estos resultados podría ser que los pacientes tratados con ciclosporina para los que ya está descrita la existencia de una mayor incidencia de RA (218), hayan requerido en más ocasiones recurrir al tratamiento con bolus de corticoides; los corticoides se han relacionado con una mayor incidencia de recidiva de VHC (220). Aunque ciclosporina tiene ciertos efectos antivirales directos, sus posibles beneficios se pierden porque los esteroides son deletéreos y ya es sabido que una pauta IS sin esteroides es mejor para los pacientes VHC+ (221). Aun así, el problema de la recidiva del VHC será pronto anecdótico, porque las nuevas pautas antivirales consiguen eliminar el VHC tanto antes como después del trasplante.

5.4. Limitaciones del estudio

- Tamaño muestral. Algunos grupos se han quedado sin representación y no se ha podido realizar análisis estadístico. Además, esto también ha impedido estudiar la combinación de más de dos genotipos.
- Motivo de exclusión. La omisión del motivo de rechazo en los pacientes excluidos o descartados del estudio (debido a que no se recogió esta información), dificulta la posibilidad de mostrar un árbol de exclusión de los pacientes en el presente trabajo.
- Sistema de medida. El sistema de medida empleado para la cuantificación de la concentración de los fármacos inmunosupresores en sangre (enzimoinmunoanálisis) no es el sistema de medida de referencia (cromatografía

líquida acoplada a la detección de masas en tándem (LC-MSMS)). Pese a ello, la mayoría de los centros, tanto a nivel nacional como internacional, que realizan la determinación de inmunosupresores en sangre, han empleado el enzimo inmunoanálisis (incluso algunos de ellos los siguen utilizando en la actualidad).

- Estudio retrospectivo. El estudio es retrospectivo, por lo que se han seleccionado los pacientes con el fin de lograr un grupo lo más homogéneo posible. Sin embargo, no es prospectivo.
- Formulaciones diferentes de los fármacos inmunosupresores. Se ha intentado contrarrestar hablando de dosis/kg/día, independientemente de la formulación empleada. Siempre por administración oral (ej. Prograf y advagraf).
- Periodo de tiempo estudiado. Tal vez se hubieran podido obtener más resultados significativos si se hubiera ampliado el intervalo de tiempo del estudio más allá de los 90 días. Sin embargo, el objetivo principal cuando se diseñó el presente trabajo fue el de intentar mejorar las primeras indicaciones de dosis de los fármacos inmunosupresores. Todo ello, basándonos en que los acontecimientos que se observan en los primeros días/semanas, marcan los acontecimientos del injerto y del paciente durante los primeros años (170).
- Agrupación de genotipos. El agrupar los genotipos de *ABCB1* como portadores vs no portadores de los alelos *3435T* y *2677A/T*, para el rs1045642 y el rs2032582 respectivamente, puede haber distorsionado resultados que se hubieran puesto de manifiesto para los portadores de estas variantes en homocigosis exclusivamente. Sin embargo, este tipo de agrupación fue necesaria para homogeneizar y facilitar el estudio e interpretación de los resultados.
- Consistencia de los resultados. Cuando se observan diferencias en las dosis administradas y/o en las concentraciones, pero no en las ratios C/D puede ser debido a que todavía hacía falta más tiempo para poner de manifiesto dichas diferencias en la C/D. Esto es así porque primero se detectan diferencias en las concentraciones; para corregir esto (porque con el ajuste de dosis tienden a igualarse), se modifican las dosis, y posteriormente es cuando se ponen de manifiesto las diferencias entre las ratios C/D.

Dentro de este apartado, cabe añadir algunas reflexiones sobre la variabilidad de los resultados observados tanto en el presente trabajo como en la literatura. En diversos estudios realizados en receptores de trasplante hepático se ha encontrado

que las concentraciones de ciclosporina (222) y de tacrolimus (223,224) en tejido hepático son significativamente más bajas en pacientes que sufren rechazo. También se han visto asociaciones entre variantes de *ABCB1* y la concentración de tacrolimus (177) y de ciclosporina (178) en el espacio intracelular de los monocitos periféricos de la sangre, así como entre las concentraciones del espacio intracelular de linfocitos o monocitos periféricos y el riesgo de rechazo agudo (224,225); los monocitos periféricos de la sangre representan un compartimento de la sangre enriquecido con linfocitos (224). En un estudio realizado en 9 pacientes trasplantados de riñón a los que se les administró ciclosporina como tratamiento inmunosupresor, se encontró que el AUC_{0-12} intracelular de los linfocitos T fue un 182% más alto en 5 pacientes que no sufrieron rechazo, comparado con los que sí lo tuvieron (225). Cuando se consideró un grupo más grande, de 20 pacientes, los autores vieron una disminución significativa en las concentraciones intracelulares de los linfocitos T 3 días después de que ocurrieran episodios de rechazo en los 7 pacientes en los que se hizo la biopsia de prueba en rechazo agudo. Por otro lado, se obtuvieron resultados no significativos cuando se consideraron alguno de los parámetros farmacocinéticos en sangre total, incluidas la dosis, C_0 o C_2 (225). Como tanto ciclosporina como tacrolimus usan estos parámetros para su monitorización terapéutica (97), este hallazgo es importante en el contexto de la monitorización de fármacos. En un estudio en el que participaban 90 pacientes trasplantados de hígado tratados con tacrolimus se encontraron resultados concordantes: pacientes que sufrieron rechazo clínico tenían concentraciones de tacrolimus intracelulares 73, 77 y 76% más bajas en los días 3, 5 y 7 post-trasplante, respectivamente, comparados con pacientes que no sufrieron rechazo, o donde éste fue leve. Al igual que como con ciclosporina, no se vio ninguna asociación entre la incidencia de rechazo y la media de las C_0 en sangre entre los días 5-7 (224). Es importante tener esto en cuenta, ya que en el caso del tacrolimus se usan las C_0 como monitorización terapéutica para el protocolo de ajuste de dosis (95). Se necesitarían estudios prospectivos más amplios para evaluar aún mejor la relevancia clínica de usar las concentraciones intracelulares en linfocitos como parte de la monitorización terapéutica (225). Aunque las ratios de rechazo son bajas empleando los actuales protocolos de inmunosupresión, todavía puede ocurrir el rechazo del injerto, incluso cuando las concentraciones de ciclosporina y tacrolimus están dentro de los intervalos terapéuticos propuestos (226). Por lo tanto, podría ser más beneficiosa la monitorización de la concentración del fármaco en el sitio de acción, ya sea en el tejido del aloinjerto o incluso dentro de los propios linfocitos, con el fin de predecir mejor la eficacia del fármaco (144). Por lo que este tipo de monitorización podría mostrar una

correlación mayor entre los resultados PK y PD de los estudios farmacogenéticos para ciclosporina y tacrolimus.

