



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL**

Unidad Zacatenco  
Departamento de Farmacología

**CORRELACIÓN DEL GENOTIPO *MDR1(ABCB1)* Y  
*CYP3A5* CON EL PERFIL FARMACOCINÉTICO  
DEL TACROLIMUS EN NIÑOS CON TRASPLANTE  
RENAL.**

**Tesis que presenta**

M en C MARÍA INÉS DEL PILAR GARCÍA ROCA

**Para Obtener el Grado de  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**En La Especialidad de  
FARMACOLOGÍA**

**DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. MARA MEDEIROS DOMINGO  
DR. GILBERTO CASTAÑEDA HERNÁNDEZ**

## **CORRELACIÓN DEL GENOTIPO *MDR1(ABCB1)* Y *CYP3A5* CON EL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE TACROLIMUS EN NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL.**

### **RESUMEN:**

El trasplante es el tratamiento de elección en la enfermedad crónica terminal (ERCT) y el rechazo es la principal complicación, se emplean fármacos como tacrolimus para evitarlo. Tacrolimus se ha vinculado a la glicoproteína-P y el CYP3A5, cuyos genes son polimórficos. No se tienen reportes de la farmacocinética del tacrolimus en pacientes pediátricos con trasplante renal y el genotipo de la glicoproteína-P y la isoenzima CYP3A5. El conocer la frecuencia de los polimorfismos de *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)* en pacientes mexicanos con trasplante renal, su correlación con el perfil farmacocinético del tacrolimus y los genotipos *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)* en niños con trasplante renal y el comparar estos resultados con los reportados en otros grupos étnicos, fueron los objetivos del presente trabajo.

Estrategia experimental y métodos: Se determinó la frecuencia de los genotipos *CYP3A5\*1* y *CYP3A5\*3* en 291 mexicanos receptores de trasplante renal, tanto adultos como niños, tratados con tacrolimus. A 51 de los niños participantes, se les determinó además, la farmacocinética del tacrolimus y las variantes alélicas en los exones 12, 21 y 26 del gen *MDR1(ABCB1)* mediante secuenciación.

Resultados: De 291 pacientes con trasplante renal, 18 (6.2%) fueron (*CYP3A5\*\*1\*1*), 121 pacientes (41.6%) fueron heterocigotos (*CYP3A5\*1\*3*), ambos expresores y 152 pacientes (52.2%) fueron no expresores(*CYP3A5\*3\*3*). Los individuos con genotipo (*CYP3A5\*1\*1*) requieren altas dosis del tacrolimus para alcanzar los niveles en valle, a diferencia de los individuos con genotipo mutante *CYP3A5\*3\*3*. Se encontraron diferencias en la C<sub>max</sub>, y en el ABC<sub>0-12h</sub> entre los expresores y los no expresores. No se encontraron diferencias entre la farmacocinética del tacrolimus y los polimorfismos del gen *MDR1(ABCB1)*. La población mexicana difiere con otras poblaciones en los genotipos *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)*.

Conclusiones: El 52.2% de los participantes fueron *CYP3A5\*3\*3*. Este genotipo pueden estar asociados a la dosis y en la farmacocinética del tacrolimus. Los genotipos analizados del gen *MDR1*, en este estudio, no mostraron tener influencia en la farmacocinética del tacrolimus. La población mexicana es diferente a otras poblaciones. Se requieren más estudios para determinar si el conocimiento del polimorfismo genético pre-trasplante, ayudaría en la sobrevida del injerto y en la disminución de los rechazos y/o la nefrotoxicidad.

## **CORRELATION OF GENOTYPE MDR1 (ABCB1) and CYP3A5 WITH THE PHARMACOKINETIC PROFILE OF TACROLIMUS IN CHILDREN WITH RENAL TRANSPLANT.**

### **SUMMARY:**

Transplantation is the treatment of choice for ESRD and rejection is the main complication and drugs such as tacrolimus are used to prevent it. Tacrolimus has been linked to P-glycoprotein and CYP3A5, whose genes are polymorphic. There are no reports of the pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric renal transplant patients and genotype of P-glycoprotein and CYP3A5 isoenzyme. The objectives of this study were to determine the frequency of polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) in Mexican patients with renal transplantation, correlating the pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5 genotypes and MDR1 (ABCB1) in renal transplant children and compare these results with those reported in other ethnic groups.

Experimental strategy and methods: We determined the frequency of genotypes CYP3A5 \*1 and CYP3A5 \*3 in 291 renal transplant recipients Mexicans, both adults and children treated with tacrolimus. It was also determined in 51 of participating children, the pharmacokinetics of tacrolimus and allelic variants in exons 12, 21 and 26 of the gene MDR1 (ABCB1) by sequencing. Results: Of 291 patients with renal transplantation, 18 (6.2%) were (CYP3A5\*1\*1), 121 patients (41.6%) were heterozygous (CYP3A5\*1\*3), both expressers and 152 patients (52.2%) were not expressers (CYP3A5\*3\*3). Individuals with genotype (CYP3A5\*1\*1) require high doses of tacrolimus to achieve levels valley, unlike individuals with mutant genotype CYP3A5\*3\*3. There were differences in C<sub>max</sub> and AUC<sub>0-12h</sub> between expressers and not expressers. No differences were found between tacrolimus pharmacokinetics and MDR1(ABCB1) gene polymorphisms. The genotype frequencies of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) are different when compared with other populations.

Conclusions: 52.2% of participants were CYP3A5\*3\*3 genotype modifying the dose and the pharmacokinetics of tacrolimus compared to expressers patients or individuals. The genotypes of the MDR1 gene analyzed in this study showed no influence on the pharmacokinetics of tacrolimus. The Mexican population is different from other populations. Further studies are needed to determine if knowledge of genetic polymorphism pre-transplant, help in graft survival and decreased rejection and / or nephrotoxicity.

## **1. Introducción**

### **1.1 Enfermedad Renal y Trasplante Renal.**

La enfermedad renal se define como el daño renal por un tiempo igual o mayor a 3 meses, con presencia de anormalidades estructurales y/o funcionales del riñón con o sin disminución de la velocidad de filtración glomerular (VFG) y una o más de las siguientes características:

Alteración de la composición de la orina o la sangre

Alteraciones en exámenes de imagen

Alteraciones en la biopsia renal, o en los pacientes que presentan VFG menor de 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> igual o mayor a 3 meses con o sin otros signos descritos previamente (1).

Las guías K/DOQI clasifican a la enfermedad renal crónica en 5 estadios que son (2):

Estadio 1: VFG mayor a 90 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>

Estadio 2: VFG entre 89 y 60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>

Estadio 3: VFG entre 59 a 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>

Estadio 4: VFG entre 29 y 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>

Estadio 5: VFG menor a 15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> a lo que se considera Enfermedad crónica terminal (ERCT) (2-4).

Las implicaciones de la ERCT son diferentes en los niños comparados con los adultos. En los niños, ya que además de anemia, hipertensión arterial, desequilibrio electrolítico, enfermedad óseo-metabólica, proteinuria y oliguria, se afecta el desarrollo neuropsicológico y de los diferentes órganos, por lo que el reemplazo de la función renal es de suma importancia (5-7).

El trasplante renal (TR) se prefiere sobre las terapias de reemplazo dialítica (diálisis peritoneal y hemodiálisis) ya que reestablece la función renal, promueve el crecimiento adecuado, corrige la osteodistrofia, evita la anemia, disminuye el estrés producido por el tratamiento con diálisis, promueve un mejor desarrollo psicosocial, aumenta la calidad de vida y a largo plazo tiene menor costo que la diálisis (8-10).

La sobrevida del injerto depende de múltiples factores entre los que destacan la calidad del tejido renal, la compatibilidad, las condiciones preexistentes, la edad del receptor y del donador, las diferencias raciales, las transfusiones de sangre previas y el tiempo de isquemia fría, entre otros (11).

El rechazo es la principal complicación inmunológica posterior al trasplante y de acuerdo a su aparición en el momento post-trasplante se clasifica en:

Hiperagudo: se presenta en las primeras horas post-trasplante, es causada por la presencia de los anticuerpos preformados dirigidos contra antígenos endoteliales del donante.

Agudo: caracterizado por hacer su aparición dentro de los primeros meses post-trasplante, es un proceso de lesión vascular y parenquimatosa en el que intervienen los linfocitos T y los anticuerpos.

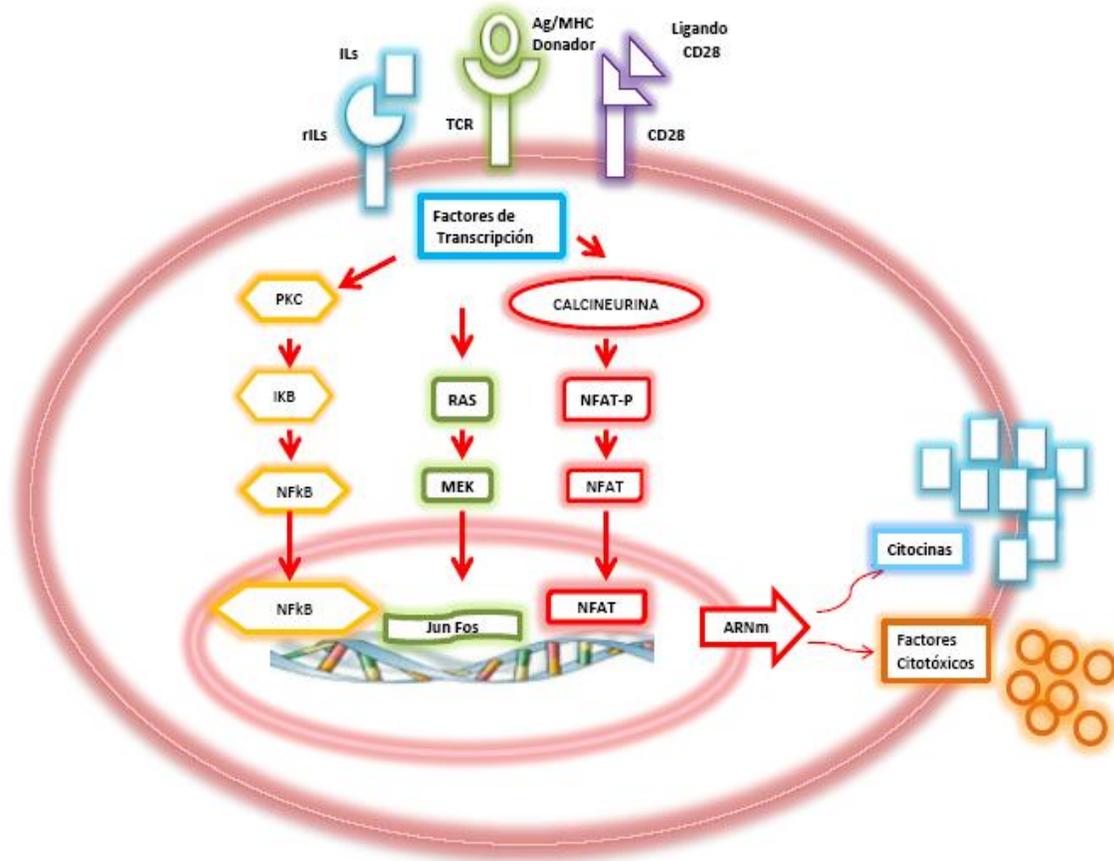
La nefropatía crónica o rechazo crónico: se distingue por fibrosis y alteraciones vasculares con pérdida de la función del injerto, los cambios se observan en arterias, túbulo, intersticio y glomérulos los cuales pueden aparecer después de episodios repetidos de rechazo agudo (12).

El mecanismo inmunológico relacionado con el rechazo del injerto se inicia por el reconocimiento del injerto a través del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) del receptor, el cual activa a los linfocitos T mediante la interacción del antígeno (HLA del donador) y el TCR del linfocito del receptor (Figura 1). Esta interacción promueve la fosforilación de la tirosina presente en la fosfolipasa C gamma, del receptor, y la hidrólisis del fosfatidil difosfato (PIP2) con la subsecuente aparición del trifosfato de inositol (IP3) y el diacilglicerol (DAG). Estas moléculas promueven el incremento del calcio y la activación de la proteínquinasa C (PKC) y dan lugar a la estimulación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), el factor activador de la proteína I (PA-1) y el factor nuclear activador de células T (NFAT), estos factores pasan al núcleo celular y se acoplan a las regiones promotoras en el DNA y promueven la producción de IL-2, IL-4 y factores citotóxicos. (Figura 1) (12, 13).

El conocimiento de los mecanismos inmunológicos del rechazo ha permitido la generación de terapias dirigidas a prevenir o revertir la actividad inmunológica contra el injerto por parte del receptor. Existen diversas estrategias terapéuticas encaminadas a la prevención del rechazo y tratar en lo posible de individualizar la terapia, las que han sido agrupadas en las siguientes tres etapas:

1. Etapa de inducción en la cual se establece la pauta profiláctica para prevenir y retrasar el rechazo agudo, en la que son administradas elevadas dosis de inmunosupresor, entre los fármacos empleados se encuentran anticuerpos antilinfocitos

poli o monoclonales, anticuerpos contra el receptor de IL-2 (CD25), esteroides, y mayores dosis de inmunosupresores de mantenimiento.



**Figura 1.** Representación esquemática de algunas de las vías de activación de linfocitos T. Modificado de Castro et al (14).

2. Etapa de mantenimiento en la que se administran dosis más bajas de inmunosupresores con respecto a la etapa de inducción. En esta fase se trata de encontrar la dosis mínima del inmunosupresor, necesaria para evitar el rechazo (eficacia) y minimizar los eventos adversos (toxicidad). Los fármacos empleados en esta etapa son:

- a) los esteroides.
- b) los antiproliferativos, azatioprina y micofenolato de mofetilo.
- c) los inhibidores mTor como sirolimus, everolimus.
- d) los inhibidores de calcineurina como la ciclosporina y el tacrolimus.

3. La etapa de tratamiento del rechazo, se caracteriza por la utilización de la inmunosupresión intensa durante un periodo corto de tiempo con el objetivo de inhibir la activación del sistema inmune una vez que hubo reconocimiento del injerto.

Ninguno de los fármacos anteriormente mencionados, por si sólo es efectivo para inhibir completamente la activación de los linfocitos T. Desde 1996 hasta la fecha, el clínico ha empleado esquemas de tratamiento que involucran más de un inmunosupresor en el tratamiento de los pacientes con trasplante (Tabla 1), los cuales han sido empleados en niños y adultos con buenos resultados en la prevención del rechazo (15-19).

<b>Tabla 1.</b> Fármacos empleados Post-Trasplante (%) (pacientes con función renal estable)									
	Era de trasplante 1996 - 2002				Era de trasplante 2003 - 2010				
	30 días	1er año	3er año	5° año	30 días	1er año	3er año	5° año	
PDN/CsA/MMF	33.6	35.3	28.4	21.8	6.6	6.9	7.1	6.2	
PDN/CsA/Aza	20.5	15.8	12.7	8.1	0.7	0.4	0.4	0.4	
PDN/CsA	11.2	5.1	4.4	4.9	1.7	1.1	0.7	2.1	
PDN/Tac/MMF	17.8	22.5	26.6	31.3	56.2	52.1	45.6	40.9	
PDN/Tac/Aza	2.2	4.5	6.1	6.6	2.1	2.4	2.6	3.7	
PDN/Tac	7.7	9.2	10.9	11.6	6.2	10.1	11.2	9.9	
Tac/MMF	0.6	1.5	2.3	3.5	14.8	12.2	12.8	14.9	
Otras combinaciones	6.4	6.2	8.6	12.3	11.9	14.8	19.7	21.9	

PDN = Prednisona, MMF = Micofenolato de mofetilo, CsA = Ciclosporina, Tac = Tacrolimus, Aza = Azatioprina. Datos tomados NAPRTCS (17).

Los inhibidores de la calcineurina, la ciclosporina y el tacrolimus, han mostrado ser básicos en el tratamiento tanto de la inducción como en el de mantenimiento del trasplante debido a que se ha comprobado gran eficacia como inhibidores de la respuesta inmune, y después de su introducción se logró mejorar la sobrevida del injerto tanto del donante vivo como del donante fallecido a 80% a 5 años (16). Sin embargo, la individualización de la dosis es complicada por el estrecho índice terapéutico y la variabilidad inter e intraindividual que presentan, lo que hace necesario el monitoreo

farmacológico constante, para su dosificación. Además, existen factores propios del individuo como el desarrollo orgánico del paciente, la presencia y naturaleza de la enfermedad existente, el sexo, el estado nutricional, la adherencia al tratamiento y la herencia genética que complican aun más la dosificación (5, 11, 15, 20, 21) .

Por otro lado, la biodisponibilidad de los inhibidores de calcineurina está relacionada con la vía de administración, las características estructurales y fisiológicas de los sitios de absorción, metabolismo y eliminación del fármaco.