5.5. Fortalezas

Las principales fortalezas del presente trabajo se basan en intentar minimizar las posibles variaciones debidas al diseño del estudio con el fin de ayudar a resolver parte de la variabilidad observada en los trabajos publicados hasta el momento. Se tienen en cuenta los siguientes puntos:

- Se incluyen únicamente pacientes de la misma etnia.
- Se incluyen en el estudio paciente con un único inmunosupresor en monoterapia durante los tres primeros meses post-trasplante.
- Metodológicamente, se realizan todas las medidas de la concentración de los fármacos inmunosupresores en sangre con el mismo sistema de medida.
- Se considera el parámetro ratio concentración dosis (C/D) en el estudio.
- Se emplean modelos estadísticos que tienen en cuenta la dependencia de los datos de un mismo individuo en el tiempo para aumentar la potencia estadística.
- Se incluye el genotipo tanto del receptor como del donante (hay muchos estudios descritos en la literatura que no han tenido en cuenta el papel del genotipo del donante, o si lo han tenido en cuenta, no han estudiado su efecto combinado con el genotipo receptor).
- Se investiga el papel potencial de los haplotipos, tanto a nivel individual como entre parejas de genes. Es posible que combinaciones de SNPs tengan efectos sinérgicos sobre la farmacocinética o farmacodinamia de tacrolimus y ciclosporina (la mayoría de los estudios descritos en la literatura hasta el momento se han centrado en un solo SNP por estudio).
- También se ha estudiado la correlación de los resultados farmacocinéticos con los resultados farmacodinámicos (muchos de los estudios publicados han estudiado ambos tipos de características por separado). Por lo tanto se ha evaluado la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos, estudiando la influencia de dichas variantes genéticas sobre su eficacia clínica (incidencia de rechazo agudo) y/o sobre su seguridad (incidencia de aparición de los efectos adversos) en el paciente trasplantado hepático, relacionándolos con las C/D de fármaco en sangre.

REFLEXIONES FINALES

A pesar de haber intentado disminuir la variabilidad derivada de los factores ya comentados, los resultados obtenidos en el presente trabajo siguen aportando más controversia a todo lo ya descrito en la literatura, y sigue habiendo limitaciones que dificultan la obtención de resultados robustos. Sin embargo, según los resultados obtenidos en nuestra población en estudio, mediante los métodos descritos, se han identificado y/o al menos corroborado algunas observaciones interesantes que merecen estudios más detallados (especificados en las tablas 34 y 35).

Lo que sigue siendo evidente es el papel fundamental que sigue teniendo la TDM.

Es crítico acabar de conocer la función que desempeña *ABCB1* en los linfocitos, así como en tejido hepático, tejido renal y en la barrera hematoencefálica en relación a los ICN, ya que parece tener un papel clave no sólo a nivel del intestino.

En general, se pone de manifiesto la relevancia del genotipo del donante, y la necesidad de más estudios que expongan cuál es el papel que juega en el caso del paciente trasplantado hepático.

Podrían llevarse a cabo estudios prospectivos para verificar los hallazgos obtenidos, y corroborar si el conocimiento del genotipo tiene repercusión sobre la prevención de acontecimientos adversos. En concreto en ciclosporina parece interesante la influencia de la presencia del alelo **1B* en receptores sobre la incidencia de síntomas de neurotoxicidad, la combinación del alelo **1B* en donantes con el genotipo *3435CC* en receptores para la HTA. En el tratamiento con tacrolimus, el alelo **1* en receptores puede influir sobre el riesgo de nefrotoxicidad e HTA, el alelo *3435T* en donantes sobre la DM y los alelos *2677A/T* en donantes en la neurotoxicidad.

Aunque la importancia del papel del donante supone un inconveniente debido a que éste no puede ser elegido, es indiscutible que sería altamente recomendable en estos momentos, disponer y generar un Banco de ADN tanto de los pacientes trasplantados como de los donantes (incluyéndolo en el consentimiento informado) que permitiría el fácil y rápido acceso a este tipo de muestras para la realización de futuros estudios farmacogenéticos.

Serían necesarios más estudios en los que se investigara la correlación de las concentraciones intracelulares de los ICN en linfocitos con el genotipo para estas

variantes, tanto en donante como en receptor, así como su relación con la aparición de efectos adversos en los pacientes trasplantados de hígado.

Se sabe que la tendencia para el tratamiento del paciente TH es usar varios fármacos a dosis bajas para sumar sus efectos inmunosupresores, permitiendo disminuir la toxicidad individual de cada uno de ellos. Esta tendencia complicará el estudio farmacogenético en este tipo de fármacos, ya que habrá múltiples interacciones farmacológicas que aumenten aún más la heterogeneidad de los estudios que se realicen.

6. Conclusiones

Ciclosporina – Características farmacocinéticas

- Los SNPs *CYP3A4*1B*, *CYP3A4*22*, *ABCB1 c.3435C>T* y *ABCB1 c.2677G>T* no muestran ninguna asociación significativa con las características farmacocinéticas de ciclosporina en los pacientes trasplantados de hígado cuando son estudiados de manera individual.
- Los pacientes cuyo donante es simultáneamente portador del alelo 2677A/T y homocigoto 3435CC (es decir, no portador), presentan concentraciones de ciclosporina a las 2 horas de su administración (C_2) y concentraciones de ciclosporina a las 2 horas de su administración relativas a la dosis (C_2/D) más bajas.

Tacrolimus – Características farmacocinéticas

1.- Sobre la dosis

- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es homocigoto 3435-CC (gen *ABCB1*), presentan requerimientos de dosis más altos. Si los propios receptores del trasplante son homocigotos 3435-CC y simultáneamente son portadores de la variante *CYP3A5*1*, también muestran requerimientos de dosis de tacrolimus más altos.
- Los receptores de un trasplante hepático homocigotos 2677-GG que presentan simultáneamente la variante 3435T (ambas del gen *ABCB1*), muestran requerimientos de dosis de tacrolimus más altos.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*22* y cuyo donante es portador de la variante 2677A/T del gen *ABCB1*, muestran requerimientos de dosis de tacrolimus más bajos.

2.- Sobre la concentración o la concentración relativa a la dosis

- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante *CYP3A5*1* presentan concentraciones de tacrolimus y concentraciones de tacrolimus relativas a la dosis más bajas.

- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*22*, presentan concentraciones de tacrolimus más altas.
- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 3435T del gen *ABCB1*, presentan concentraciones de tacrolimus relativas a la dosis más altas.
- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 2677A/T del gen *ABCB1* presentan concentraciones de tacrolimus más bajas.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*22* y simultáneamente son portadores de *CYP3A5*1*, o bien homocigotos 3435-CC, o bien homocigotos 2677-GG muestran concentraciones de tacrolimus relativas a la dosis más altas.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*22* y cuyo donante es portador de la variante 2677A/T del gen *ABCB1*, muestran concentraciones de tacrolimus relativas a la dosis más altas.

Ciclosporina – Características farmacodinámicas:

- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*1B* del gen muestran un mayor riesgo de neurotoxicidad.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A4*22* muestran un menor riesgo de padecer hipertensión arterial de *novo*.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante 2677A/T del gen *ABCB1*, muestran un menor riesgo de padecer hipertensión arterial de *novo*.
- Los receptores de un trasplante hepático homocigotos 3435-CC (gen *ABCB1*) y cuyo donante es portador de la variante *CYP3A4*1B*, muestran un menor riesgo de padecer hipertensión arterial de *novo*.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante 3435T del gen *ABCB1*, muestran un menor riesgo de recidiva por VHC.

- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 3435T del gen *ABCB1*, presentan un mayor riesgo de sufrir un rechazo agudo del injerto y recidiva por VHC.
- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 2677A/T del gen *ABCB1*, presentan un mayor riesgo de recidiva por VHC.

Tacrolimus – Características farmacodinámicas:

- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 2677A/T del gen *ABCB1* presentan un menor riesgo de neurotoxicidad.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A5*1* muestran un mayor riesgo de nefrotoxicidad.
- En los pacientes trasplantados hepáticos, la variante *CYP3A5*1* confiere un mayor riesgo de hipertensión arterial teniendo en cuenta tanto el genotipo del donante como del receptor.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante 2677A/T del gen *ABCB1*, muestran un mayor riesgo de padecer hipertensión arterial.
- Los receptores de un trasplante hepático que presentan la variante *CYP3A5*1* y cuyo donante es portador de las variante 3435T o 2677A/T del gen *ABCB1*, muestran un mayor riesgo de padecer hipertensión arterial de *novo*.
- Los receptores de un trasplante hepático homocigotos 3435-CC (gen *ABCB1*) cuyo donante es portador de la variante *CYP3A4*22*, muestran un mayor riesgo de padecer hipertensión arterial de *novo*.
- Los receptores de un trasplante hepático cuyo donante es portador de la variante 3435T del gen *ABCB1* presentan un mayor riesgo de padecer diabetes *mellitus*.

7. Referencias bibliográficas

1. Braet F, Luo D, Spector I, Vermijlen D, Wisse E. Endothelial and pit cells. In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Philadelphia: Lipponcott Williams & Wilkins; 2001:437-453.
2. Rosen HR. Transplantation immunology: what the clinician needs to know for immunotherapy. *Gastroenterology* 2008;134:1789-1801.
3. Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:51-62.
4. Starlz TE, Marchioro TL, Von Kaula KN. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-662.
5. Starlz TE, Groth CT, Brettsschneider L, et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 1968;168:362-415.
6. Starlz TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli B, Malatack JJ et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982;2:614-636.
7. Liver Transplantation. NIH Consens Statement 1983 Jun 20-23;4(7):1-15.
8. Parrilla P, et al. Nuevos escenarios en el trasplante hepático. *Cir Esp*. 2005;78(4):209-13.
9. 9-8. Margarit C, Jaurrieta E, Maestre P et al. Trasplante hepático ortotópico en un paciente con hepatocarcinoma. *Rev Esp Enf Dig* 1984; 66: 234-239.
10. Hierro L. Indicadores de pronóstico y establecimiento de la indicación de trasplante. *Trasplante hepático en Niños*. Jara P (ed.) Madrid: ERGON; 2006;93-120.
11. Prieto M, Clemente G y col. Documento de consenso de indicaciones de trasplante hepático. *Gastroenterol Hepatol* 2003;26:355-375.
12. Belle SH, Porayko MK y col. Changes in quality of life after liver transplantation among adults. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) Liver Transplantation Database (LTD). *Liver Transpl Surg* 1997;3:93-104.
13. Ortega T, Deulofeu R, Salamero P, Casanovas T, Rimola A, Pont T, Caldes A, Twose J, Ortega F; Red Tematica de Investigacion en Trasplante. Impact of health related quality of life in Catalonia liver transplant patients. *Transplant Proc*. 2009 Jul-Aug;41(6):2187-8.

14. Trasplante Hepático. J. Berenguer, P. Parrilla. 2008 Elsevier España. ISBN: 978-84-8086-310-0.
15. Organización Nacional de Trasplantes. Balance actividad 2014. Disponible en: <http://www.ont.es/Documents/Rueda%20de%20prensa%202012.pdf>
16. Cuervas-Mons V, Barrios C. Trasplante hepático. Rev Esp Enferm Dig 1994;194:235-40.
17. Cirera I, Navasa M, Andreu H, García-Valdecasas JC, Grande L. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante hepático. Gastroenterol Hepatol 1996;19:394-400.
18. Child CG 3rd, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. En: Child CG 3rd, editor. The liver and portal hypertension. Volume 1. Major problems in clinical surgery. Philadelphia: Saunders; 1964.p.1-85.
19. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. Hepatology. 2001;33:464-70.
20. Kamath PS, Kim W. The Model for End-Stage Liver Disease (MELD). Hepatology. 2007;45:797-805.
21. Pokorny H, Gruenberger T, Soliman T, Rockenschaub S, Langle F, Steininger R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. Transpl Int 2000; (Supl 1):S154-157.
22. Herbrecht R, Denning DW y col. Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research, Treatment of Cancer, and the Global Aspergillus Study Group. Voriconazole versus amphotericin b for primary therapy of invasive aspergillosis. N Engl J Med, 347(6):408-15, Aug 2002.
23. Koskinen PK, Kallio EA y col. Cytomegalovirus infection and cardiac allograft vasculopathy. Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society, 1(2):115-26, Jun 1999.
24. Streblow DN, Kreklywich C y col. Cytomegalovirus mediated upregulation of chemokine expression correlates with the acceleration of chronic rejection in rat heart trans-plants. J Virol, 77(3):2182-94, Feb 2003.

25. Batts K. Acute and chronic hepatic allograft rejection: pathology and classification. *Liver Transpl Surg* 1999;5(suppl 1):s21-s29.
26. Hubscher S. Histological finding in liver allografts rejection new insights into the pathogenesis of hepatocellular damage in liver allografts. *Histopathology* 1991;18:377-383.
27. Dousset B, Conti F, Cherruau B, Louvel A, Soubrane O, Houssin D et al. Is acute rejection deleterious to long-term allograft function?. *J Hepatol* 1998;29: 660-668.
28. Margarit C, Rimola A, González-Pinto I, Cuervas-Mons V, Edo A, Andreu H et al. *Transplant Int* 1998;11 (suppl 1): s260-s266.
29. Eckhoff D, McGuire B, Frenette L, Contreras J, Hudson S, Bynon J. Tacrolimus (FK506) and mycophenolate mofetil combination therapy versus tacrolimus in adult liver transplantation. *Transplantation* 1998;65:180-187.
30. Platz K, Mueller A, Zytowski M, Lobeck H, Neuhaus P. FK506 for primary and rescue therapy following liver transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:1409-1410.
31. Jain A, Reyes J, Kashyap R, Rohal S, Abu-Elmagd K, Starzl T et al. What have we learned about primary liver transplantation under tacrolimus immunosuppression? Long-term follow up of the first 1000 patients. *Ann Surg* 1999;2230:441-448.
32. Taibi A, Adham M, Ducerf C, Chevallier M, Bizollon T, Delaroche E et al. Rescue FK506 therapy for acute rejection and early chronic rejection after liver transplantation: report of 14 cases. *Transplant Proc* 1998;30:1411-1412.
33. Reinsmoen N, Jackson A, McSherry C, Ninova D, Wiesner R, Kondo M et al. Organ-specific patterns of donor antigenspecific hyporeactivity and peripheral blood allogeneic microchimerism in lung, kidney, and liver transplant recipients. *Transplantation* 1995;60:1546-54.
34. Anand A, Hubscher S, Gunson B, McMaster P, Neuberger J. Timing, significance, and prognosis of late acute liver allograft rejection. *Transplantation* 1995;60: 1098-1103.
35. Brian MD, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. *N Engl J Med*. 2010; 363:1451-62.
36. Myers BD: Cyclosporine nephrotoxicity (review). *Kidney Int* 1986;30:964-974.

37. Andert SE, Feichtinger E, Grabenwöger M, Grimm M, Schreiner W y Müller MM: Cyclosporine A increases angiotensin converting enzyme activity in heart transplant patients. *Transplant Proc* 1993;25:2735-2737.
38. Miyauchi T, Tomobe Y, Shiba R y cols.: Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus: potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cells. *Circulation* 1990;81:1874-1880.
39. Grieff M, Loertscher R, Alshohaib S y Stewart DJ: Cyclosporine induced elevation in circulating endothelin-1 patients with solid- organ transplants. *Transplantation* 1993;56:880-884.
40. Bechstein WO. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int.* 2000;13(5):313-26.
41. Backman L, Nicar M, Levy M, et al. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. Correlation with clinical events and side effects. *Transplantation.* 1994;57(4):519-25.
42. Campistol JM, Romero R, Paul J, Gutiérrez-Dalmau A. Epidemiology of arterial hypertension in renal transplant patients: changes over the last decade. *Nephrol Dial Trasplant.* 2004; 19(3):62-6.
43. "Estudio prospectivo randomizado para comparar la influencia de la inmunosupresión con ciclosporina frente tacrolimus, sin corticoides, en la recidiva de la hepatitis C tras el trasplante hepático". EUDRACT: 2006-002896-42
44. Vicenti F, Friman S, Scheuermann E, et al. Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus. *Am J Transplant.* 2007; 7:1506-14.
45. Drachenberg CB1, Klassen DK, Weir MR, Wiland A, Fink JC, Bartlett ST, Cangro CB, Blahut S, Papadimitriou JC. Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation.* 1999 Aug 15;68(3):396-402.
46. Berenguer M. Inmunosupresión y trasplante hepático en pacientes infectados por el VHC. *Gastroenterol Hepatol* 2002; 25(4):276-9.

47. Berenguer M, Royuela A, Zamora J. Immunosuppression with calcineurin inhibitors with respect to the outcome of HCV recurrence after liver transplantation: results of a meta-analysis. *Liver Transpl* 2007 Jan; 13(1):21-9.
48. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004; 36:25S–32S.
49. Organ Procurement and Transplantation Network (OPTN) and Scientific Registry of Transplant Recipients (SRTR). OPTN/SRTR 2010 Annual Data Report. Department of Health and Human Services, Health Resources and Services Administration, Healthcare Systems Bureau, Division of Transplantation 2011; 2012.
50. Kapp A, Allen BR, Reitamo S. Atopic dermatitis management with tacrolimus ointment (Protopic). *J Dermatolog Treat* 2003; 14:5–16.
51. Lee SS, Tan AW, Giam YC. Cyclosporine in the treatment of severe atopic dermatitis: a retrospective study. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33:311–313.
52. McCarey DW, Capell HA, Madhok R. Tacrolimus therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43:946–948.
53. Wells G, Tugwell P. Cyclosporin A in rheumatoid arthritis: overview of efficacy. *Br J Rheumatol* 1993; 32 (Suppl 1):51–56.
54. Fahr A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1993; 24:472–495.
55. Thomson AW, Bonham CA, Zeevi A. Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* 1995; 17:584–591.
56. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987;40:1256–1265.
57. Maes BD, Vanrenterghem YF. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-a-vis tacrolimus. *Transplant Proc* 2004; 36: 40S–49S.
58. Magee CC. Pharmacology and side effects of cyclosporine and tacrolimus. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/pharmacologyand-side-effects-of-cyclosporine-and-tacrolimus>. (Accessed 22 March 2013).

59. Antignac M, Barrou B, Farinotti R, Lechat P, Urien S. Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2007; 64:750–757.
60. Clardy CW, Schroeder TJ, Myre SA, Wadhwa NK, Pesce AJ, First MR, et al. Clinical variability of cyclosporine pharmacokinetics in adult and pediatric patients after renal, cardiac, hepatic, and bone-marrow transplants. *Clin Chem* 1988; 34:2012–2015.
61. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43:623–653.
62. Borrows R, Chusney G, Loucaidou M, James A, Goel S, Borrows S, et al. Analysis of factors influencing tacrolimus levels and immunoassay bias in renal transplantation. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:1035–1042.
63. Chiu YY, Higaki K, Neudeck BL, Barnett JL, Welage LS, Amidon GL. Human jejunal permeability of cyclosporin A: influence of surfactants on P-glycoprotein efflux in Caco-2 cells. *Pharm Res* 2003; 20:749–756.
64. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29:404–430.
65. LeGrue SJ, Friedman AW, Kahan BD. Binding of cyclosporine by human lymphocytes and phospholipid vesicles. *J Immunol* 1983; 131:712–718.
66. Wallemacq PE, Furlan V, Moller A, Schafer A, Stadler P, Firdaus I, et al. Pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in paediatric liver transplant recipients. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1998; 23:367–370.
67. Choc MG. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine formulations: Neoral vs Sandimmune. *Int J Dermatol* 1997; 36 (Suppl 1):1–6.
68. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 27:201–214.
69. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Pascual M, Eap CB. CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008; 30:689–699.

70. De Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. In vivo CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92:366–375.
71. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos* 2006; 34:836–847.
72. Kamdem LK, Streit F, Zanger UM, Brockmoller J, Oellerich M, Armstrong VW, et al. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 2005; 51:1374–1381.
73. Dai Y, Iwanaga K, Lin YS, Hebert MF, Davis CL, Huang W, et al. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004; 68:1889–1902.
74. Lampen A, Christians U, Guengerich FP, Watkins PB, Kolars JC, Bader A, et al. Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug Metab Dispos* 1995; 23:1315–1324.
75. Kolars JC, Awni WM, Merion RM, Watkins PB. First-pass metabolism of cyclosporin by the gut. *Lancet* 1991; 338:1488–1490.
76. Lemaire M, Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *J Pharm Pharmacol* 1982; 34:715–718.
77. Alak AM, Moy S. Biological activity of tacrolimus (FK506) and its metabolites from whole blood of kidney transplant patients. *Transplant Proc* 1997; 29:2487–2490.
78. Iwasaki K, Shiraga T, Nagase K, Tozuka Z, Noda K, Sakuma S, et al. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 1993; 21:971–977.
79. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2007; 22:328–335.
80. Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Tokuma Y, Hata T, et al. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 1995; 23:28–34.

81. Akhlaghi F, Dostalek M, Falck P, Mendonza AE, Amundsen R, Gohh RY, et al. The concentration of cyclosporine metabolites is significantly lower in kidney transplant recipients with diabetes mellitus. *Ther Drug Monit* 2012; 34:38–45.
82. Copeland KR, Yatscoff RW, McKenna RM. Immunosuppressive activity of cyclosporine metabolites compared and characterized by mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance. *Clin Chem* 1990; 36:225–229.
83. Radeke HH, Christians U, Sewing KF, Resch K. The synergistic immunosuppressive potential of cyclosporin metabolite combinations. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14:595–604.
84. Moller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, et al. The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 1999;27:633–636.
85. Venkataramanan R, Starzl TE, Yang S, Burckart GJ, Ptachcinski RJ, Shaw BW, et al. Biliary excretion of cyclosporine in liver transplant patients. *Transplant Proc* 1985; 17:286–289.
86. Bleck JS, Schlitt HJ, Christians U, Thiesemann C, Strohmeyer S, Schottmann R, et al. Urinary excretion of ciclosporin and 17 of its metabolites in renal allograft recipients. *Pharmacology* 1989; 39: 160–164.
87. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:248–260.
88. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993; 268:6077–6080.
89. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wacher VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 1999; 62:25–31.
90. Huisman MT, Smit JW, Schinkel AH. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS* 2000; 14:237–242.
91. Wada M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett* 2006; 234:40–50.