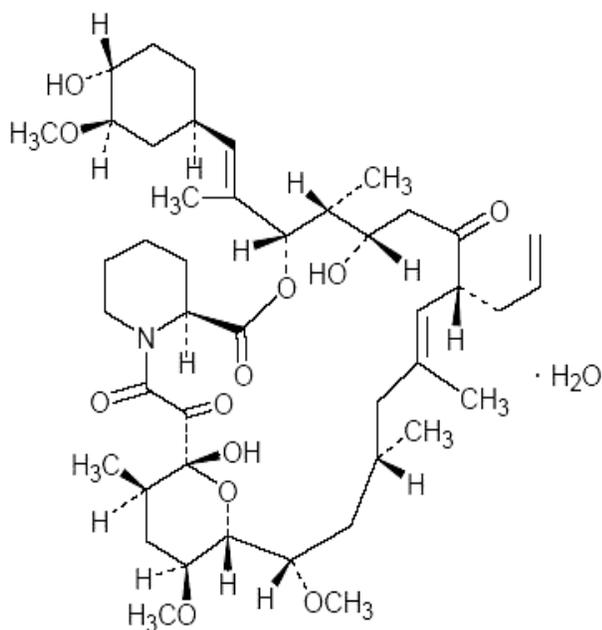
Las proteínas relacionadas con la absorción (glicoproteína-P) y el metabolismo (CYP3A) de los inhibidores de calcineurina, son expresadas genéticamente y cualquier variación en la secuencia de ADN impacta en la estructura y función de dichas proteínas, lo que explica en parte las variaciones inter e intraindividual.

El 90% de la población mexicana es mestiza, su mezcla proviene de ancestros amerindios, europeos y africanos (22). Existe evidencia de que la población mexicana difiere en la biotransformación de fármacos que dependen del CYP3A4/CYP3A5 como nifedipino (22-24), midazolam (25), ciclosporina (26), sildenafil (27), omeprazol (28) y meloxicam (29) con respecto a la población caucásica, por lo que los datos farmacocinéticos obtenidos en caucásicos no pueden ser extrapolados a la población mexicana.

## **1.2 Tacrolimus.**

### 1.2.1 Química

El tacrolimus (Tac) pertenece al grupo de los macrólidos con actividad antimicrobiana restringida, su estructura consta de un anillo de 23 carbonos, su peso molecular es de 806 g/mol, es insoluble en agua pero soluble en metanol, cloroformo y glicerol, con punto de fusión de 126 °C. Su fórmula condensada es  $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$  y su fórmula estructural es mostrada en la figura 2. Es estable por muchos meses como un polvo cristalino y por una semana a temperatura ambiente en plasma o sangre completa. Su máximo de absorbancia es a 205 nm (7, 15, 30). Este fármaco es producido por el hongo *Streptomyces tsukubaensis*, fue descubierto en 1984 en Japón (7) y aprobado por la FDA en 1994.



**Figura 2.** Fórmula estructural del tacrolimus

Se emplea como profilaxis para prevenir el rechazo del injerto de riñón, hígado, corazón, médula ósea, células de los islotes y también como tratamiento a corto y mediano plazo de la dermatitis atópica, psoriasis, artritis reumatoide, síndrome nefrótico y enfermedad de Crohn (30, 31). Está disponible en la presentación intravenosa de 5 mg/mL, en cápsulas de 1 y 5 mg para ser administrado por vía oral.

### 1.2.2 Dosis.

La dosis inicial es de 0.1 a 0.15 mg/kg/día, administrados en dos dosis al día; con esta dosificación se alcanzan concentraciones estables entre el tercer y cuarto día. El tipo de trasplante, el uso de otros inmunosupresores y el tiempo post-trasplante son factores que determinan los niveles en valle del tacrolimus que se pretenden alcanzar (31). En la siguiente tabla se muestran los niveles en valle requeridos en el trasplante renal en niños, según el tiempo post-trasplante (7).

**Tabla 2.** Niveles objetivo en valle del tacrolimus en pacientes con trasplante renal (30, 32).

Trasplante renal (mantenimiento en meses)	Niveles objetivo en valle (ng/mL)
0 a 2	10 – 25
1 a 3	7 – 20
4 a 12	5 – 15
> 12	5 -10

Tratamiento de rescate (trasplante renal)	
1 – 2 semanas	20 – 25
1 mes	15 – 20
2 meses	10 – 15
Crónicos	5 – 10

### **1.2.3 Farmacocinética.**

#### 1.2.3.1 Absorción

La absorción del tacrolimus a nivel gastrointestinal ha sido asociada con la presencia de la glicoproteína-P, del CYP3A5 y la composición de los alimentos. Se ha demostrado que alimentos con alto contenido de grasas (848 kcal y 46% de lípidos) provocan una disminución del 37% en el ABC y hasta un 77% en la Cmax. La presencia de alimentos ricos en carbohidratos (668 kcal, 85% de carbohidratos) disminuyen en un 28% el ABC y en un 65% la Cmax. Tac al ser absorbido alcanza el pico máximo en 0.5 a 2 horas, su vida media es de 8 a 19 horas (7, 30).

#### 1.2.3.2 Distribución.

Tac se distribuye en la mayoría de los tejidos incluyendo pulmón, corazón, riñón, páncreas, cerebro, músculo e hígado, y pasa a través de la placenta. En la circulación fetal se ha detectado hasta un 35% de la concentración plasmática de la madre; en la

leche materna alcanza concentraciones similares a la concentración del plasma materno (33, 34).

En la sangre, el tacrolimus se une entre el 72 y 77% a la albúmina, a la glicoproteína  $\alpha$ 1-ácida y a los eritrocitos. La distribución de Tac en sangre depende del hematocrito, la concentración de proteínas en el plasma y la concentración del fármaco (7, 34-36).

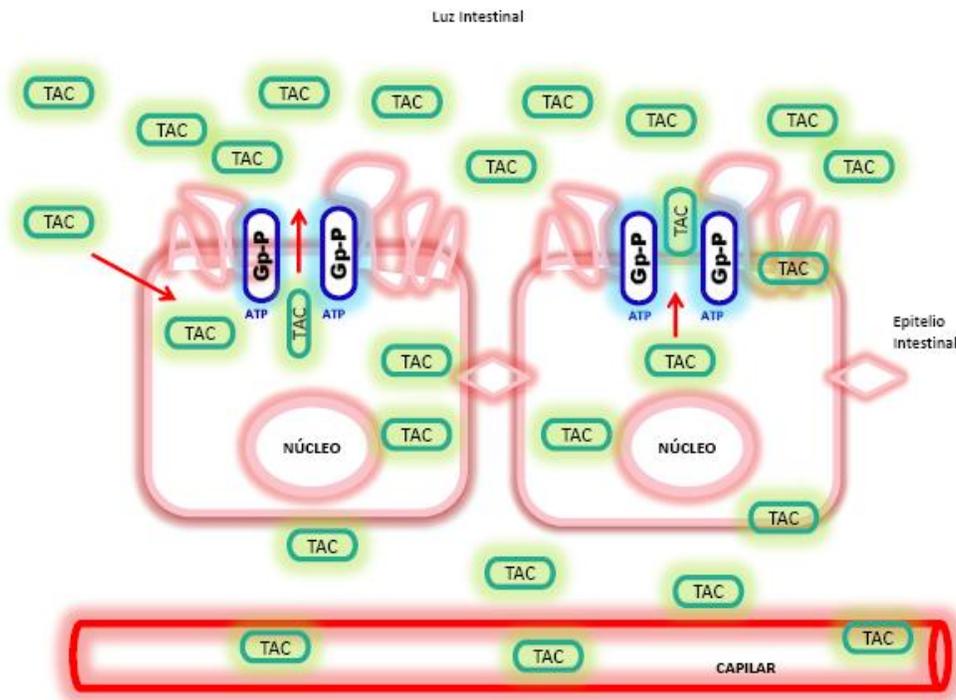
El volumen de distribución (Vd) de Tac administrado por vía intravenosa en adultos es de 1 a 1.5 L/kg, mientras que en niños es de 2.6 a 2.7 L/kg, lo que indica que en los niños el Vd es de hasta 1.8 veces más alto que en adultos (7). En pacientes pediátricos, después de una administración oral, se alcanza un Vd de 9 L/kg (7, 30).

Existe una correlación entre la concentración en sangre y el ABC, por lo que la concentración plasmática puede mejorarse a través del muestreo terapéutico. En pacientes con trasplante renal después de una dosis promedio del tacrolimus de 0.16 mg/kg/d, el ABC fue de 104 ng\*h/L mientras que en el trasplante hepático, el ABC fue de 252 ng\*h/L seguido de una dosis promedio de 0.3 mg/kg/d. Existe correlación entre el ABC y la C<sub>min</sub> posterior a la primera dosis oral del tacrolimus con un valor  $r = 0.9$  y en estado estacionario de  $r = 0.83$ , lo que sugiere que la C<sub>min</sub> de Tac es un buen indicador de la exposición sistémica (7, 33, 37).

La biodisponibilidad depende de la expresión de las isoenzimas CYP3A4, CYP3A5 que son las encargadas del metabolismo del tacrolimus tanto a nivel intestinal como hepático y la glicoproteína-P (P-gp) presente en la parte apical de diferentes células, entre las que están las intestinales; es la encargada de transportar hacia el exterior de las células una gran variedad de sustratos limitando su absorción oral (Figura 3). La función y actividad de estas proteínas varía marcadamente entre individuos y esto ha sido relacionado con la presencia de los polimorfismos presentes en los genes que codifican a CYP3A4, CYP3A5 y a la P-gp.

#### 1.2.3.3 Metabolismo (biotransformación).

El Tac es metabolizado por las isoenzimas CYP3A4 y CYP3A5, las cuales se encuentran en su mayoría en el hígado y el tracto gastrointestinal (38, 39), y se han descrito al menos 15 metabolitos. Dentro de las modificaciones estructurales que Tac experimenta ante el metabolismo de CYP3A está la O-desmetilación de los carbonos 13, 15 y 31, y la hidroxilación. El metabolito 31-O-desmetilado ha mostrado *in vitro*, un efecto inmunosupresor similar al Tac, pero se desconoce su eficacia terapéutica y/o toxicidad (40).

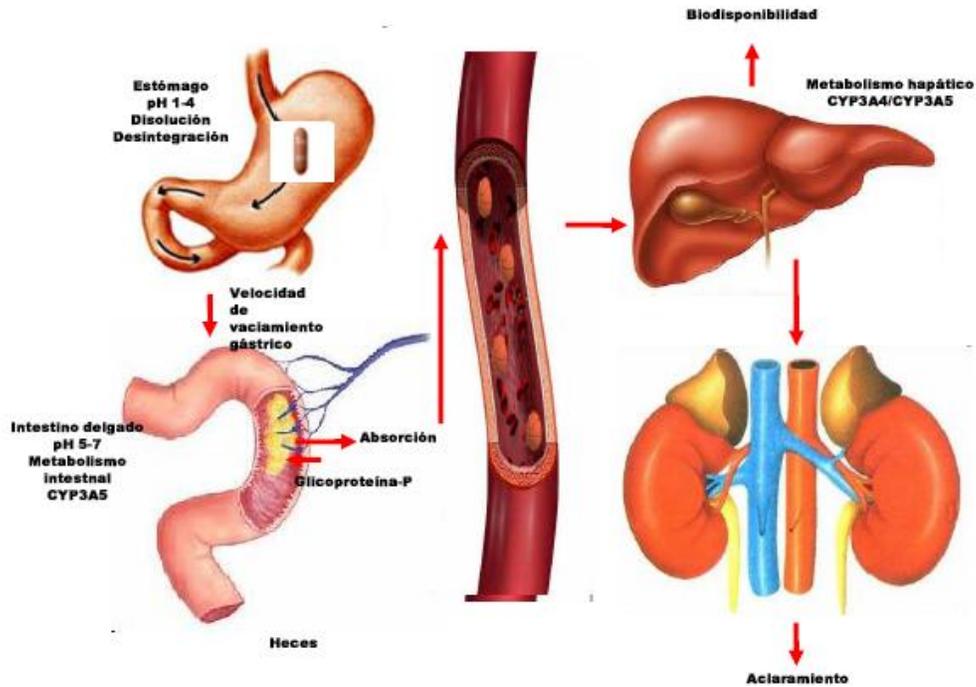


**Figura 3.** La glicoproteína-P juega un papel importante en la absorción del tacrolimus a nivel gastrointestinal. Modificado de Medicinapertutti.it (38)

#### 1.2.3.4 Eliminación.

En el hombre, más del 90% de la dosis de Tac es eliminada por vía biliar y menos del 1 % por la orina. La vida media  $T_{1/2\beta}$  de Tac en niños fue estimada en 12.4 h, similar al adulto cuyo promedio fue de 12.1 h (7, 30). El aclaramiento promedio después de una administración intravenosa de Tac fue de 0.040 L/h en voluntarios sanos, mientras que en pacientes adultos con trasplante renal fue de 0.083 L/h. En el trasplante de hígado, el aclaramiento de Tac en adultos fue de 0.053 L/hr/kg y en niños de 0.14 L/hr/kg. En el trasplante hepático con respecto al trasplante de médula ósea, el aclaramiento fue de 0.108 L/h/kg en niños mientras que en los pacientes adultos fue de 0.071 L/h/kg (7). En la figura 4 se muestra la ruta que sigue tacrolimus desde su disolución hasta su eliminación. Por otro lado, la tabla 3 resume algunos de los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus.

**Disolución y absorción gastrointestinal de fármacos**



**Figura 4.** Disolución y absorción a nivel gastrointestinal del tacrolimus. Modificado de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/artcles/775/1/vias-de-Administracion-de-Farmacos.html> (41)

**Tabla 3.** Datos farmacocinéticos del tacrolimus (15).

Disponibilidad (Oral) (%)	Excreción Urinaria (%)	Unión a proteínas del Plasma (%)	Depuración (mL*min <sup>-1</sup> *Kg)	Vol dist (L/kg)	t <sub>1/2</sub> (h)	Tmax (h)	Cmax (ng/mL) dosis de 7 mg
25±10	< 1	75 a 99	0.90 ± 0.29	0.91 ± 0.29	12 ± 5	1.4 ± 0.5	31.2 ±10.1
↔			↔ER cirr	↔ER	↔ER		
↓alimentos				↑cirr	↑cirr		

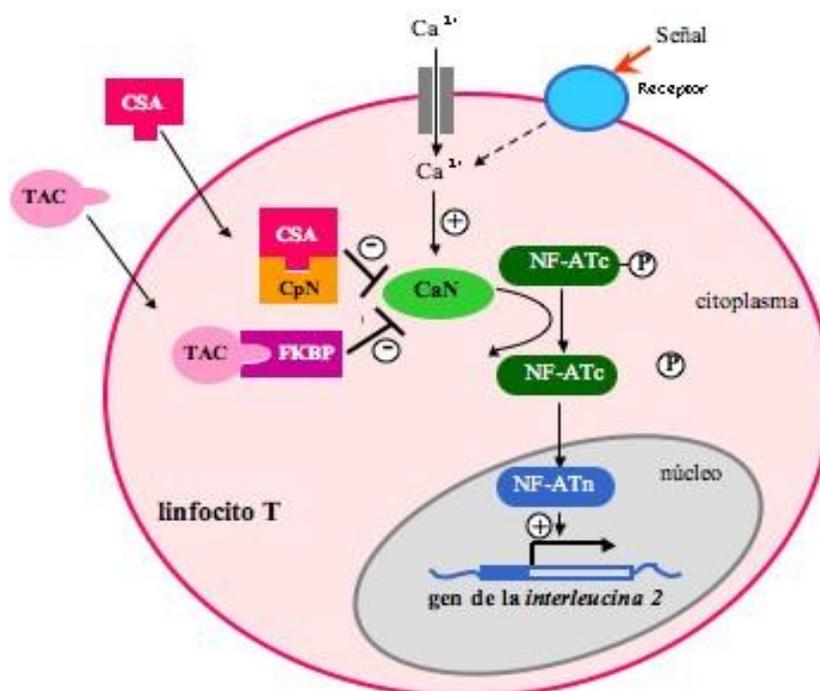
↔ equilibrio , ↑=incremento, ER=eliminación renal, cirr=circulación.

### 1.2.4 Farmacodinamia.

#### 1.2.4.1 Mecanismo de Acción.

El Tac es un potente inmunosupresor y selectivo agente antilinfocitos T, tiene un mecanismo similar a la ciclosporina mediante la inhibición de la calcineurina e impide la producción de interleucina 2 (IL-2) (7). El mecanismo inmunosupresor se inicia cuando Tac entra a la célula por difusión, ya en el citoplasma se acopla a la proteína FKBP (proteína que une a tacrolimus), este complejo se une a su vez con la calcineurina, inhibiendo la acción de desfosforilación que tiene la calcineurina sobre el factor nuclear de linfocitos T (NFAT) (12), impidiendo su traslocación al núcleo celular, por lo cual la transcripción de interleucina 2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) se ve suprimida logrando un efecto inmunosupresor (Figura 5) (42).

El tacrolimus ha mostrado una potencia 100 veces mayor que la ciclosporina, pero la inmunosupresión necesaria para prolongar la vida de los injertos conlleva una mayor predisposición a infecciones víricas y tumores asociados a los virus.



**Figura 5.** Representación esquemática del mecanismo de acción del tacrolimus. Extraída y modificada de: Stepkowski (42).

#### 1.2.4.2 Interacciones farmacológicas

La eritromicina, la claritromicina, el clotrimazol, el fluconazol, el ketoconazol, el nifedipino, el cloranfenicol, los corticoesteroides, la bromocriptina, el omeprazol, el tamoxifeno, la cimetidina, el verapamil y el jugo de toronja, promueven el metabolismo de Tac de tal modo que existe una reducción de las concentraciones sanguíneas. Los anticonvulsivantes como el fenobarbital, la fenitoína, la carbamazepina o la primidona son inductores del CYP. La coadministración de Tac con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos incrementan la nefrotoxicidad, al igual que la co-administración con los aminoglucósidos, el trimetoprim/sulfametoxazol, la anfotericina B, el aciclovir y con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (7).