92. Bochud M, Eap CB, Maillard M, Johnson T, Vollenweider P, Bovet P, et al. Association of ABCB1 genetic variants with renal function in Africans and in Caucasians. *BMC Med Genomics* 2008; 1:21.
93. Ernest S, Rajaraman S, Megyesi J, Bello-Reuss EN. Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney. *Nephron* 1997; 77:284–289.
94. Chandler B, Detsika M, Khoo SH, Williams J, Back DJ, Owen A. Factors impacting the expression of membrane-bound proteins in lymphocytes from HIV-positive subjects. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60:685–689.
95. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 2009; 31:139–152.
96. Barraclough KA, Isbel NM, Kirkpatrick CM, Lee KJ, Taylor PJ, Johnson DW, et al. Evaluation of limited sampling methods for estimation of tacrolimus exposure in adult kidney transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2011; 71:207–223.
97. Levy G, Thervet E, Lake J, Uchida K. Consensus on Neoral C(2): Expert Review in Transplantation (CONCERT) Group. Patient management by Neoral C(2) monitoring: an international consensus statement. *Transplantation* 2002; 73:S12–S18.
98. Van Gelder T. Drug interactions with tacrolimus. *Drug Saf* 2002; 25: 707–712.
99. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41:813–851.
100. Campana C, Regazzi MB, Buggia I, Molinaro M. Clinically significant drug interactions with cyclosporin. An update. *Clin Pharmacokinet* 1996; 30:141–179.
101. Wachter VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995; 13:129–134.
102. Lindholm A. Factors influencing the pharmacokinetics of cyclosporine in man. *Ther Drug Monit* 1991; 13:465–477.

103. Malekzadeh R, Nasser S, Kaviani MJ, Thaeri H, Kamalian N. Cyclosporin A is a promising alternative to corticosteroids in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1321-7.
104. Heneghan MA, Rizzi P, McFarlane IG, Portmann B, Harrison PM. Low dose tacrolimus as treatment of severe autoimmune hepatitis: potential role in remission induction. *Gut* 1999;44 (Suppl): A61.
105. Morteau O, Blundell S, Chakera A, Bennett S, Christou CM, Mason PD, et al. Renal transplant immunosuppression impairs natural killer cell function in vitro and in vivo. *PLoS One* 2010; 5:e13294.
106. Cardenas ME, Hemenway C, Muir RS, Ye R, Fiorentino D, Heitman J. Immunophilins interact with calcineurin in the absence of exogenous immunosuppressive ligands. *EMBO J* 1994; 13:5944–5957.
107. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev* 2000; 80:1483–1521.
108. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signaling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357:695–697.
109. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 2000; 47:119–125.
110. Shaw KT, Ho AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, et al. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11205–11209.
111. Macian F, Garcia-Rodriguez C, Rao A. Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun. *EMBO J* 2000; 19:4783–4795.
112. Hermann-Kleiter N, Baier G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* 2010; 115:2989–2997.
113. Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:180–190.

114. Hoyos B, Ballard DW, Bohnlein E, Siekevitz M, Greene WC. Kappa B-specific DNA binding proteins: role in the regulation of human interleukin-2 gene expression. *Science* 1989; 244:457–460.
115. Jain J, Loh C, Rao A. Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:333–342.
116. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev* 2012; 26:203–234.
117. Palkowitsch L, Marienfeld U, Brunner C, Eitelhuber A, Krappmann D, Marienfeld RB. The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2011; 286:7522–7534.
118. Messer G, Weiss EH, Baeuerle PA. Tumor necrosis factor beta (TNF-beta) induces binding of the NF-kappa B transcription factor to a high-affinity kappa B element in the TNF-beta promoter. *Cytokine* 1990;2:389–397.
119. Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, et al. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 1997; 272:30412–30420.
120. Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, et al. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *EMBO J* 1994; 13:861–870.
121. Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6:391–403.
122. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807–869.
123. Brabletz T, Pfeuffer I, Schorr E, Siebelt F, Wirth T, Serfling E. Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol Cell Biol* 1993; 13:1155–1162.

124. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:46–53.
125. Guengerich PF. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *APPS Journal* 2006;8(1) Article 1.
126. Van Asperen J, Van Tellingen O, Beijnen JH. The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol Res.* 1998; 37(6): 429-35.
127. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001; 69 (3): 169.
128. Hitzl M, Drescher S, Van der Kuip H et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD3456+ natural killer cells. *Pharmacogenetics.*2001; 11(4): 293.
129. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 (7):3473.
130. Tanabe M, Leiri I, Nagata N et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance gene. *J pharmacol Exp Ther.* 2001; 297 (3): 1137.
131. Von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism on dose adjusted cyclosporine A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem.* 2001;47(6):1048.
132. Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42:299–305.
133. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 11(4), 274–286 (2011).

134. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 2011; 11:274–286.
135. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27:383–391.
136. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473–3478.
137. Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and Genomics* 2013;23:563–585.
138. Staats CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:141–175.
139. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, Macphee IA, de Fijter JW, et al. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics or with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2011;33:178–184.
140. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurina inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:245–254.
141. von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001; 47:1048–1052.
142. Rivory LP, Qin H, Clarke SJ, Eris J, Duggin G, Ray E, et al. Frequency of cytochrome P450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56:395–398.

143. Zochowska D, Wyzgal J, Paczek L. Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann Transplant* 2012; 17:36–44.
144. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: part II. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:207–221.
145. Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, et al. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011; 12:1383–1396.
146. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van Gelder T, van Schaik RH. The new CYP3A4 intron 6 C> T polymorphism (CYP3A4*22) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22:373–380.
147. Kreutz R, Bolbrinker J, van der Sman-de Beer F, Boeschoten EW, Dekker FW, Kain S, et al. CYP3A5 genotype is associated with longer patient survival after kidney transplantation and long-term treatment with cyclosporine. *Pharmacogenomics J* 2008; 8:416–422.
148. Jiang ZP, Wang YR, Xu P, Liu RR, Zhao XL, Chen FP. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103:433–444.
149. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; 86:1206–1213.
149. Moore J, McKnight AJ, Dohler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, et al. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:1891–1899.
150. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:1501–1511.

151. Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Guillaudeau A, Munteanu E, et al. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:95–100.
152. Tavira B, Coto E, Diaz-Corte C, Ortega F, Arias M, Torres A, et al. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49:825–833.
153. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; 14:147–154.
154. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, et al. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2009; 31:187–197.
155. Tang HL, Xie HG, Yao Y, Hu YF. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the CYP3A5 nonexpressers than expressers. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21:713–720.
156. Benkali K, Rostaing L, Premaud A, Woillard JB, Saint-Marcoux F, Urien S, et al. Population pharmacokinetics and Bayesian estimation of tacrolimus exposure in renal transplant recipients on a new once-daily formulation. *Clin Pharmacokinet* 2010; 49:683–692.
157. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte – an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 89:662–673.
158. Birdwell KA, Grady B, Choi L, Xu H, Bian A, Denny JC, et al. The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22:32–42.

159. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82:711–725.
160. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 2011; 57:1574–1583.
161. Terrazzino S, Quaglia M, Stratta P, Canonico PL, Genazzani AA. The effect of CYP3A5 6986A>G and ABCB1 3435C>T on tacrolimus dose adjusted trough levels and acute rejection rates in renal transplant patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22:642–645.
162. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Goldberg L, Holt DW, et al. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; 82:705–708.
163. Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, et al. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
164. Bruix J, Sherman M, Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42 (5): 1208-36.
165. Levey AS, Coresh J, Greene T, Marsh J, Stevens LA, Kusek J et al. Expressing the MDRD Study equation for estimating GFR with IDMS traceable (gold standard) serum creatinine values (Abstract). *J Am Soc Nephrol*, 16 (2005), pp. 69A
166. NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979; 28: 1039-57.
167. Pawlotsky, J. M., M. Bouvier-Alias, C. Hezode, F. Darthuy, J. Remire, and D. Dhumeaux. 2000. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 32:654–659.
168. McCulloch CE, Searle SR: *Generalized, Linear, and Mixed Models*. Wiley Series in Probability and Statistics: Canada 2001.

169. Programa R -R Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (ISBN 3-900051-07-0, URL <<http://www.R-project.org/>>).
170. Sanchez EQ(1), Melton LB, Chinnakotla S, Randall HB, McKenna GJ, Ruiz R, Onaca N, Levy MF, Goldstein RM, Klintmalm GB. Predicting renal failure after liver transplantation from measured glomerular filtration rate: review of up to 15 years of follow-up. *Transplantation*. 2010 Jan 27;89(2):232-5.
171. Rahmioglu N, Heaton J, Clement G, Gill R, Surdulescu G, Zlobecka K, et al. Genetic epidemiology of induced CYP3A4 activity. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21:642–651.
172. Živković, Saša A. Neurologic complications after liver transplantation. *World journal of hepatology*, 2013, vol. 5, no 8, p. 409.
173. Wijdicks, Eelco FM. Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. *Liver Transplantation*, 2001, vol. 7, no 11, p. 937-942.
174. Vanhove, T., Annaert, P., & Kuypers, D. R. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review. *Drug Metabolism Reviews*, 2016:1-25.
175. Holgado R, Castillo D. Riesgo cardiovascular en el paciente trasplantado. In: Brunet M, Campistol JM, Rimola A, editores. *Tacrolimus*. Madrid: Drug Farma; 2000. P.51-61.
177. Capron A, Mourad M, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics* 2010; 11:703–714.
178. Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Ansermot N, Fathi M, et al. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:307–315.
179. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2008; 21:879–891.

180. Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Benitez J, Caravaca F, Gervasini G. ABCB1 polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69:385–393.
181. Moore J, McKnight AJ, Dohler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, et al. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23:1891–1899.
182. Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18:413–423.
183. Li D, Zhu JY, Gao J, Wang X, Lou YQ, Zhang GL. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, cytochrome P450 3A5 and ABCB1 in Chinese liver transplant patients treated with immunosuppressant tacrolimus. *Clin Chim Acta* 2007; 383:133–139.
184. Ji E, Choi L, Suh KS, Cho JY, Han N, Oh JM. Combinational effect of intestinal and hepatic CYP3A5 genotypes on tacrolimus pharmacokinetics in recipients of living donor liver transplantation. *Transplantation* 2012; 94:866–872.
185. Yu S, Wu L, Jin J, Yan S, Jiang G, Xie H, et al. Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation. *Transplantation* 2006; 81:46–51.
186. Wei-lin W, Jing J, Shu-sen Z, Li-hua W, Ting-bo L, Song-feng Y, et al. Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients. *Liver Transpl* 2006; 12:775–780.
187. Fussner, L. A., Heimbach, J. K., Fan, C., Dierkhising, R., Coss, E., Leise, M. D., & Watt, K. D. Cardiovascular disease after liver transplantation: When, What, and Who Is at Risk. *Liver Transplantation*, 2015; 21(7), 889-896.
188. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provot F, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:3046–3050.

189. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2010; 32:394–404.
190. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther* 2010; 87:721–726.
191. Moes DJ, van der Bent SA, Swen JJ, van der Straaten T, Inderson A, Olofsen E, Verspaget HW, Guchelaar HJ, den Hartigh J, van Hoek B. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of once daily tacrolimus formulation in stable liver transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2015 Oct 31.
192. Kuypers DR, de Loo H, Naesens M, Coopmans T, de Jonge H. Combined effects of CYP3A5*1, POR*28, and CYP3A4*22 single nucleotide polymorphisms on early concentration-controlled tacrolimus exposure in de-novo renal recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2014 Dec;24(12):597-606.
193. Masuda S, Goto M, Okuda M, Ogura Y, Oike F, Kiuchi T, et al. Initial dosage adjustment for oral administration of tacrolimus using the intestinal MDR1 level in living-donor liver transplant recipients. *Transplant Proc* 2005;37:1728–1729.
194. Masuda S, Goto M, Fukatsu S, Uesugi M, Ogura Y, Oike F, et al. Intestinal MDR1/ABCB1 level at surgery as a risk factor of acute cellular rejection in living-donor liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79:90–102.
195. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1889–1896.
196. Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP, et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004; 44:135–140.
197. Schinkel, A. H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood–brain barrier. *Advanced drug delivery reviews* 1999; 36(2), 179-194.

198. Bartels AL. Blood-brain barrier P-glycoprotein function in neurodegenerative disease. *Curr Pharm Des.* 2011;17(26):2771-7.
199. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C >T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15:693–704.
200. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int* 2012; 25:471–480.
201. Yamauchi A, Leiri I, Kataoka Y, Tanabe M, Nishizaki T, Oishi R, et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 2002; 74:571–572.
202. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Webber S, Ristich J, et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005; 14:37–42.
203. Hebert MF, Dowling AL, Gierwatowski C, Lin YS, Edwards KL, Davis CL, et al. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics* 2003; 13:661–674.
204. Platz K, Mueller A, Zytowski M, Lobeck H, Neuhaus P. FK506 for primary and rescue therapy following liver transplantation. *Transplant Proc* 1998;30:1409-1410.
205. Freese D, Snover D, Sharp H, Gross C, Savick S, Payne W. Chronic rejection after liver transplantation: a study of clinical, histopathological and immunological features. *Hepatology* 1991;13:882-891.
206. Ignacio Sánchez Lázaro, Luis Almenar Bonet, Luis Martínez Dolz, Jaime Agüero Ramón-Llin, Francisco Buendía Fuentes, Juan Miguel Sánchez Gómez, Begoña Muñoz Giner, Antonio Salvador Sanz, Unidad de Insuficiencia Cardíaca y Trasplante y Servicio de Cardiología del Hospital Universitario La Fe, Valencia. 6021-3 Estudio prospectivo, aleatorizado, comparativo entre ciclosporina y tacrolimus asociado a daclizumab, micofenolato mofetilo y esteroides en trasplante cardíaco. *Revista Española de Cardiología.*