#### 1.2.4.3 Efectos adversos y toxicidad

El tacrolimus presenta un estrecho índice terapéutico, al administrarse la misma dosis, a individuos con la misma edad, talla y peso, existe gran variación inter e intraindividuo, por lo que errores en la dosificación de Tac pueden llevar al paciente trasplantado al rechazo o a la presentación de toxicidad. Para evitar esto, actualmente se hace un monitoreo constante de los niveles sanguíneos.

Los eventos adversos de Tac incluyen: nefrotoxicidad, alteraciones en el metabolismo de la glucosa, hipertensión, molestias gastrointestinales, hipercalemia, infecciones por agentes oportunistas, enfermedad linfoproliferativa, hirsutismo, hipertrofia gingival, disfunción neurológica e hiperlipidemia (7, 30, 33).

#### 1.2.5 Métodos de detección del tacrolimus

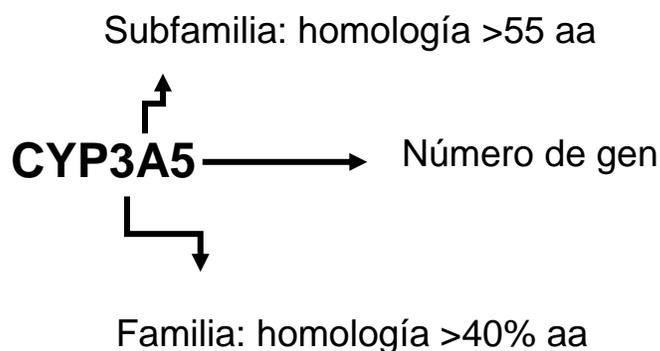
La concentración plasmática de Tac ha sido evaluada mediante inmunoensayos, métodos automatizados como el IMx y el Architect (Laboratorios Abbott), los cuales llegan a detectar hasta 2 ng/mL, la quimioluminiscencia, pero tiene la desventaja de tener un costo elevado y estos sólo detectan µg/mL. Otro método es HPLC acoplado a detectores como el UV o el de masas (43).

El Tac es estable en muestras sanguíneas almacenadas a -70 °C hasta por un año y por 2 semanas a temperaturas entre 4° a 22 °C. La detección de Tac en los fluidos corporales está limitada por su absorción.

### **1.3 Citocromo P450 y Metabolismo del tacrolimus**

La biotransformación de los fármacos para su eliminación está a cargo de las enzimas de Fase I (las cuales se encargan de reacciones de oxidación, reducción e hidroxilación) y las de Fase II (reacciones de conjugación). Dicho metabolismo se efectúa principalmente en el hígado y el intestino y en forma secundaria en la piel, pulmón, riñón, glándula mamaria y placenta.

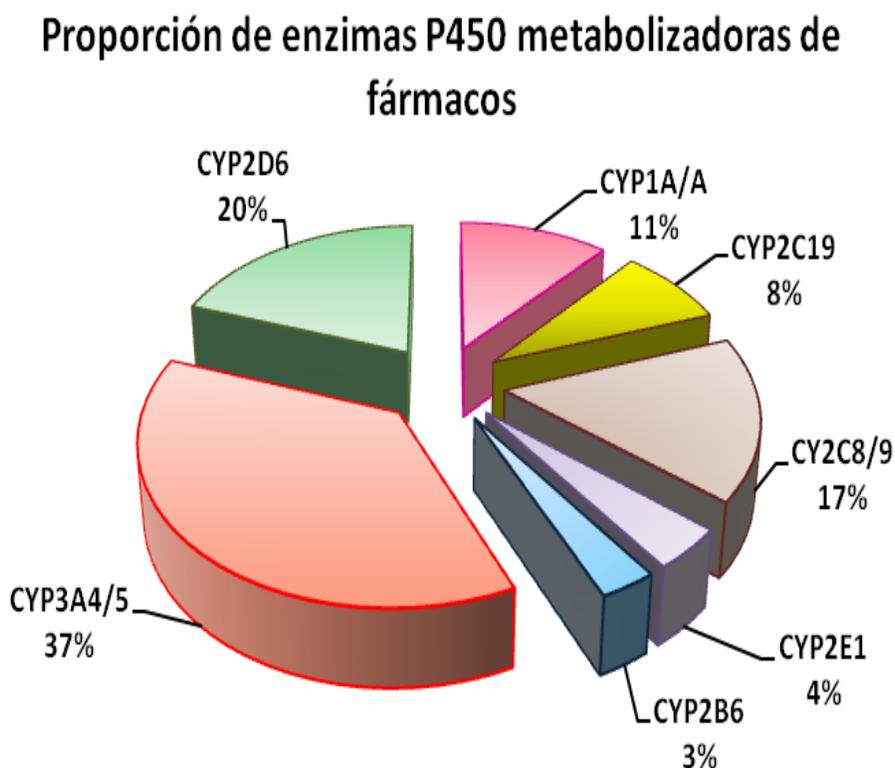
Dentro de las enzimas de fase I se encuentran el citocromo P-450 (CYP), conformado por aproximadamente 100 isoenzimas cuya estructura química contiene un grupo hemo. Las isoenzimas son agrupadas en familias, su peso molecular se aproxima a 50 KDa. En el humano se han identificado 16 familias y 29 subfamilias, con un total de 50 genes CYP identificados. Las familias son formadas por isoenzimas que tienen más del 40% de coincidencia en su secuencia de aminoácidos y son asignados con un número después de la palabra CYP (ejemplo CYP3). Las subfamilias son los conjuntos de citocromos que poseen al menos el 55 % de coincidencia en su secuencia de aminoácidos, y son designados con letras, la cual sigue al número (CYP3A), finalmente cada enzima se asigna con un número que es colocado después de la última letra (CYP3A5), a su vez el gen que le da origen recibe el mismo nombre. (Figura 6).



**Figura 6.** Nomenclatura del CYP

Las familias relacionadas con el metabolismo de fármacos son CYP1, CYP2 y CYP3, que metabolizan entre el 30 y 40 % de los medicamentos empleados en la práctica

clínica y son las encargadas de la biotransformación de xenobióticos (44). La figura 7 muestra la proporción de expresión de las isoformas del CYP presentes en el hígado. Su expresión es regulada por factores genéticos, fisiopatológicos y epigenéticos (44-46). La variabilidad genética a nivel de expresión o función de los CYPs tienen un gran efecto en la eficacia de los fármacos y en la transformación de algunos de ellos a sus especies activas.



**Figura 7.** Proporción del contenido de CYP en el hígado. Tomado de: Wrighton et al. 1992 (47).

Las diferencias en el metabolismo de fármacos pueden conducir a una severa toxicidad o daño terapéutico por la alteración en la relación entre la dosis y la concentración sanguínea del fármaco. Esto ha sido explicado en función de las modificaciones genéticas (polimorfismos) en los genes que codifican a estas proteínas, algunas variaciones son causadas por la presencia de polimorfismos en regiones no codificadoras que modifican la expresión de la proteína y/o su función (40, 48).

### 1.3.1 Subfamilia CYP3A

El metabolismo de Tac depende de la expresión hepática e intestinal de las enzimas metabolizadoras de fase I de la subfamilia CYP3A, quien es la responsable de la biotransformación del 50% de los medicamentos que se utilizan en el área clínica. Esta familia presenta cuatro isoenzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 y CYP3A47, las cuales son el producto de los genes que llevan su mismo nombre y se encuentran localizados en el cromosoma 7 (49).

El CYP3A4 es el de mayor proporción en los microsomas hepáticos, este citocromo al igual que el CYP3A5 metaboliza al tacrolimus. La variante genotípica *CYP3A4\*1B* se ha estudiado ampliamente, tiene una mayor actividad enzimática, su posible efecto ha sido discutido, pero no ha sido comprobado en todos los grupos estudiados (50, 51).

El CYP3A5 es codificado por el gen del mismo nombre, que está localizado en el cromosoma 7p21, produce un transcrito de 1720 pb producto de 13 exones, los cuales codifican para una proteína de 502 aminoácidos. Se conocen algunas variantes en las regiones intrónicas, las cuales afectan el empalme del ARN mensajero alterando la función de la proteína, entre ellas se encuentran las variantes alélicas *CYP3A5\*3* y *CYP3A5\*6*.

El *CYP3A5\*3* es uno de los polimorfismos más estudiados en relación al metabolismo de los inhibidores de calcineurina. Este polimorfismo se debe al cambio de una adenina (A) por una guanina (G) en la posición 6986 del gen (A6986G o también identificado como rs776746), lo que produce un codón de paro prematuro en el exón 3, promoviendo la producción de una proteína no funcional. Los individuos con genotipo para *CYP3A5\*1\*1* expresan la proteína funcional o normal (40, 52, 53). La variante polimórfica *CYP3A5\*3\*3* expresa una proteína corta no funcional.

Mac Phee en el 2008 reportó que el 84% de caucásicos, el 49% de asiáticos y el 15 % de negros presentaban el genotipo *CYP3A5\*3\*3* (54). Este mismo autor en un estudio realizado en el 2004 relacionó la concentración del tacrolimus en las primeras dos semanas post-trasplante con el genotipo del gen *CYP3A5* y encontró que los individuos con la variante alélica *CYP3A5\*3\*3* tuvieron altos niveles del tacrolimus comparados con aquellos con genotipo *CYP3A5\*1\*1* ó *CYP3A5\*1\*3* (55). Por otro lado, Xie en el mismo año estimó que entre el 10 al 20% de caucásicos, del 40 al 50% de asiáticos, del

60 al 70 % de hispanos y más del 80% de afro-americanos fueron expresores para la proteína CYP3A5 (56).

Los individuos homocigotos para CYP3A5\*3 con trasplante de órgano sólido, alcanzaron concentraciones hasta dos veces más de Tac que los individuos con genotipo CYP3A5\*1 (40, 57-60). Por otro lado, existen evidencias de portadores del genotipo CYP3A5\*3\*3 que requieren menores dosis de Tac sugiriendo que el genotipo puede proveer información para individualizar la dosis de Tac (40, 61, 62). Se ha reportado altas dosis ajustadas de Tac (C<sub>0</sub>h/dosis, C<sub>2</sub>h/dosis o ABC/dosis) en individuos que expresaban por lo menos un alelo CYP3A5\*1 con respecto a los individuos que presentaban el alelo CYP3A5\*3.

#### **1.4 Glicoproteína-P**

La función de muchos receptores y proteínas transportadoras localizadas en la membrana celular es regular la entrada de productos necesarios para el metabolismo de la célula y la salida de productos del metabolismo celular, entre estos transportadores se encuentra la glicoproteína-P.

Estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado que la glicoproteína-P (P-gp) disminuye la absorción a nivel intestinal y promueve la eliminación por vía renal y biliar de fármacos y xenobióticos.

La glicoproteína-P pertenece a la superfamilia de los ABC transportadores, los cuales tienen la característica de conservar dos casettes que se unen a ATP. Esta superfamilia está formada por 48 miembros, los cuales están clasificados en 8 subfamilias (A-G) basados en la similitud de su secuencia. Pueden transportar iones, azúcares, glucanos, fosfolípidos aminoácidos, péptidos, proteínas, fármacos y toxinas, que son expulsados del interior de la célula por medio de la hidrólisis del ATP (63, 64).

La glicoproteína-P es expresada en el intestino, el hígado, la membrana de las células con borde de cepillo, la membrana plasmática de las células mesangiales, las células epiteliales tubulares del asa de Henle y del túbulo colector, los linfocitos, el epitelio del plexo coroideo, los ovarios, la placenta, el tejido hematopoyético, los hepatocitos, los testículos, la barrera hematoencefálica, y en ciertas células cancerosas (34, 65).

A nivel celular, la glicoproteína se localiza en la membrana citoplasmática, el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. Es codificada en el cromosoma 7q21.1, posee 28

exones los cuales codifican para una proteína de 1280 aminoácidos con peso molecular de 170 KDa y está codificada por el gen de multiresistencia a drogas ó *MDR1(ABCB1)* que es un gen altamente polimórfico. La representación esquemática de la estructura proteica así como los exones que codifican a esta proteína se muestran en la figura 6.

Estudios realizados por Kioka et al. (66) identificaron inicialmente los polimorfismos genéticos de la glicoproteína-P en células cancerosas. Se han identificado un total de 50 SNPs (67-69), algunos de ellos localizados en regiones exónicas o regiones codificadoras y otros en regiones intrónicas no codificadoras. Estos cambios generan la sustitución de bases nitrogenadas (SNPs), lo que explica las diferencias observadas en la estructura y función de dicha proteína.

Existen en la literatura científica reportes de SNPs localizados en regiones exónicas, que han sido relacionados con un anormal plegamiento de la proteína, así como la presencia de un codón raro, marcado por un polimorfismo sinónimo, que afecta la estructura de la proteína y altera la inserción de la de la misma a la membrana (70). Los SNPs del gen *MDR1(ABCB1)* que se han estudiado ampliamente, son los presentes en exones 12 (C1236T), el 21 (G2677T/A) y el 26 (C3435T) (69, 71, 72), ya que han sido asociados con la estabilidad del ARNm y con el plegamiento de la proteína (64, 68, 73). Los polimorfismos C1236T y C3435T son mutaciones silenciosas, mientras que el polimorfismo G2677T/A en el exón 21 da como resultado el cambio de Alanina en el aminoácido 893 por Serina o Treonina que se han asociado con modificaciones en la función de la glicoproteína-P (58, 74). A su vez, se ha reportado una reducción en la acumulación de digoxina en células transfectadas con el alelo 2677T, en comparación con el silvestre 2677G, sin embargo, en voluntarios con genotipo 2677GG se observó un incremento de hasta el 40% de fexofenadina en plasma con respecto a los voluntarios con genotipo 2677TT (72).

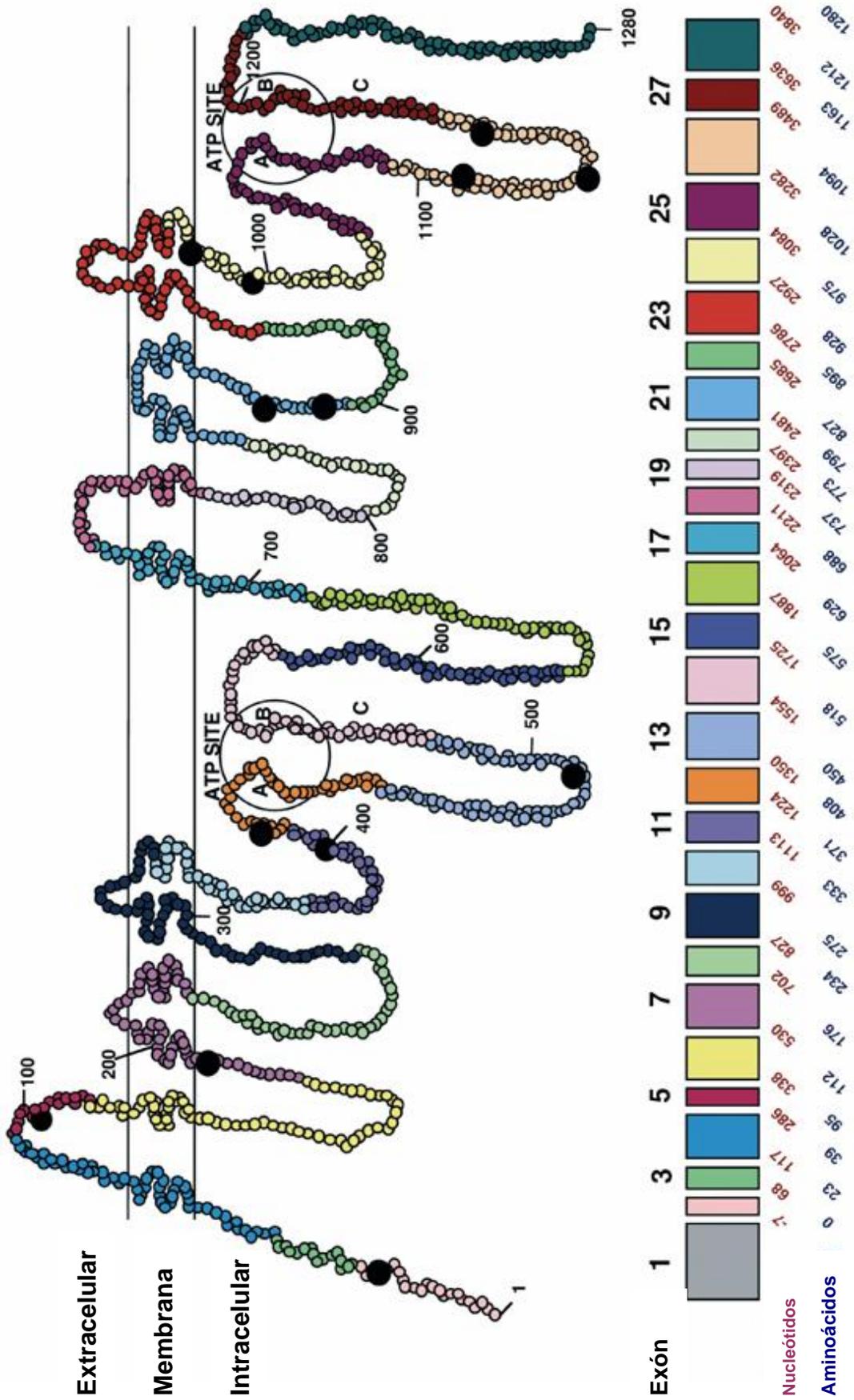


Figura 8. Diagrama que muestra los diferentes exones del gen que codifica a la glicoproteína-P. Tomado de Suresh et al. (63).

Nakamura et al. en 2002, observaron un incremento en el ARNm en biopsias duodenales de japoneses con genotipo 3435TT comparado en japoneses con genotipo 3435CT o 3435CC, lo que explica la modificación en la biodisponibilidad de algunos fármacos, además observó una disminución en la absorción de la digoxina en los sujetos con genotipo 3435TT comparado con el sujeto con genotipo 3435CC. Adicionalmente, Moriya et al. en 2002 (75), reportaron un aclaramiento de digoxina mayor en individuos con genotipo 3435TT y sujetos con aplotipo 2677TT/3435TT comparado con sujetos 3435CC y haplotipo 2677GG/3435CC. Fellay en 2002 (76) reportó que los pacientes con HIV positivo y genotipo 3435TT presentaron bajos niveles de nelfinavir con respecto a los pacientes HIV positivos con genotipo 3435CT o 3435CC. En otros estudios se ha reportado la presencia de mayor cantidad de glicoproteína-P en el intestino, la placenta y los linfocitos de individuos con genotipo 3435CT o 3435CC a diferencia de los que presentan 3435TT (69, 74).

Existen informes que asocian al polimorfismo TT con una mejor respuesta a fármacos antineoplásicos, antiepilépticos y a esteroides en niños con trasplante de corazón (58, 77, 78), mientras que el haplotipo 1236T/2677G/3435T mostró estar asociado con bajo riesgo de desarrollar la enfermedad refractaria de Crohn (79).

Sin embargo, los hallazgos sobre la asociación entre el genotipo *MDR1(ABCB1)* y la disposición de los fármacos han sido inconsistentes. En los estudios reportados por Hitzl en 2001 (80) y Drescher en 2002 (81) observaron altos niveles de ARNm en células mononucleares NK de sangre periférica CD56+ de sujetos con genotipo 3435CC comparado con sujetos 3435CT o 3435TT. Por otro lado, sujetos caucásicos con genotipo 3435TT tuvieron baja concentración de glicoproteína-P en la biopsias de tejido duodenal comparado con otros genotipos, lo cual se asoció con un bajo aclaramiento de la digoxina en sujetos con genotipo 3435TT (69).

Los acarreadores de al menos un alelo del *MDR1* silvestre (3435CC) pueden expresar grandes cantidades de ARNm para la glicoproteína-P, motivo por el cual la concentración de Tac ajustada por la dosis debe ser menor que en los individuos que expresan la variante homocigota para el gen *MDR1* (3435TT) (82). Por otro lado, Von Ahsen et al. en 2001 (83) no encontraron asociación entre la dosis ajustada a través de los niveles séricos y el polimorfismo 3435TT en pacientes con trasplante renal, mientras que Yates et al. en 2003 (84) reportaron un incremento en el aclaramiento de ciclosporina administrada por vía oral en pacientes con genotipo 3435TT comparado con los pacientes que expresaron el genotipo silvestre 3435CC. Chowbay et al. en 2003

(85) encontraron una disminución en el aclaramiento de la ciclosporina en pacientes con haplotipo 2677TT/3435TT comparado con el haplotipo silvestre en pacientes con trasplante de corazón.

Anglicheau et al. 2003 (86) encontraron alta concentración y bajo aclaramiento de Tac en pacientes con trasplante renal con el genotipo 2677TT comparado con los homocigotos silvestres. Zheng en 2002 (58) observó que los pacientes con trasplante de corazón y cuyo genotipo fue 2677TT o 2677GT mostraron mayores niveles de Tac en sangre que aquellos que presentaron el genotipo 2677GG.

## **2. Justificación**

El uso de medicamentos inmunosupresores ha permitido que la supervivencia del injerto renal sea mayor, pero la variabilidad intra e interindividual en respuesta a los fármacos hace difícil su dosificación.

Dentro de los factores que intervienen en la variabilidad de la respuesta a los fármacos se encuentran los polimorfismos en los genes que codifican las proteínas relacionadas con la absorción y el metabolismo de los medicamentos inmunosupresores.

En México, no existen estudios que relacionen la presencia de polimorfismos en los genes que codifican al *CYP3A5* y al *MDR1(ABCB1)* con la farmacocinética del tacrolimus en pacientes con trasplante renal.

El conocer la relación que existe entre el polimorfismo presente en dichas proteínas y la farmacocinética de fármacos como el tacrolimus le proporcionará al clínico una herramienta para dosificar en forma personalizada a los pacientes con trasplante renal.

## **3. Hipótesis**

Los polimorfismos de los genes que codifican la isoenzima *CYP3A5* y la glicoproteína-P se asocian con la farmacocinética y la dosis requerida para alcanzar los niveles terapéuticos del tacrolimus en pacientes pediátricos mexicanos con trasplante renal.

## **3. Objetivo General**

1. Correlacionar el perfil farmacocinético del tacrolimus con los genotipos *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)* en niños con trasplante renal.

## **4. Objetivos Particulares**

1. Determinar las frecuencias alélica y genotípicas de los genes *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)* en pacientes mexicanos con trasplante renal.
2. Asociar los genotipos *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)* con el perfil farmacocinético del tacrolimus.
3. Comparar los polimorfismos encontrados con los reportados en otras poblaciones.

## **6. Material y Métodos**

### **6.1 Primera Etapa: Estandarización**

El estudio se realizó en dos etapas: La de estandarización, consistió en establecer las condiciones óptimas para el tratamiento de las muestras, obtención de ADN y las reacciones de PCR y secuenciación. La siguiente etapa consistió en relacionar las dosis y la farmacocinética del tacrolimus con la genotipificación de los genes *CYP3A5* y *MDR1(ABCB1)*. Esta última se realizó a su vez en dos fases: una de ellas dirigida a determinar la frecuencia del genotipo *CYP3A5* en pacientes mexicanos con trasplante renal; y la segunda fase fue dirigida a relacionar la farmacocinética de Tac con los genotipos *CYP3A5* y *MDR1* en pacientes pediátricos.

#### 6.1.1 Purificación de ADN

La purificación de ADN genómico se hizo por medio del método del kit comercial QIAamp® DNA minikit (QIAGEN® Hiden, Germany, Cat. No 51306), de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

En un tubo de 1.5 mL se adicionaron 200 µL de sangre periférica, 20 µl de proteinasa K y 200 µl de buffer. La mezcla fue calentada a 56 °C por 10 min. Al término de este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 15 seg. Se adicionaron 100 µL de alcohol etílico al 100 % a cada tubo y se mezclaron en un vortex. Cada muestra fue transferida a una columna (QIAGEN DNA minikit), que se centrifugó a 8000 rpm por 1 min, la columna fue posteriormente lavada con los buffers que trae el kit y finalmente el ADN fue eluído con 100 µL de agua libre de RNAasa y DNAasa. A cada muestra de ADN se le determinó la pureza considerando como adecuada una lectura de la relación 260/280 en un intervalo entre 1.6 a 2 (ADN/proteínas), la concentración y calidad del ADN se hizo por medio de espectrofotometría (NanoDrop® ND1000 Spectofotometer). El ADN obtenido se almacenó a -70°C hasta el momento de ser utilizado.

#### 6.1.2 Diseño de Oligonucleótidos

La secuencia genómica de referencia de los genes *CYP3A5* y *MDR1* fueron consultadas en la base de datos de genes y genomas de la página de Ensembl, que se encuentra disponible en la página web (87), Las claves de identificación de estos genes

son ID: ENSG00000106258 para *CYP3A5* e ID: ENSG0000085563 para el gen *MDR1* (página revisada en el 2010).

Fueron identificadas las secuencias codificadoras de los genes *CYP3A5* y *MDR1*, las cuales se emplearon para hacer el diseño de los oligonucleótidos de cada uno de los genes, los cuales fueron empleados en la amplificación de cada fragmento de interés, mediante la reacción de PCR. El diseño y el cálculo de la temperatura media (TM) de cada uno de los primers se hizo mediante el software Primer3 input versión 0.4.0 disponible en la página web (88), la diferencia de TM entre los primers (sentido y el antisentido) para cada polimorfismo a analizar, fue de 1°C. El listado de los primers, su longitud y TM se muestran en la tabla 4. La secuenciación directa fue el método usado para la genotipificación. El secuenciador empleado fue el ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Los primers fueron reconstituidos con agua libre de DNasas y RNasas, a una concentración de 100 picomoles por mililitro (100 pmol/mL) y fueron mezclados y centrifugados a 12,000 rpm por 30 seg. Fueron mantenidos a 4 °C por 24 h y posteriormente se mezclaron y centrifugaron nuevamente y finalmente se hicieron alícuotas de 10 pM, las cuales se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su uso. Considerando la TM obtenida en el diseño de los primers, se optimizaron tanto las concentraciones de cada reactivo (MgCl<sub>2</sub>, primers, concentración de ADN, uso de adyuvantes como DMSO o glicerol) como de las condiciones de la reacción de PCR (temperatura de alineamiento y duración de las etapas en los ciclos de PCR).

### 6.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Cada una de las muestras de ADN, procedente de pacientes pediátricos con trasplante renal que asistieron a la consulta de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, fueron amplificadas tanto para la región intrónica del gen *CYP3A5*, como para los exones 12, 21 y 26 del gen *MDR1(ABCB1)*, se amplificaron mediante la técnica de PCR, se mezclaron 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, life Technologies P/N 02016b), buffer 10x (Invitrogen, P/N y 02028b), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, Cat No 18427-088), 1U de taq polimerasa (Platinum® Taq DNA Polymerase, Invitrogen Brazil), 100ng/μL, de cada uno de los primers, se colocaron 2 pM, y se ajustó a un volumen a 20 μL con agua libre

**Tabla 4.** Listado de primers sentido y antisentido de los genes CYP3A5 y MDR1.

<b>Genes</b>	<b>Longitud del primer (pb)</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Secuencia de primers</b>	<b>Longitud del Amplicón (pb)</b>
CYP3A5 (A6986G) sentido	21	57	TTATGGAGAGTGGCATAGGAG	211
CYP3A5(A6986G) antisentido	22	55	GGTTCTAGTTCATTAGGGTGTG	
MDR1(C1236T) exón 12 sentido	25	66	GCTATTCCAAGAGTGGCACAAACC	527
MDR1(C1236T) exón 12 antisentido	24	66	TCCTGTCCATCAACACTGACCTGG	
MDR1(G2677A/T) exón 21 sentido	24	55	TGAATATAGTCTCATGAAGGTGAG	394
MDR1(G2677A/T) exón 21 antisentido	24	54	ACATTCTTAGAGCATAGTAAGCAG	
MDR1(C3435T) exón 26 sentido	21	55	ACTTGGCAGTTTCAGTGTAAAG	490
MDR1(C3435T) exón 26 antisentido	20	55	GTCAGGTGATCAGGTAAAGG	

de DNAsas y RNAsas (GIBCO, UltraPure™ Invitrogen, Ref 10977-015). La concentración y el volumen de cada uno de los reactivos son mostrados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones de reacción para PCR de los genes *CYP3A5* y *MDR1*.

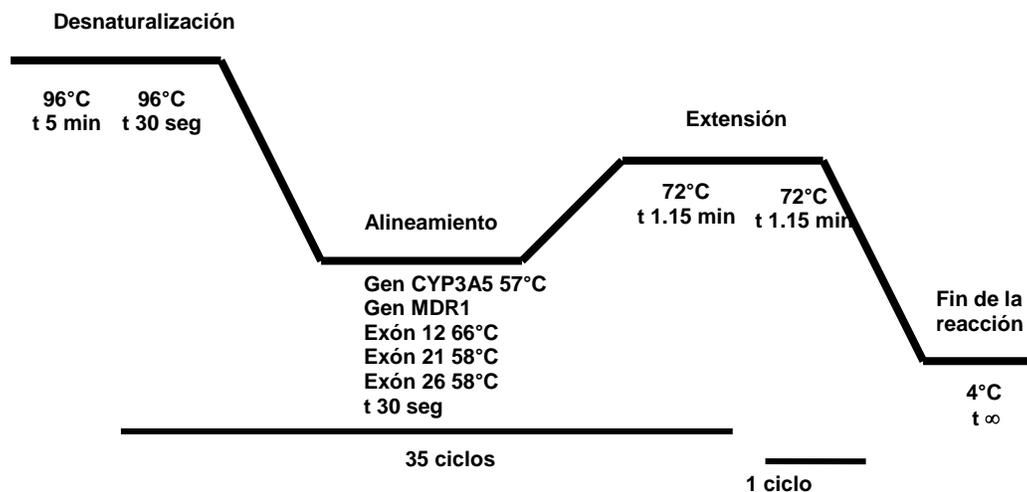
	Gen <i>CYP3A5</i> ( $\mu$ L)	Gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12 ( $\mu$ L)	Gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 21 ( $\mu$ L)	Gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 26 ( $\mu$ L)
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1.25	1.8	0.5	0.5
Buffer 10X	2.5	2	2	2
dNTPs 10mM	0.5	0.4	0.4	0.4
Taq 1U/ $\mu$ L	1	1	1	1
Primer sentido (10 pM)	0.35	0.2	0.8	0.8
Primer antisentido (10 pM)	0.35	0.2	0.8	0.8
gADN (100ng/ $\mu$ L)	1	1	1	1
H <sub>2</sub> O cbp 20 $\mu$ L	13.05	13.4	13.5	13.5

gADN: ADN genómico, cbp: cuanto baste para

La temperatura, el tiempo y el número de ciclos en el termociclador para cada una de las reacciones son mostradas en la figura 9.

Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 96 °C, alineamiento a 58 °C y extensión a 72 °C por 35 ciclos. Al finalizar la reacción de PCR, las muestras fueron centrifugadas a 12000 rpm por 15 seg.

La adecuada amplificación de cada uno de los primers fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (2 g de agarosa se disolvieron en 100 mL de TBE 1X (Ultrapure TBE, libre de RNAsas, DNAsas, Invitrogen) y se adicionó 1  $\mu$ L de bromuro de etidio). Se mezclaron 5  $\mu$ L del producto de cada ADN, con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6x DNA Loading Dye (Fermentas, R0611), Se empleó un marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas, SM0243), así mismo se colocó un control de reactivos como control negativo.



**Figura 9.** Condiciones de amplificación por PCR de los genes *CYP3A5* y *MDR1*

Las condiciones de corrimiento fueron 40 min, 500 amperios a 100 voltios. Posteriormente, el gel fue colocado en un transiluminador KODAK Gel logic 440 Imaging System para observar las bandas correspondientes a cada muestra y a cada uno de los genes de interés. Aquellas muestras que presentaron reacciones inespecíficas fueron tratadas con DMSO, se amplificaron y se hizo la electroforesis nuevamente.

#### 6.1.4 Purificación del producto de PCR para secuenciación

Con la finalidad de eliminar los dNTPS no incorporados y los primers en exceso, se mezclaron 5 µL de los productos de PCR y 2 µL de ExoSapi-it® (USB Co, P/N 78201), dicha mezcla se colocó en el termociclador por 15 min a 37°C, al cabo de este tiempo se incrementó la temperatura a 80°C por 20 min para inactivar la endonucleasa presente en el ExoSapi-it®. Al cabo de este tiempo la muestra se mantuvo a 4°C.

### 6.1.5 Reacción de Secuenciación

#### 6.1.5.1 Condiciones de la reacción de Secuenciación:

Se colocaron entre 60 a 80 ng/mL del producto de PCR ya purificado por medio de ExoSapi-it® y se les adicionó 3pM del primer sentido o antisentido de cada uno de los exones a probar, 3 µL de Big Dye (ABI Prism®BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq®FS) V.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems Forester City, CA) y se ajustó el volumen a 20 µL con agua libre de RNasa y Dnasa en tubos de PCR de 0.2 mL. Las condiciones de amplificación de los diferentes amplicones se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de temperatura y tiempo para la reacción de secuenciación.

Paso	Gene	Temperatura	Tiempo
1		95 ° C	5 min
2		95 ° C	30 seg
	<i>CYP3A5</i>	57 ° C	4 min
3	<i>MDR1</i> exón 12	66 ° C	
	<i>MDR1</i> exones 21 y 27	56 ° C	
4		4 ° C	

Los pasos 2 y 3 se repitieron por 35 ciclos, finalmente, el producto de la reacción de secuenciación fue purificado mediante columnas de Centri-Sep™(Princeton Separations Applied Biosystems Foster City, CA). Las columnas fueron preparadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las columnas de Centri-Sep™, con los productos de secuenciación fueron centrifugados a 3,000 rpm por 2 min, posteriormente los productos eluidos fueron desecados por 15 min a temperatura media en un speedvac (Savant DNA 120 speedvac, Thermo Electron Corporation).

A los tubos con las muestras desecadas se les adicionaron 15 µL de Hi-Di formamida (Applied Biosystems, P/N 4311320), se mezclaron y centrifugaron a 3000 rpm por 30 seg, se calentaron los tubos 2 min y 30 seg a 96°C para alinear el ADN obtenido en la reacción de secuenciación, al finalizar el tiempo, las muestras fueron colocadas a 4°C

hasta el momento de ser secuenciadas. El equipo que se usó para la secuenciación fue un secuenciador ABI prisma® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). El corrimiento se hizo sobre un polímero POP 6™ Performance Optimized Polymer with Template Suppression Reagent. Para el corrimiento se utilizó un capilar de 47 cm, 50- $\mu$ m.

Cada ciclo de secuenciación se hizo con una temperatura de desnaturalización alrededor de 95 °C, una temperatura de alineamiento de 56 °C, se incrementó la temperatura de 72 °C y una extensión a través de la Taq polimerasa, los primers y la incorporación de ddNTPs para finalizar la extensión.

Se determinó el polimorfismo, en cada uno de los genes de interés, mediante la comparación de los electroferogramas obtenidos en cada muestra con la secuencia consenso obtenida de la página de ENSEMBL de cada uno de los exones para *MDR1(ABCB1)* y para la región intrónica del gen *CYP3A5* y el análisis se realizó por medio del software Blast que está disponible en la web (89).

## **6.2 Segunda Etapa**

### **Primera Fase. Frecuencia del genotipo CYP3A5**

#### 6.2.1 Diseño del estudio

Se trató de un estudio transversal clínico.

#### 6.2.2 Aspectos Éticos

El estudio fue conducido de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki y la Ley Federal de Salud en Materia de Estudios Biomédicos en Humanos.

El estudio fue aprobado por los comités de Ética, Investigación y Bioseguridad.

A todos los pacientes con trasplante renal les fue solicitado su consentimiento firmado.

#### 6.2.3 Población de Estudio

Se incluyeron pacientes pediátricos y adultos con trasplante renal estable, que asistieron a la consulta externa de Nefrología en alguno de los siguientes Hospitales: Hospital Infantil de México Federico Gómez, Hospital de Cardiología Ignacio Chávez o del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ningún paciente presentó alteraciones hepáticas ni renales post-trasplante.

El financiamiento para este estudio fue proporcionado por Fondos Federales con número HIM/2008/020 y CONACYT con número 2008/COI/87327.

##### 6.2.3.1 Criterios de Inclusión

Se invitó a participar a pacientes tanto pediátricos como adultos con trasplante renal, de ambos géneros, con edad entre 3 y 72 años, cuya función renal fuera estable (sin incremento de creatinina mayor a 0.2 mg/dL, en sangre) en los tres meses previos a la toma de las muestras, cuya terapia inmunosupresora incluyera tacrolimus, contar con los niveles en valle del tacrolimus y con su consentimiento por escrito.

##### 6.2.3.2 Criterios de Exclusión

Alteraciones en el funcionamiento hepático y/o retiro del consentimiento.

##### 6.2.3.3 Criterios de Eliminación:

La terapia concomitante con ketoconazol, eritromicina, fenobarbital y/o claritromicina, fueron motivo para la eliminación del paciente en el estudio.

#### 6.2.4 Variables

Variable Independiente: Polimorfismos en el gen *CYP3A5* (rs776746) (variantes polimórficas *CYP3A5* \*1\*3 y *CYP3A5* \*3\*3).

Variables Dependientes: Dosis y niveles del tacrolimus.

#### 6.2.5 Muestras y Métodos

A cada paciente que autorizó su participación en el estudio se le tomaron 3 mL de sangre, los cuales fueron colocados en un tubo con EDTA como anticoagulante. De cada muestra de sangre se obtuvo el ADN a través de un kit comercial y al que se le determinó la concentración de ADN y la calidad del mismo. Posteriormente, cada muestra de ADN se almacenó a  $-70$  °C hasta el momento de la determinación del genotipo mediante secuenciación. Los datos de las dosis y los niveles en valle del tacrolimus a seis meses post-trasplante fueron obtenidos del expediente clínico.

#### 6.2.6 Análisis de Estadístico

La frecuencia y porcentaje de cada genotipo y su comparación con la dosis y los niveles del tacrolimus a seis meses post-trasplante entre grupos fueron evaluados por medio de las prueba Kruskal Wallis. La comparación entre pacientes pediátricos y adultos se hizo mediante la prueba U de Mann-Whitney. Se hizo la determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba  $\chi^2$ .

El análisis se realizó con los programas GradPad V.5 y SPSS V.13. Se consideró como estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ .

## **6.3 Segunda Etapa**

### **Segunda Fase. Relación de la farmacocinética y el genotipo**

#### 6.3.1 Diseño del estudio

Se trató de un estudio observacional, transversal y descriptivo en pacientes pediátricos con trasplante renal que asistieron a la consulta de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

#### 6.3.2 Aspectos Éticos

En el estudio sólo participaron pacientes pediátricos con trasplante renal que otorgaron su consentimiento por escrito y firmado por el padre o tutor, ellos conservaron una copia y tuvieron la libertad de acercarse a los investigadores en el caso del surgimiento de dudas.

El financiamiento para este estudio fue proporcionado por Fondos Federales con número HIM/2008/020 y CONACYT con número 2008/COI/87327.

#### 6.3.3 Selección de Pacientes

##### 6.3.3.1 Criterios de Inclusión

De la primera fase, se invitó a participar a los pacientes pediátricos con trasplante renal, con edad entre 3 a 18 años, de ambos géneros, cuya función renal fuera estable (sin incremento de creatinina mayor a 0.2 mg/dL en sangre) en los tres meses previos a la toma de las muestras, cuya terapia inmunosupresora incluyera tacrolimus, que contaran con el consentimiento informado firmado por los padres o tutor y asentimiento por parte del paciente.

##### 6.3.3.2 Criterios de Exclusión

Las alteraciones en el funcionamiento hepático y/o retiro del consentimiento.

##### 6.3.3.3 Criterios de Eliminación

La terapia concomitante con ketoconazol, eritromicina, fenobarbital y/o claritromicina, fueron motivo para la eliminación del paciente en el estudio.

#### 6.3.4 Variables

Variables Independientes: Polimorfismos en los genes *CYP3A5* (rs776746) (*CYP3A\*1\*1*, *CYP3A5\*1\*3* y *CYP3A5\*3\*3*) y *MDR1(ABCB1)* en los exones 12 (rs1128503) C1236T, 21(rs2032582) G2677T/A y 26 (rs1045642) C3435T

Variables Dependientes: Dosis y niveles del tacrolimus, Farmacocinética del tacrolimus ( $C_0$ ,  $ABC_{0-12h}$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ).

#### 6.3.5 Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$N = (z)^2 * p(1-p) / \delta^2 = 43$$

en donde:

$$Z=1.96, p=0.5, \delta=0.15$$

#### 6.3.6 Población de Estudio

Se incluyeron 51 pacientes pediátricos con trasplante renal estable que asistieron a la consulta externa de Nefrología del Hospital Infantil de México, los cuales no mostraron elevación de creatinina sérica, con edad entre 3 a 18 años, y de ambos géneros, en cuyo esquema de inmunosupresión se encontrara Tacrolimus, y ninguno mostró alteraciones ni hepáticas ni renales.

A cada paciente se le colocó un catéter endovenoso (BD, Ref 381223) con un adaptador Vicon (Necteur, ref 896.03) para la obtención de muestras múltiples de sangre periférica, las cuales fueron colocadas en tubos Vacutainer® con 7.2 mg de K<sub>2</sub>-EDTA (BD, Ref 367844) como anticoagulante. Al tiempo 0 (antes de la administración matutina del tacrolimus) se le tomaron 4 mL (3 mL para la farmacocinética y 1 mL para la purificación de ADN), posterior a la administración del tacrolimus se tomaron 3 mL de sangre a los tiempos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 y 12 h. Se formaron alícuotas de las muestras y se almacenaron, hasta el momento de ser analizadas, a 4°C para la extracción del ADN y a -70°C para la determinación sérica del tacrolimus. Al final de cada toma de sangre se administró 1 mL de solución fisiológica heparinizada (100 U/mL) para mantener permeable la vena.

Las niveles sanguíneos del tacrolimus, en cada punto de la farmacocinética, fueron determinados por quimioluminiscencia en un equipo Architect (Abbott-Laboratories; Abbott Park, IL, USA). Los parámetros farmacocinéticos  $C_0$ ,  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $t_{max}$ ,  $ABC$ , para

cada paciente fueron obtenidos mediante el programa WinNonlin (Phoenix 6.6.2.1.51, Pharsight A Certara™ Co).

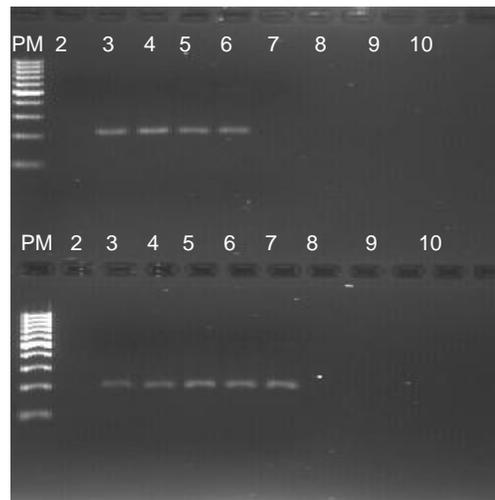
#### 6.3.7 Análisis Estadístico:

Los datos obtenidos no tuvieron un comportamiento normal, por lo cual el análisis se hizo mediante el empleo de  $\chi^2$ , U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis considerando una  $p < 0.05$  como estadísticamente significativa. El programa empleado para el análisis de los datos fue SPSS V. 13.

## 7. Resultados

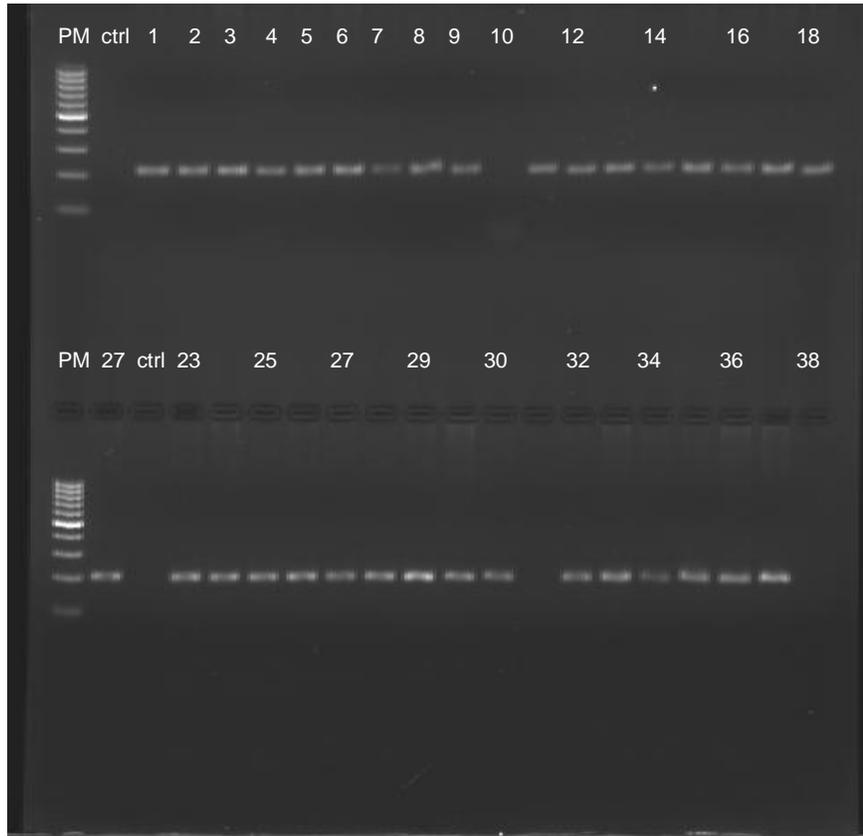
### 7.1 Primera Etapa: Estandarización

Inicialmente, para cada juego de primers se establecieron las temperaturas de reacción, la concentración de  $MgCl_2$  y el número de ciclos para la reacción de PCR. La Figura 8 muestra la electroforesis de un gradiente de cloruro de magnesio en diferentes juegos de primers.

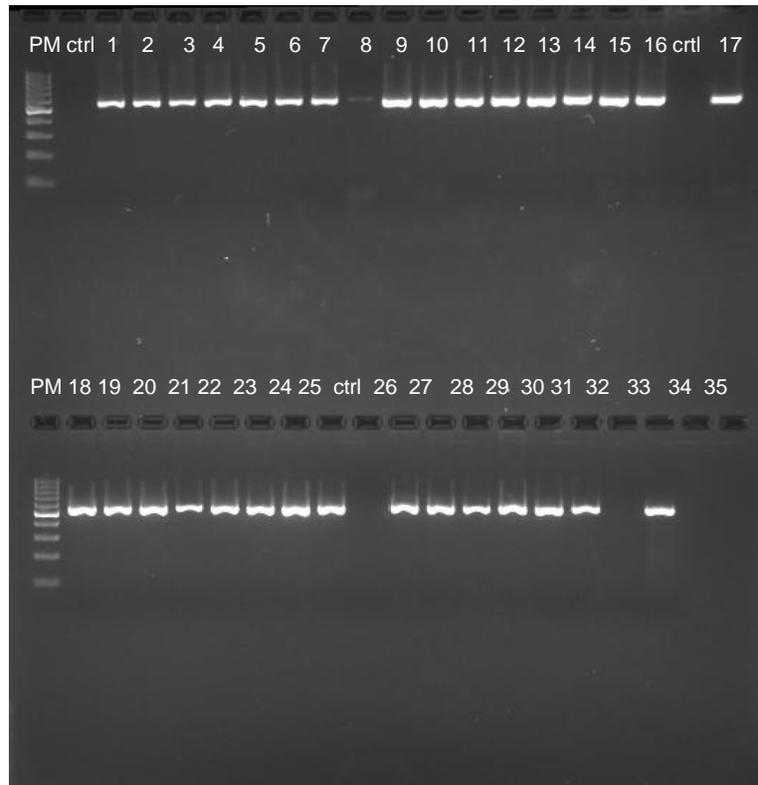


**Figura 10.** Estandarización de la concentración de  $MgCl_2$ . Carril 1 marcador de peso molecular (cada una de las bandas corresponde a 100 pb), carril 2 corresponde al control negativo. Las concentraciones de  $MgCl_2$  que se probaron fueron 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM y 3 mM, carriles del 3 al 8. El corrimiento superior corresponde a la estandarización para el polimorfismo del gen *CYP3A5* y el corrimiento inferior para uno de los polimorfismos de gen *MDR1(ABCB1)*. Las concentraciones de 1.5 (gen *CYP3A5*) y 2 mM (gen *MDR1*) de  $MgCl_2$  fueron elegidas para los primers probados.

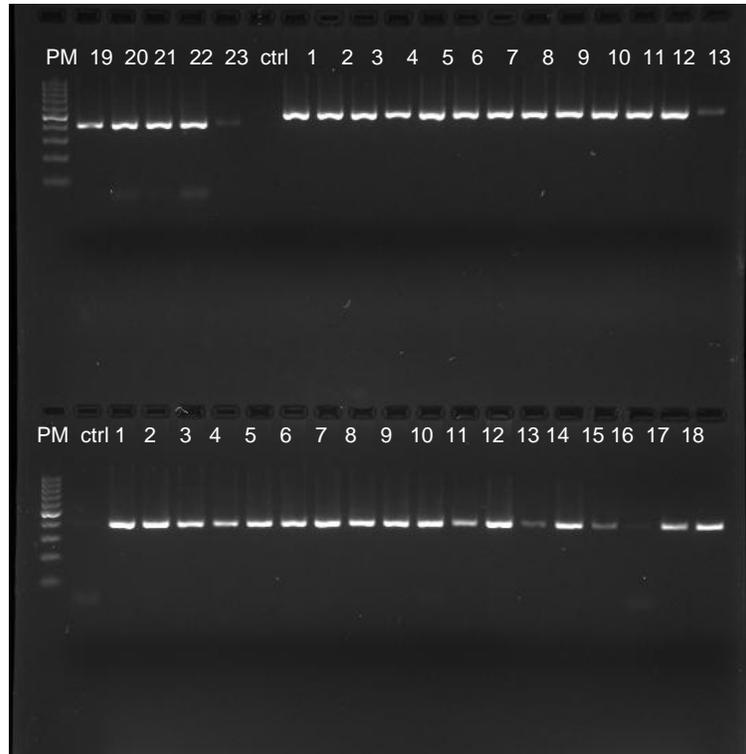
A partir de muestras de sangre de cada paciente se extrajo el ADN mediante un Kit comercial, se determinó la concentración y pureza de cada muestra. Todas las muestras de ADN fueron amplificadas para cada uno de los polimorfismos de interés por medio de PCR y empleando un juego de primers específico para cada polimorfismo. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 11, 12 y 13, la aparición de una sola banda en cada carril fue suficiente para determinar que ninguna muestra tenía contaminación.



**Figura 11.** Amplificación de la región intrónica 3 del gen *CYP3A5*. En los carriles iniciales de arriba y abajo se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb, el segundo carril de arriba y el tercero de la parte inferior muestran los controles negativos (ctrl), el resto de los carriles muestran el corrimiento de muestras de ADN de pacientes pediátricos con trasplante renal. Los números de arriba indican el número asignado a cada muestra, y están colocados en orden consecutivo. El amplicón para el gen *CYP3A5* fue de 221 pb.



**Figura 12.** Amplificación para el gen *MDR1* exón 12. En los carriles iniciales de arriba y abajo se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb, en los carriles 2 y 19 de arriba y 10 de la parte inferior se muestran los controles negativos (ctrl), el resto de los carriles muestran el corrimiento de las muestras de ADN de los pacientes pediátricos con trasplante renal, los números en la parte superior de cada carril indica el número asignado a cada muestra, están colocados en orden consecutivo. El amplicón es de 527 pb.



**Figura 13.** Amplificación del gen *MDR1(ABCB1)*. En los carriles iniciales de arriba y abajo se encuentra el marcador de peso molecular de 100 pb, el carril 7 de la parte superior y el segundo carril de la parte inferior corresponden al control negativo (ctrl). Los carriles del 1 al 6 de la parte superior y del 3 al 20 de la parte inferior corresponden al corrimiento del exón 21, el tamaño del amplicón fue de 394 pb. Los carriles del 8 al 20 en el panel superior, corresponden al exón 26. El tamaño del amplicón fue de 490 pb.

Las muestras en las que se observó la presencia de una segunda banda, sugestiva de reacción inespecífica, fueron tratadas con DMSO a una concentración final del 5 % y se repitió la reacción de PCR. En el caso de que la reacción de PCR de las muestras tratadas con DMSO, no fuera eliminada la banda inespecífica, se procedió a cortar la banda y fue purificada mediante el kit comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, Cat No. 28704).

Los amplicones obtenidos fueron tratados con ExoSapi-it® para eliminar el exceso de dNTPs, y fragmentos pequeños de DNA, posteriormente, los productos obtenidos en este tratamiento se diluyeron con agua libre de RNAsa y DNAsa a una concentración de 60 a 80 ng/μL, estos amplicones fueron empleados en la reacción de secuenciación de los genes *CYP3A5* y *MDR1*.

## 7.2 Segunda Etapa

### Primera Fase. Frecuencia del genotipo *CYP3A5*

#### DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DEL GENOTIPO *CYP3A5* EN PACIENTES MEXICANOS CON TRASPLANTE RENAL.

Se incluyeron 291 pacientes con trasplante renal, 167 fueron pediátricos y 124 adultos, la edad promedio en la población pediátrica fue de 13.2 años y en la población de adultos fue de 32 años y la fuente del injerto en su mayoría fue de donador vivo, la demografía de los pacientes se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Datos demográficos en 291 pacientes con trasplante renal

	Pediátricos n =167	Adultos n = 124	Total n = 291
<b>Género (n,%)</b>			
Femenino	77 (46%)	58 (47%)	135 (46%)
Masculino	90 (54%)	66 (53%)	156 (54%)
<b>Edad en años (media ± DS)</b>	13.2 ± 3.3	32 ± 11	21 ± 12
<b>Fuente del injerto (n,%)</b>			
Donador vivo	111 (66.5%)	96 (77%)	207 (71%)
Donador Fallecido	56 (33.5%)	28 (23%)	84 (29%)

El genotipo homocigoto *CYP3A5\*1\*1*, considerado como expresor o enzima funcional se presentó en 18 pacientes (6.2%). El genotipo heterocigoto *CYP3A5\*1\*3* se encontró en el 41.6% (121) de los pacientes analizados y el genotipo *CYP3A5\*3\*3* considerado como no expresor o enzima no funcional fue observado en el 52.2% (152 pacientes). La población mostró cumplir el Equilibrio de Hardy-Weinberg con un valor de  $\chi^2$  de 0.89, no se encontró diferencia significativa entre adultos y niños. La distribución genotípica y la frecuencia alélica se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Genotipo *CYP3A5* y frecuencia alélica en 291 pacientes mexicanos con trasplante renal.

Genotipo <i>CYP3A5</i>	Pacientes Pediátricos n = 167	Pacientes Adultos n = 124	Total n = 291
<i>CYP3A5*1*1</i> (n,%)	11 (6.6%)	7 (5.7%)	18 (6.2%)
<i>CYP3A5*1*3</i> (n,%)	68 (40.7%)	53 (42.7%)	121 (41.6%)
<i>CYP3A5*3*3</i> (n,%)	88 (52.7%)	64 (51.6%)	152 (52.2%)
Frecuencia alélica			
*1 (%)	27	27	27
*3 (%)	73	73	73

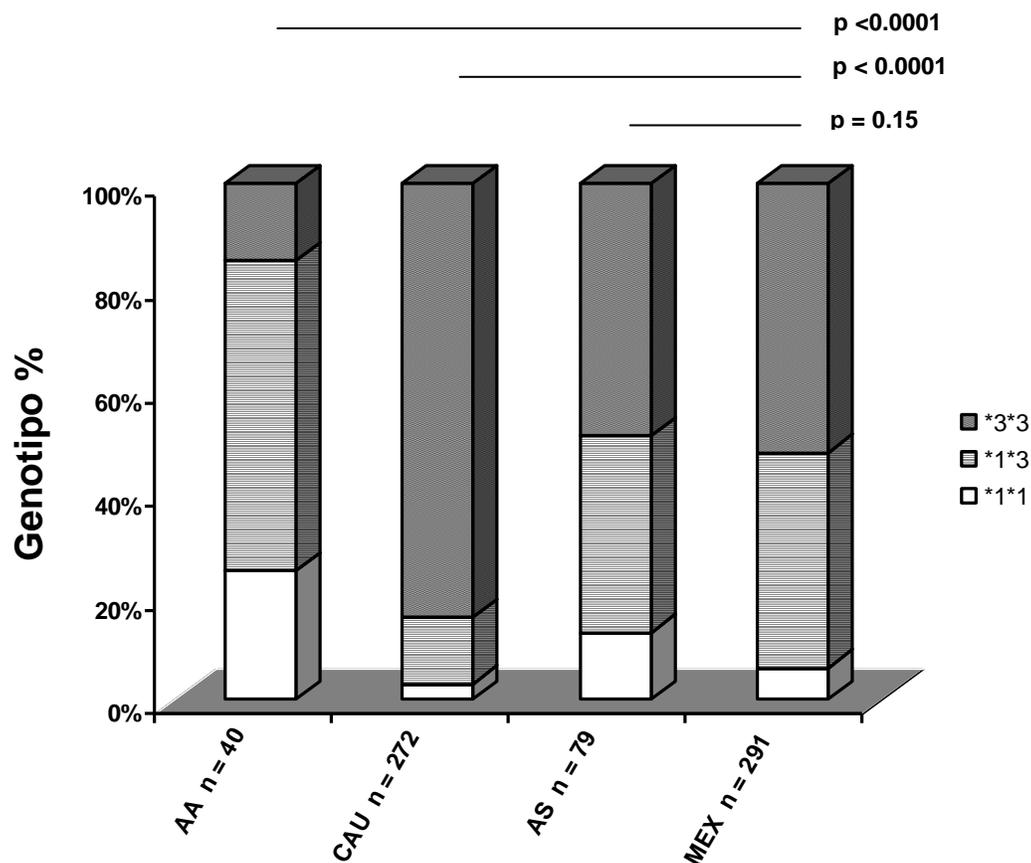
Los niveles en sangre del tacrolimus a seis meses post-trasplante fueron determinados, la dosis y los niveles fueron estratificados de acuerdo a la edad del paciente y al genotipo. Los pacientes homocigotos para el genotipo *CYP3A5\*3\*3* no expresores mostraron menores requerimientos en la dosis del tacrolimus, en forma significativa al ser comparados con los pacientes con genotipo *CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3*, considerados como expresores. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los expresores y no expresores con respecto a los niveles en valle del tacrolimus. Al comparar la dosis del tacrolimus administrada a niños y adultos tampoco se encontró diferencia significativa. Por otro lado, 114 niños (68%) y 74 adultos (59.6%) alcanzaron los niveles en valle del tacrolimus esperados de 5-10 ng/mL. Al ser comparados estos resultados no se encontró diferencia significativa entre los pacientes adultos y los pediátricos, los resultados son mostrados en la tabla 9.

**Tabla 9.** Dosis del tacrolimus en mg/kg/d para alcanzar niveles sanguíneos en valle de 5 a 10 ng/mL. Los valores muestran las medianas (percentil 25 y 75 o intervalo)

	<i>CYP3A5*1*1</i>	<i>CYP3A5*1*3</i>	<i>CYP3A5*3*3</i>	Dosis (valor de p)
<18 años	0.17 (0.17, 0.22)	0.14 (0.10, 0.29)	0.07 (0.05, 0.12)	0.0001
>18 años	0.16 (0.13, 0.23)	0.12 (0.08, 0.15)	0.07 (0.05, 0.10)	0.0001
Niveles en valle	NS	NS	NS	

NS no significativo.

Los resultados de las variantes genotípicas del gen CYP3A5 en la población mexicana se compararon con los genotipos reportados por MacPhee en el 2008, en otras poblaciones. Se encontraron diferencias significativas con los genotipos presentes en las poblaciones afroamericana y caucásica con una  $p = 0.0001$  pero no se encontró diferencia con la población asiática y la mexicana. Los resultados son mostrados en la figura 14.



**Figura 14.** Las frecuencias genotípicas del gen CYP3A5 en diferentes poblaciones. CAU caucásicos, AA afroamericanos, AS asiáticos, MEX mexicanos.

### **7.3 Segunda Etapa**

#### **Segunda Fase. Relación de la farmacocinética y el genotipo**

#### **COMPARACIÓN DE LOS GENOTIPOS CYP3A5 y MDR1 CON LA FARMACOCINÉTICA DEL TACROLIMUS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON TRASPLANTE RENAL.**

##### **Tacrolimus y gen CYP3A5**

Los datos demográficos de 51 pacientes pediátricos con trasplante renal estable se muestran en la tabla 10. Los pacientes fueron captados entre 3 a 36 meses posteriores al trasplante renal, con edad promedio de 15.2 años ( $\pm 2.8$ ), el género predominante fue el masculino (62.5%), la principal fuente del injerto correspondió a donador vivo relacionado (64.7%). Con respecto a la terapia de inmunosupresión, todos los pacientes recibieron terapia de inducción con anti CD25; todos incluyeron tacrolimus en su terapia de mantenimiento, así como micofenolato de mofetilo y sólo el 81.6% incluyó prednisona. El 47.1% de los pacientes, además de los inmunosupresores, tenía tratamiento con bloqueadores de canales de calcio.

En la figura 15 se muestran las causas de la enfermedad renal crónica terminal, que presentaron los 51 pacientes participantes. En el 54.72% de los pacientes no fue posible determinar la causa, en el 30.19 % el motivo fue de tipo hereditario, en el 9.43% la pérdida se debió a glomerulonefritis y en el 5.66% la causa fue de tipo vascular.

El primer gen secuenciado fue el CYP3A5 en la región intrónica \*3. La figura 16 muestra algunos de los electroferogramas obtenidos por la secuenciación de las 51 muestras de ADN analizados provenientes de cada paciente. Se pueden observar las curvas específicas en a) para el genotipo homocigoto silvestre \*1\*1 o AA, en b) el genotipo heterocigoto \*1\*3 o AG (a y b son considerados como expresores) y c) se muestra el genotipo homocigoto \*3\*3 o GG (considerado como no expresor).

Las frecuencias alélicas son mostradas en la tabla 11, en la que podemos observar que predominó el genotipo de no expresión \*3\* 3 en 29 pacientes (56.8%). Los genotipos considerados de expresión se encontraron en el genotipo \*1\* 1 en el 3.9% de los

pacientes y el genotipo \*1 \*3 en el 39.2%. La frecuencia alélica predominante fue la \*3 (76.5%).

**Tabla 10.** Datos demográficos de 51 pacientes pediátricos con trasplante renal.

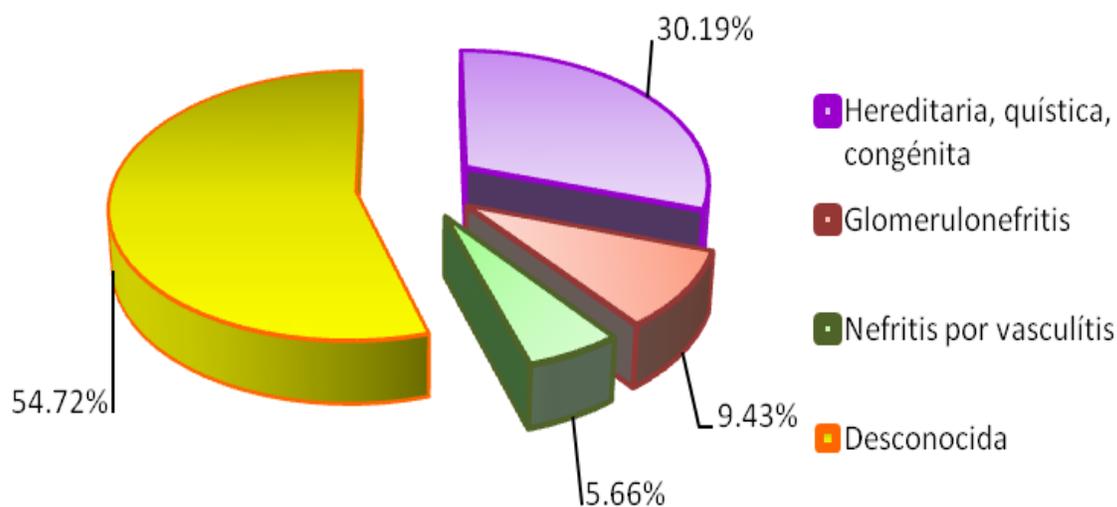
<b>Características</b>	<b>Pacientes pediátricos n = 51</b>
<b>Género n (%)</b>	
Masculino	32 (62.7)
Femenino	19 (37.3)
<b>Fuente del injerto n (%)</b>	
DVR	33 (64.7)
DF	18 (35.3)
<b>Edad (años ± DS)</b>	15.2 ± 2.8
<b>Inducción con anti CD25 n(%)</b>	51 (100)
<b>Tiempo (meses) post- trasplante (mediana, intervalo)</b>	9 (3-36)
<b>Tratamiento concomitante n (%)</b>	
Prednisona	42 (82.4)
Micofenolato de Mofetilo	51 (100)
Bloqueadores de canales de calcio	24 (47.1)

DVR: Donador Vivo Relacionado; DF: Donador Fallecido;  
DS Desviación Estándar.

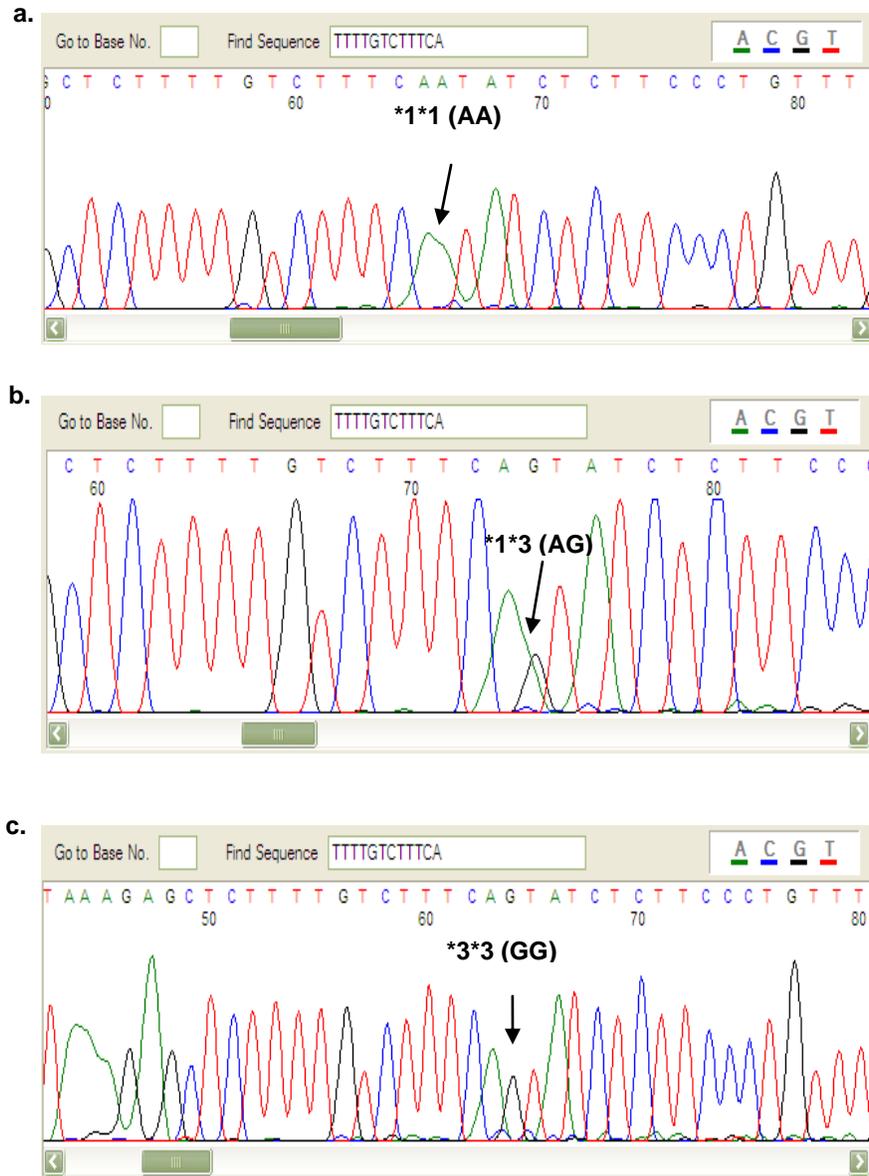
A todos los pacientes se les realizó la farmacocinética del tacrolimus en el tiempo 0 que correspondió a la muestra previa a la ingesta matutina del tacrolimus, posteriormente, los tiempos de muestreo fueron 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 h. La concentración en sangre en cada uno de los puntos fue determinada y los parámetros farmacocinéticos ( $C_{min}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/D$ ,  $t_{1/2}$ ,  $t_{max}$ ,  $ABC_{0-12h}$ ,  $ABC_{0-12h}/D$ ) se obtuvieron a través del programa WinNonLin (Phoenix 6.6.2.1.51, Pharsight A Certara™ Co).

Los 51 pacientes fueron clasificados en tres grupos de acuerdo al genotipo *CYP3A5* como expresores (genotipo \*1\*1 o \*1\*3) y no expresores (genotipo \*3\*3). Se hizo la comparación entre los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus y los tres grupos formados en base al genotipo, los resultados se muestran en la tabla 12.

### Causas de la Enfermedad Renal Crónica Terminal (ERCT)



**Figura 15.** Proporción de las causas de la pérdida de los riñones nativos en los 51 pacientes participantes.



**Figura 16.** Electroferogramas del polimorfismo intrónico 3 del gen *CYP3A5*. En a se muestra el genotipo *CYP3A5*\*1\*1 (AA), en b el genotipo *CYP3A5*\*1\*3 (AG), y en c el genotipo *CYP3A5* \*3\*3 (GG).

**Tabla 11.** Frecuencia de genotipo y alelos del gen *CYP3A5* en 51 niños

<b>Genotipo <i>CYP3A5</i></b>	<b>Pacientes Pediátricos n = 51</b>
*1*1 (n %)	2 (3.9)
*1*3 (n %)	20 (39.2)
*3*3 (n%)	29 (56.8)
Frecuencia Alélica	
*1 (%)	23.5
*3 (%)	76.5

Los pacientes con genotipo \*3\*3 requirieron hasta 2.5 veces menos dosis del tacrolimus que los grupos con genotipo \*1\*1 y \*1\*3. Estos pacientes llegaron a alcanzar concentraciones máximas de hasta 0.8 veces mayor que los del grupo \*1\*1 pero menor en 1.36 veces que el grupo \*1\*3. Los pacientes con genotipo de expresores (\*1\*1 y \*1\*3) tuvieron una menor exposición al tacrolimus a lo largo del tiempo, esto mostrado por los valores bajos en el ABC/D, además estos pacientes exhibieron un mayor aclaramiento que los pacientes del grupo \*3\*3, esas diferencias fueron estadísticamente significativas (Tabla 12). Los niveles en valle, el tiempo de vida media y el tiempo en alcanzar la concentración máxima no fueron diferentes entre los tres grupos.

**Tabla 12.** Farmacocinética del tacrolimus y genotipo CYP3A5 en niños con trasplante renal (n=51). Valores de mediana (intervalo)

Parámetros Farmacocinéticos Gen CYP3A5	CYP3A5*1*1 (Expresan) n (%)	CYP3A5*1*3 (Expresan) n (%)	CYP3A5*3*3 (No expresan) n (%)	Expresan vs No expresan. Valor de p
Dosis (mg/kg/d)	0.15 (0.13-0.18)	0.13 (0.06-0.25)	0.06 (0.02-0.16)	0.0001
C <sub>min</sub> (ng/mL)	3.9 (3.8-4.0)	5.3 (2.5-7.91)	5.3 (1.7-13.7)	0.368
C <sub>max</sub> (ng/mL)	11.3 (5.8-16.8)	19.1 (6.3-33.6)	14 (3.3-59.8)	0.017
C <sub>max</sub> /D (ng*mL/mg*kg*d)	80.7 (32.2-129.2)	149.7 (48.5-560)	253.3 (29.2-910)	0.045
t <sub>1/2</sub> (h)	12.3 (10.3-14.3)	10.2 (5.7-17.9)	12.7 (2.9-31.9)	0.200
t <sub>max</sub> (h)	1.5 (1-2)	1 (1-2)	2 (0-8)	0.441
ABC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	76.2 (59.6-92.9)	112.2 (52.7-269)	106.8 (29.8-269)	0.310
ABC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	537.3 (337.5- 737.1)	848.7 (362-2257)	1918.6 (294-6525)	0.001
ABC <sub>0-∞</sub> (h*ng/mL)	145.3 (138-152.1)	171.4 104-759.6)	224.5 (47.4-604.1)	0.477
ABC <sub>0-∞</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	994.4(781.7-1207.2)	1337 (572.7-051.3)	3758 (709.6-7821.9)	0.001
CL (L/h)	0.527 (0.41-0.64)	0.374 (0.08-0.87)	0.133 (0.03-0.70)	0.001

Mediana (intervalo). Se hizo la comparación entre los tres grupos a través de la prueba de Kruskal-Wallis. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

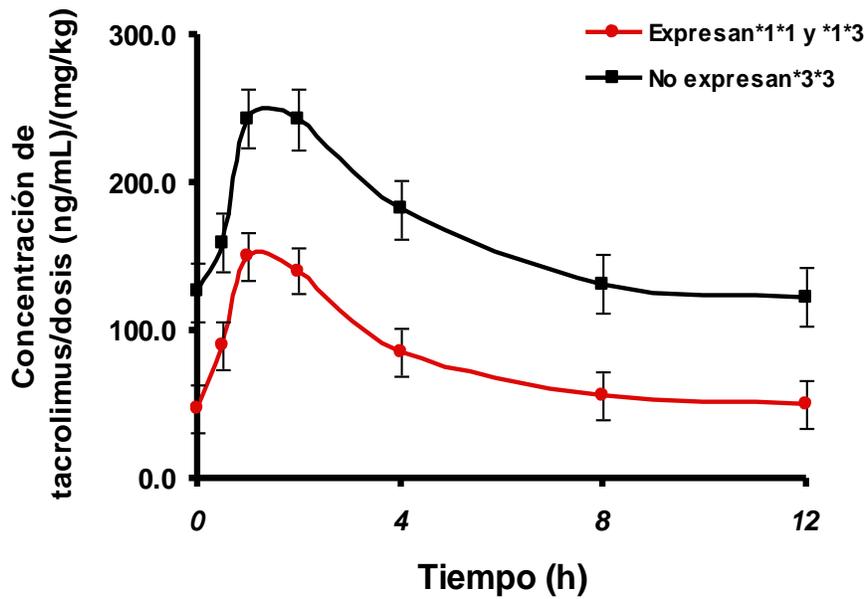
La concentración del tacrolimus normalizada por la dosis a lo largo de 12 h de muestreo, en los grupos cuyo genotipo correspondía a \*1 \*1 y \*1\* \*3 fue menor que la mostrada en los pacientes con genotipo \*3\*3, esta diferencia fue estadísticamente significativa con una  $p = 0.045$ . Los datos son mostrados en la figura 17.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó para la variante polimórfica del gen *CYP3A5*, dicho cálculo se realizó a través de la pagina web (90). Los resultados se muestran en la tabla 13. Nuestra población de estudio se encontró en equilibrio para el polimorfismo en el gen *CYP3A5*.

Al tomar en consideración los datos de los genotipos encontradas en los 51 pacientes se relacionó la frecuencia de rechazo agudo, la presentación de hipertensión a un año de seguimiento y la variación en el volumen de filtración glomerular. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de los que expresan *CYP3A5* (\*1\*1 y \*1\*3) y los que no lo expresan (\*3\*3). Los datos son mostrados en la tabla 14. Sin embargo, se puede observar que existe una tendencia de la presentación de rechazo en los pacientes que expresan *CYP3A5*, a diferencia de los que no lo expresan.

En el seguimiento de los niveles en valle según el genotipo se encontró diferencia significativa al mes y a los 12 meses post-trasplante ( $p = 0.01$  y  $p = 0.04$ ). Al analizar los niveles en valle a los 3 y 6 meses post-trasplante no se encontró diferencia significativa ( $p = 0.14$  y  $p = 0.86$ , respectivamente). Los datos se muestran en la tabla 15.

Los resultados obtenidos en este estudio fueron comparados con los resultados reportados en otras poblaciones por MacPhee y Holt en 2008. Como se puede observar en la figura 16, las frecuencias alélicas de la población mexicana son estadísticamente diferentes a las poblaciones afroamericana y caucásica con una  $p = 0.01$  pero no difiere en las frecuencias alélicas presentes en la población asiática.



**Figura 17.** Curva de concentración del tacrolimus versus tiempo según el genotipo de *CYP3A5* en 51 niños con trasplante renal.

**Tabla 13.** Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg, para el genotipo *CYP3A5*.

Genotipo <i>CYP3A5</i>	Valor esperado	Valor observado	Frecuencia alélica p	Frecuencia alélica q	Valor de $\chi^2$
*1*1	2.82	2			
*1*3	18.35	20	0.24	0.76	0.41
*3*3	29.82	29			

< menor que, > mayor que, = igual que

p calculada = 0.41 < p tablas = 3.84

**Tabla 14.** Relación entre el genotipo *CYP3A5* y la presentación de rechazo agudo, la hipertensión arterial y la velocidad de filtración glomerular a doce meses post-trasplante

	<i>CYP3A5</i> *1*1	<i>CYP3A5</i> *3*3	Valor de p
	<i>CYP3A5</i> *1*3		
	Expresan n = 22	No Expresan n = 29	
Pacientes con rechazo agudo n(%)	12 (57.1%)	8 (27.6%)	0.08
HTA post-trasplante n (%)	16 (72.2%)	19 (65.5%)	0.76
VFG (mL/min/1.73m <sup>2</sup> sc) promedio ±DS	81.5 ± 4	81.9 ± 4.6	0.95

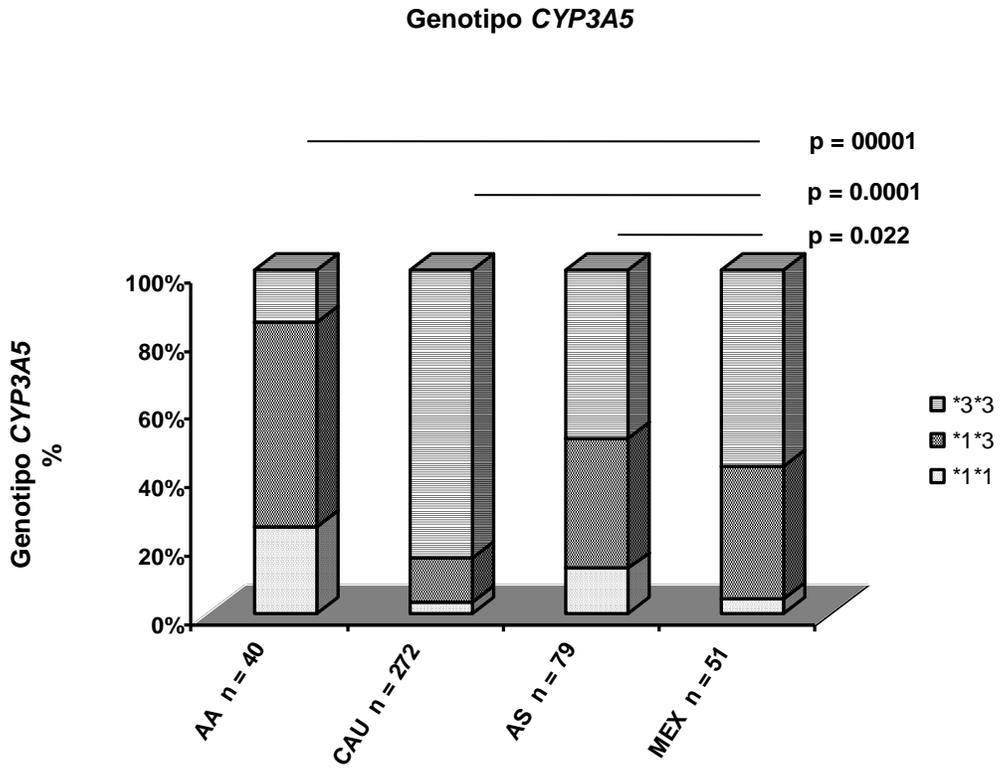
DS: desviación estándar

**Tabla 15.** Seguimiento de los niveles en valle del tacrolimus post-trasplante según el genotipo *CYP3A5*

Tiempo en meses post-trasplante renal	<i>CYP3A5</i> *1*1	<i>CYP3A5</i> *3*3	Valor de p
	<i>CYP3A5</i> *1*3		
	(expresan)	(no expresan)	
1	6.9 ± 3.2	9.4 ± 3.0	0.01
3	5.9 ± 1.9	6.9 ± 2.6	0.14
6	6.4 ± 4.0	6.6 ± 2.1	0.86
12	5.5 ± 2.8	7.3 ± 3.0	0.04

Los resultados son mostrados como media ± DS

Las frecuencias encontradas de las variantes polimórficas en el gen *CYP3A5* en la población mexicana difiere significativamente de las frecuencias polimórficas encontradas en otras poblaciones (Figura 18).

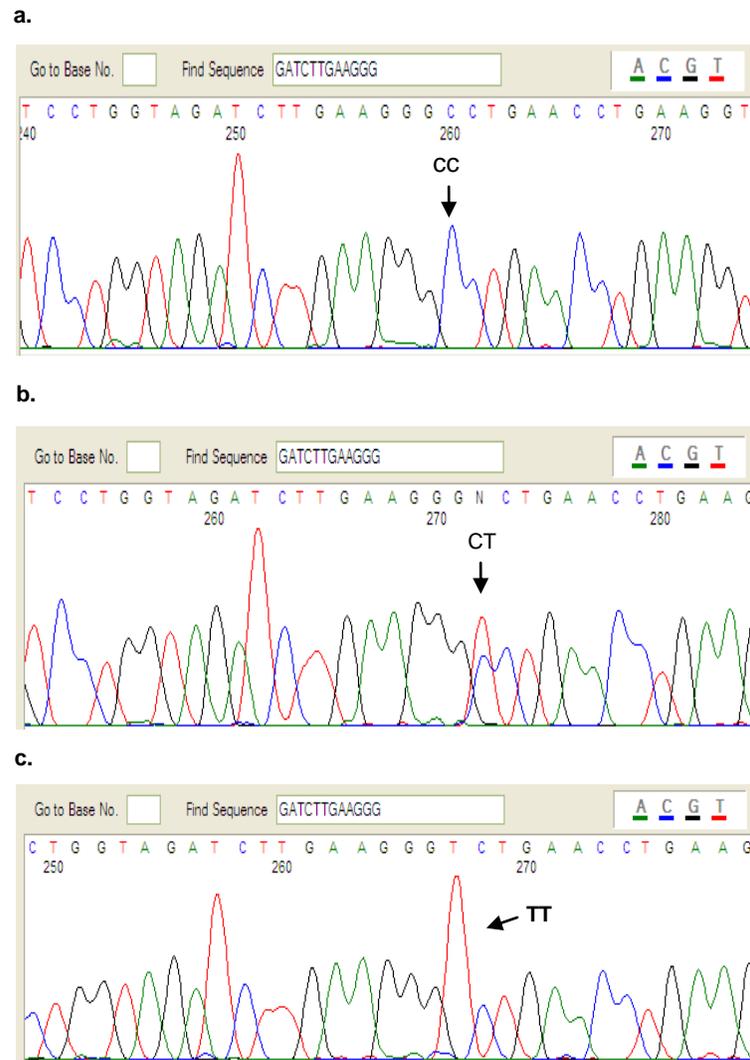


**Figura 18.** Proporción del polimorfismo CYP3A5 en diferentes poblaciones. Los datos de las poblaciones caucásicas (CAU), afroamericanas (AA) y asiáticas (AS) fueron tomados de: Mac Phee y Holt 2008 (54).

## Segunda Fase

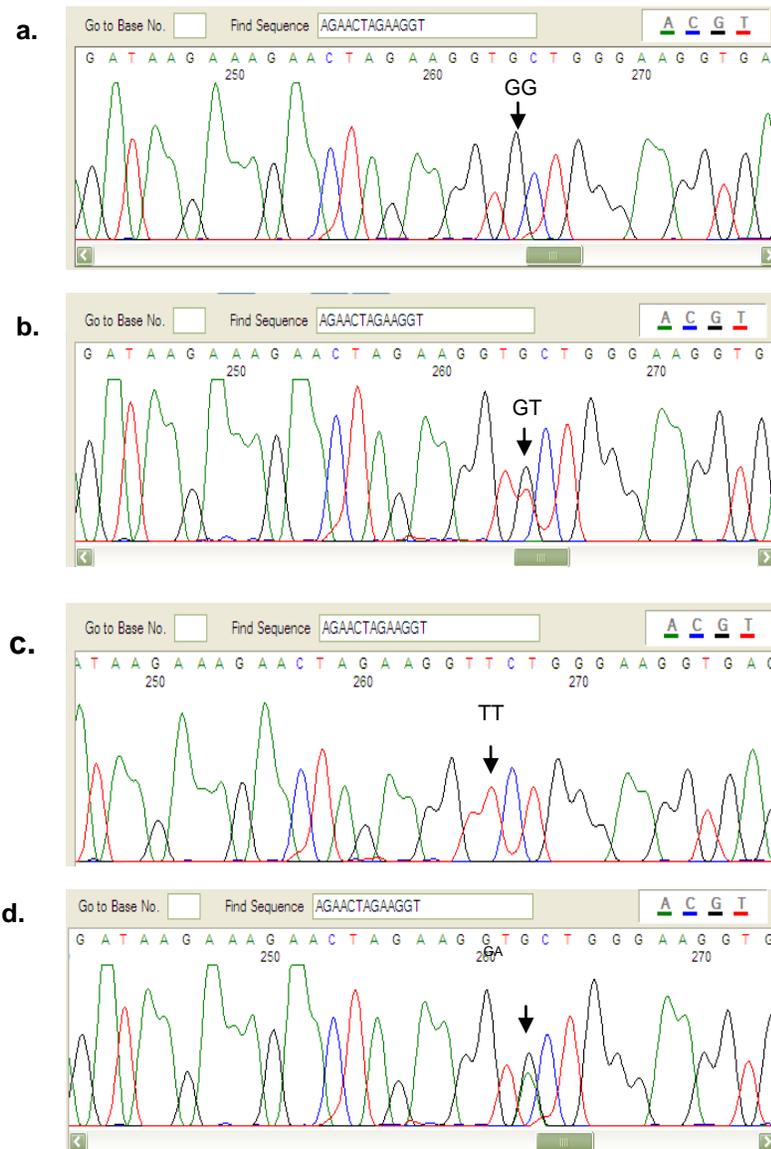
### Tacrolimus y gen *MDR1(ABCB1)*

En la figura 19 se muestran algunos electroferogramas obtenidos en los 51 pacientes con trasplante renal en donde se observan las variantes polimórficas del exón 12. En a) se muestra el polimorfismo homocigoto CC (silvestre), en b) el polimorfismo heterocigoto CT y en c) se muestra el polimorfismo para TT.



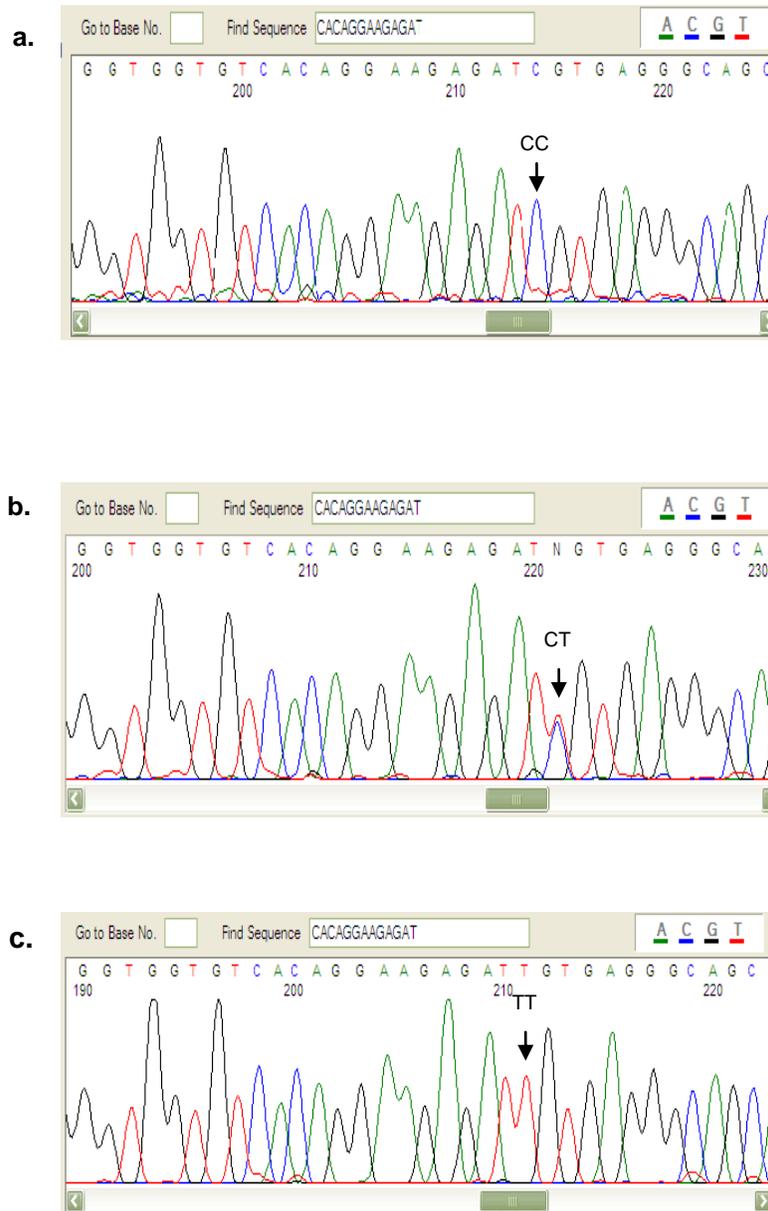
**Figura 19.** Electroferogramas de los polimorfismos encontrados en el exón 12 del gen *MDR1*.

En la Figura 20 se presentan algunos de los 51 electroferogramas obtenidos de los niños con trasplante renal. Las variantes polimórficas corresponden al exón 21 del *MDR1*. En a) se muestra el polimorfismo homocigoto GG (silvestre), en b) se observa GT, c) la variante TT y en d) la variante GA.



**Figura 20.** Electroferogramas de los polimorfismos presentes en el gen *MDR1(ABCB1)* exón 21.

En la Figura 21 están representados algunos electroferogramas en donde se ejemplifican polimorfismos encontrados en las muestras de 51 pacientes estudiados para el gen *MDR1(ABCB1)* exón 26 en a) se muestra la variante CC (silvestre), en b) el polimorfismo heterocigoto CT y en c) el polimorfismo TT.



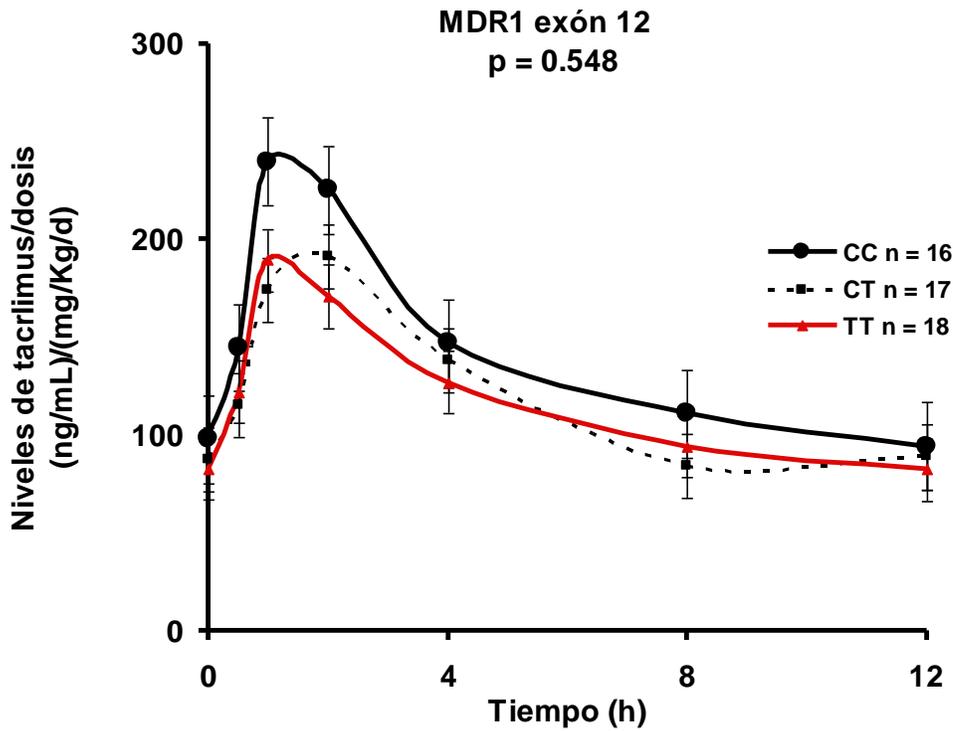
**Figura 21.** Electroferogramas de los polimorfismos en el gen *MDR1(ABCB1)* exón 26.

Las frecuencias alélicas para los exones 12, 21 y 26 del gen *MDR1(ABCB1)* que codifica a la glicoproteína-P en los pacientes participantes se muestran en la tabla 16. La variante alélica del exón 12 más frecuente fue la T con el 52%, en la variante alélica del exón 21 fue la G con el 53.9% y en el caso del exón 26 fue la T con el 53%.

**Tabla 16.** Frecuencias alélicas del gen *MDR1(ABCB1)* exones12, 21 y 26 en 51 niños con trasplante renal.

Genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i>	Variante Alélica	Genotipo n(%)	Frecuencia alélica
Exón 12	CC	16 (31.4)	C 48% T 52%
	CT	17 (33.3)	
	TT	18 (35.3)	
Exón 21	GG	18 (35.3)	G 53.9% A 7.8% T 38.2%
	GA	4 (7.8)	
	GT	15 (29.4)	
	TT	10 (19.6)	
	TA	4 (7.8)	
Exón 26	CC	13 (25.5)	C 47% T 53 %
	CT	22 (43.1)	
	TT	16 (31.4)	

Los polimorfismos CC (silvestre), CT (heterocigoto) y TT (mutante) del gen que codifica a la glicoproteína-P fueron encontrados en los pacientes participantes. En la Figura 22 se presentan los niveles sanguíneos del tacrolimus, en cada uno de los polimorfismos encontrados en el exón 12, con respecto al tiempo. No se encontraron diferencias significativas en la concentración sanguínea del tacrolimus entre los tres grupos formados al genotipificar el exón 12 en los 51 pacientes ( $p = 0.548$ ).



**Figura 22.** Curva de concentración del tacrolimus contra tiempo de acuerdo al genotipo *MDR1(ABCB1)* exón 12.

La distribución de los genotipos para el exón 12, encontrados en los pacientes participantes, no cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, los resultados del análisis se muestran en la Tabla 17. El análisis se hizo a través de la página web (90) y el resultado obtenido fue de 5.63 que es un resultado mayor al esperado de 3.84.

**Tabla 17.** Equilibrio Hardy-Weinberg (91) para *MDR1(ABCB1)* exón 12 en 51 pacientes pediátricos con trasplante renal.

Genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12	Valor esperado	Valor observado	Frecuencia alélica P	Frecuencia alélica q	Valor de $\chi^2$
CC	11.8	16			
CT	25.5	17	0.48	0.52	5.63
TT	13.8	18			

p = frecuencia del alelo silvestre determinada experimentalmente.

q = frecuencia de la variante mutante determinada experimentalmente.

p calculada = 5.63 > p tablas = 3.84

No hay equilibrio de Hardy-Weinberg

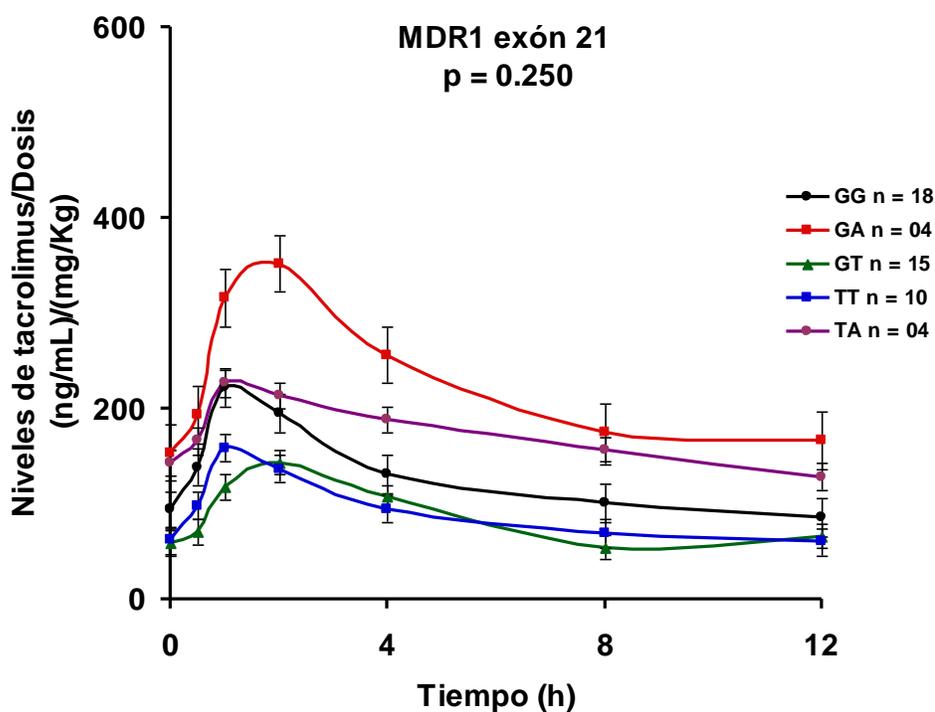
La Tabla 18 resume los resultados obtenidos de la influencia de las variantes polimórficas encontradas en el exón 12 de la glicoproteína-P y la farmacocinética del tacrolimus. Los pacientes con genotipo CC requirieron menor dosis del tacrolimus, así mismo, estos pacientes mostraron un menor aclaramiento, pero mayor  $C_{max}$  y ABC con respecto a los genotipos CT y TT. Al ser analizados los datos, ninguno de los grupos presentó diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 18.** Farmacocinética del tacrolimus y genotipo *MDR1* exón 12 en 51 niños. Valores mediana (intervalo).

Parámetros Farmacocinéticos	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)	Valor de p
Gen <i>MDR1</i> exón 12	16(31.4)	17(33.3)	18(35.3)	
Dosis (mg/kg/d)	0.07 (0.03-0.14)	0.09 (0.02-0.25)	0.09 (0.02-0.21)	0.666
C <sub>min</sub> (ng/mL)	5.5 (1.7-13.7)	5.2 (2.5-8.6)	4.9 (2.2-9.4)	0.805
C <sub>max</sub> (ng/mL)	17.4 (3.3-59.8)	14.4 (5.8-32.4)	14.2 (3.5-33.6)	0.522
C <sub>max</sub> /D (ng*mL/mg*kg*d)	246.6 (33.6-910)	152.8 (32.2-430)	217.2 (29.2-560)	0.548
t <sub>½</sub> (h)	11.2 (4.7-19.1)	10.4 (5.7-31.9)	11.7 (2.9-24.7)	0.882
t <sub>max</sub> (h)	1.5 (1-2)	1 (0-4)	2 (1-8)	0.138
ABC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	113 (29.8-221.2)	105.2 (52.7-198)	99.6 (36.6-269)	0.860
ABC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	1564.8(305.9-6525)	1257.9(337.5-3782)	1169.3(293.8-4680)	0.872
ABC <sub>0-∞</sub> (h*ng/mL)	192.9 (47.4-604.1)	224.5 (104-326.6)	159.4 (110-759.6)	0.827
ABC <sub>0-∞</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	2583 (709.6-17821)	2821 (573-11349)	2129.3 (922-11789)	0.987
CL (L/h)	0.193 (0.03-0.700)	0.177 (0.04- 830)	0.235 (0.04-0.540)	0.987

Se hizo la comparación entre los tres grupos formados, no mostraron diferencia entre los grupos analizados. El análisis se hizo por medio de la prueba de Kruskal-Wallis.

Con respecto al exón 21, los polimorfismos encontrados fueron GG, GA, GT, TT y TA. Estos polimorfismos se analizaron junto con los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus. Como se muestra en la figura 23, al comparar los niveles del tacrolimus normalizados por la dosis junto con las variantes polimórficas a lo largo del tiempo, ninguno de los polimorfismos mostró un comportamiento diferente, con  $p = 0.250$ .



**Figura 23.** Niveles del tacrolimus normalizados por la dosis administrada a 51 pacientes pediátricos con respecto al tiempo. Análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

El exón 21 del gen *MDR1* es muy polimórfico, por lo que consideramos que el número de pacientes es bajo. Este genotipo no cumple el equilibrio de Hardy-Weinberg. (Tabla 19)

**Tabla 19.** Equilibrio Hardy-Weinberg (91) para el gen *MDR1(ABCB1)* exón 21.

GENOTIPO	VALOR ESPERADO	VALOR OBSERVADO	FRECUENCIA ALÉLICA P	FRECUENCIA ALÉLICA q	FRECUENCIA ALÉLICA r	$\chi^2$
GG	14.8	18				
GT	21.0	15				
GA	4.28	4	0.539	0.382	0.078	3.86
TT	7.5	10				
TA	3.1	4				
AA	0.3	0				

p = frecuencia del alelo silvestre determinada experimentalmente.

q = frecuencia de la variante mutante determinada experimentalmente.

r = frecuencia de la variante mutante determinada experimentalmente.

Fórmula aplicada para la determinación del equilibrio Hardy-Weinberg en este polimorfismo que tiene 3 alelos fue la siguiente:

$$(p+q+r)^2 = p^2 + 2pq + 2pr + q^2 + 2qr + r^2 = 1$$

El resultado de dicha ecuación para este genotipo *MDR1* exón 21, resultó de 3.86, al ser comparado con el valor crítico de 3.84, lo que indicó que no existe equilibrio de Hardy-Weinberg.