207. V. C. McAlister, E. Haddad, E. Renouf, R. A. Malthaner, M. S. Kjaer and L. L. Glud. Cyclosporin versus Tacrolimus as Primary Immunosuppressant After Liver Transplantation: A Meta-Analysis. *American Journal of Transplantation* 6 (7), 1578-1585. Julio 2006.
208. Tricot L, Lebbe C, Pillebout E, Martinez F, Legendre C, Thervet E. Tacrolimus-induced alopecia in female kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 2005; 80:1546–1549.
209. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997; 63:977–983.
210. Grimm M, Rinaldi M, Yonan NA, Arpesella G, Arizon Del Prado JM, Pulpon LA, et al. Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients – a large European trial. *Am J Transplant* 2006; 6:1387–1397.
211. Seymen P, Yildiz M, Turkmen MF, Titiz MI, Seymen HO. Effects of cyclosporine-tacrolimus switching in posttransplantation hyperlipidemia on high-density lipoprotein 2/3, lipoprotein a1/b, and other lipid parameters. *Transplant Proc* 2009; 41:4181–4183.
212. Thorp M, DeMattos A, Bennett W, Barry J, Norman D. The effect of conversion from cyclosporine to tacrolimus on gingival hyperplasia, hirsutism and cholesterol. *Transplantation* 2000; 69:1218–1220.
213. Fioretto P, Najafian B, Sutherland DE, Mauer M. Tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity in native kidneys of pancreas transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6:101–106.
214. Williams D, Haragsim L. Calcineurin nephrotoxicity. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006; 13:47–55.
215. Berenguer M, Crippin J, Gish R, et al. A model to predict severe HCV-related disease following liver transplantation. *Hepatology* 2003; 38: 34-41.
216. Watashi K, Hijakata M, Hosaka M, et al. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003; 38: 1282-1288.

217. Pollard S. Calcineurin inhibition and disease recurrence in hepatitis C virus-positive liver transplant recipient. *Liver Int* 2004; 24: 402-406.
218. Wiesner RH. A long-term comparison of tacrolimus (FK506) versus cyclosporine in liver transplantation: A report of the United States FK506 study group. *Transplantation* 1998; 66: 493-499.
219. Martin P, Busuttil R, Goldstein RM, et al. Impact of tacrolimus versus cyclosporine in hepatitis C virus-infected liver transplant recipients on recurrent hepatitis: a prospective, randomized trial. *Liver Transpl* 2004; 10: 1258-1262.
220. Sheiner PA, Schwartz ME, Mor E, et al. Severe or multiple rejection episodes are associated with early recurrence of hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21: 30-34.
221. “Estudio prospectivo controlado sobre la eficacia de un régimen inmunosupresor sin corticoides tres el trasplante hepático” (Estudio THOSIN1). Unidad de Trasplante Hepático. Hospital Universitari de Bellvitge 2001-2003.
222. Sandborn WJ, Lawson GM, Krom RA, Wiesner RH. Hepatic allograft cyclosporine concentration is independent of the route of cyclosporine administration and correlates with the occurrence of early cellular rejection. *Hepatology* 1992; 15:1086–1091.
223. Sandborn WJ, Lawson GM, Cody TJ, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, et al. Early cellular rejection after orthotopic liver transplantation correlates with low concentrations of FK506 in hepatic tissue. *Hepatology* 1995;21:70–76.
224. Capron A, Lerut J, Latinne D, Rahier J, Haufroid V, Wallemacq P. Correlation of tacrolimus levels in peripheral blood mononuclear cells with histological staging of rejection after liver transplantation: preliminary results of a prospective study. *Transpl Int* 2012; 25:41–47.
225. Falck P, Asberg A, Guldseth H, Bremer S, Akhlaghi F, Reubsaet JL, et al. Declining intracellular T-lymphocyte concentration of cyclosporine precedes acute rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008; 85:179–184.
226. Knight SR, Morris PJ. The clinical benefits of cyclosporine C2-level monitoring: a systematic review. *Transplantation* 2007; 83:1525–1535.

8. Anexos

Anexo 1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Estudio retrospectivo para evaluar la relevancia clínica de diversas variantes en los genes codificadores de enzimas de biotransformación y proteínas transportadoras de Tacrolimus y Ciclosporina, en pacientes portadores de un trasplante hepático primario.

Promotor: **Hospital Universitari de Bellvitge**

Código: **EPA014/11**

Versión Final: 23/03/11

Para cumplimentar por el médico:

Nombre del médico:.....

Teléfono de contacto:.....

Introducción:

Como sabe, cada vez es más la información que se tiene sobre cómo el material genético de cada persona afecta tanto a las características del propio individuo como al desarrollo de distintas enfermedades, y a la forma en que la persona responde a distintos estímulos y/o a distintas medicaciones.

En los últimos años, se ha empezado también a estudiar cómo el material genético de cada paciente trasplantado, afecta a la forma en que éste responde tanto al trasplante, como a la medicación que se le administra para conseguir que el órgano trasplantado sea aceptado por el organismo (denominada medicación inmunosupresora).

El estudio al que se le invita a participar tiene como objetivo conocer las características de una pequeña parte de su material genético, que otros estudios han relacionado con la respuesta a distintos medicamentos inmunosupresores, sin cambiar el seguimiento clínico que su médico le está realizando. Para saber si desea participar conviene que entienda por qué se va a realizar este estudio y en qué consiste. Por favor, tómese todo el tiempo que necesite para leer con cuidado esta información y comente lo que desee con el médico, sus amigos y sus familiares. Es necesario que disponga de tiempo suficiente para decidir si quiere o no participar.

¿Por qué es importante conocer las características del material genético de los pacientes trasplantados?

Como quizás sepa, el material genético de cada persona se organiza básicamente en distintos "genes". Estos genes son responsables de determinadas características de las personas, como su apariencia física, y también de cómo reacciona su cuerpo ante los distintos medicamentos que toma.

Los genes responsables de cómo reacciona su cuerpo a los medicamentos inmunosupresores son los mismos en todas las personas, pero existen pequeñas diferencias entre ellos, que hacen que cada persona responda de forma diferente, de modo que con una misma dosis de medicación, unas personas tienen más fármaco activo en su organismo que otras.

Como le comentó su médico, para que su hígado evolucione favorablemente es crítico tomar correctamente la medicación que le indicó, ya que tanto el riesgo de perder el hígado, como de que aparezcan efectos secundarios depende en gran manera de ello. Pero ahora que sabemos que las características de sus genes también influyen en la cantidad de medicación activa que hay en su sangre, por lo que es muy importante conocerlas, sobre todo en los primeros días de post-trasplante.

¿Cuál es el propósito de este proyecto?

El propósito del estudio es conocer cuáles son las características de los genes implicados en cómo respondió usted a los medicamentos inmunosupresores que su médico le prescribió, y ver cómo cambió la concentración de estos medicamentos en su sangre, en función de estas características.

¿Por qué me han elegido a mí?

Cuando usted fue trasplantado, su médico lo trató con la medicación inmunosupresora que consideró ideal para usted.

El estudio al que se le está invitando a participar estudia cómo se relacionan las características de los genes responsables de la absorción, el transporte y la distribución de los fármacos inmunosupresores dentro del cuerpo, con las cantidades de estos fármacos que permanecen en el organismo después de haberlos tomado, y que usted recibió. Su médico ha considerado oportuno invitarle a participar en el estudio, para conocer mejor las características de algunos de sus genes, y su respuesta a estos medicamentos.

¿Qué me sucederá si participo?

Si participa, se le seguirá tratando con los mismos medicamentos que le han estado administrando hasta ahora, y se le pedirá que acuda al hospital para realizar su seguimiento clínico el mismo número de veces. El único cambio respecto a su seguimiento habitual será que, en el caso de que acepte participar, se le extraerá una muestra de sangre, a partir de la cual se estudiarán las características de sus genes relacionados con la absorción, transporte y distribución de los medicamentos inmunosupresores. Esta muestra (que al igual que el resto de sus datos, nunca estará identificada con su nombre), se enviará a un laboratorio para su análisis. La persona que dirige este laboratorio será la responsable de la custodia de la muestra desde que la reciba hasta que la destruya. La muestra nunca saldrá del laboratorio.

La muestra de sangre adicional, de unos 5 mL, se utilizará exclusivamente para estudiar los genes comentados anteriormente. No se utilizará con ninguna otra finalidad, ni para estudiar otro tipo de genes. Una vez realizados los estudios, la muestra se guardará durante un periodo máximo de 5 años para posibles confirmaciones de los datos. Si usted lo desea, podrá pedir en cualquier momento la destrucción de su muestra, diciéndoselo a su médico. Él/ella se pondrá en contacto con el responsable del laboratorio.

Por lo que respecta a su seguimiento clínico habitual no se verá modificado. Dentro del marco del estudio se tomarán los datos registrados relacionados con su historia clínica, el trasplante del hígado que recibió, la medicación que se le administró, y las posibles complicaciones, desde el día del trasplante, hasta 3 meses después de haber recibido el hígado. Se desea valorar cómo evolucionó y qué cantidad de

medicamentos inmunosupresores había en su sangre, así como si tuvo algún problema de salud.

¿Quiénes participarán en el estudio?

Está previsto que en el estudio participen aproximadamente 100 participantes, que como usted, fueron trasplantados en el Hospital Universitari de Bellvitge.

¿Cuáles son los efectos secundarios derivados de la extracción de sangre?

No existe ningún riesgo adicional por su participación en este estudio respecto al seguimiento clínico habitual, ya que la única diferencia por participar en el estudio es que se le realizará una extracción de sangre que, si no participara en el estudio, no se le realizaría. El único riesgo por lo tanto sería el asociado a este pinchazo adicional (aunque podría ser que se extrajera la sangre durante la extracción para una analítica de seguimiento habitual, y ni siquiera fuera necesario pincharle una vez más). El riesgo asociado al pinchazo es la aparición ocasional de un hematoma.

De cualquier manera, le rogamos que consulte con su médico todos los aspectos que puedan preocuparle, tanto sobre la posibilidad de efectos secundarios, como sobre cualquier otro tema.

¿Tengo que participar en el estudio?

Es usted quien tiene que tomar la decisión de participar o no libremente y su médico no tomará partido respecto a la decisión que tome, ni juzgará su decisión. Si decide participar en él se le pedirá que firme un formulario de consentimiento escrito. Si después de pensarlo decide no participar, o una vez que está participando posteriormente cambia de idea, por favor informe a su médico. Si elige abandonar este estudio o no participar en él no tendrá que explicar los motivos que le han llevado a tomar esa decisión, y se le seguirá ofreciendo la misma calidad asistencial, sin perjuicio alguno en su seguimiento clínico ni en su tratamiento.

Si durante el desarrollo del estudio se pone en conocimiento de la comunidad científica información relevante, que pueda afectar al desarrollo del mismo o a su deseo de participar en él, usted será puntualmente informado de ello.

¿Tendré algún beneficio por participar en el estudio?

Su participación en este estudio no implica ningún beneficio directo para usted de forma inmediata, pero se espera que la información que se obtenga en este estudio añada conocimientos que permitan utilizar mejor los fármacos inmunosupresores en todos los pacientes, de una forma más personalizada, y que esto redunde en el mejor control y evolución a largo plazo de los pacientes trasplantados.

¿Quién conocerá mis datos personales?

En ningún documento del estudio aparecerán su nombre y apellidos, ni ningún dato que permita identificarle. Se le identificará solamente por un número.

Sus datos registrados en el estudio, así como su historia clínica, sólo los podrán revisar personas autorizadas (es decir, las personas directamente responsables del estudio y las autoridades sanitarias). Toda información relacionada con el estudio, en la que consten sus datos personales, se tratará de manera confidencial y no se

divulgará, cumpliéndose lo establecido en la Ley Orgánica 14/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de Carácter Personal. Todos los datos recogidos del centro se mantendrán anónimos.

Sus datos, así como la información sobre su estado de salud general, sus características genéticas y cómo ha respondido al tratamiento podrían usarse en presentaciones o publicaciones científicas, pero sus datos personales se tratarán con la más estricta confidencialidad y nunca se desvelarán datos que pudieran identificarle.

Al acceder a participar en este estudio, usted consiente en la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de sus datos, con respeto del anonimato, a fines de atención sanitaria y/o análisis de los resultados del estudio.

En relación a las muestras biológicas que se utilicen para el estudio, una vez finalizado éste, se almacenarán en el Laboratori Clínic del Hospital de Bellvitge, codificadas con una numeración de 6 dígitos, conforme a la Ley de Investigación Biomédica 14/2007.

Según la ley vigente, los pacientes tienen el derecho de acceder a sus datos personales y además, si es por una causa justificada, pueden ejercer el derecho de rectificación, cancelación y oposición. Si desea hacerlo, sólo tendrá que pedirselo al médico del estudio. Él/ella lo pondrá inmediatamente en conocimiento del promotor como responsable de los datos.

Persona de contacto.

Durante todo el estudio podrá formular cualquier pregunta que tenga. Si tiene algún problema o más preguntas sobre el estudio o sobre sus derechos como paciente, póngase en contacto con la persona indicada a continuación:

Nombre: Dr. Castellote.....Tlf: 932607916.....
Dirección: Hospital Universitari de Bellvitge, C/ Feixa Llarga s/n, 08907, L'Hospitalet, Barcelona.

Formulario de consentimiento informado

Yo, (nombre y apellidos):.....

He leído la hoja de información sobre el “Estudio retrospectivo para evaluar la relevancia clínica de diversas variantes en los genes codificadores de enzimas de biotransformación y proteínas transportadoras de Tacrolimus y Ciclosporina, en pacientes portadores de un trasplante hepático primario”.

- Se me ha informado ampliamente.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He hablado con el doctor.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Entiendo que al acceder a participar en este estudio, consiento a la recogida, tratamiento, cesión y transferencia (si procede) de mis datos personales con respeto del anonimato para fines de atención sanitaria y/o investigación médica.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y que mis datos puedan ser utilizados con fines de investigación. Recibiré una copia firmada de esta hoja de información al paciente y consentimiento informado.

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del investigador:

Fecha:

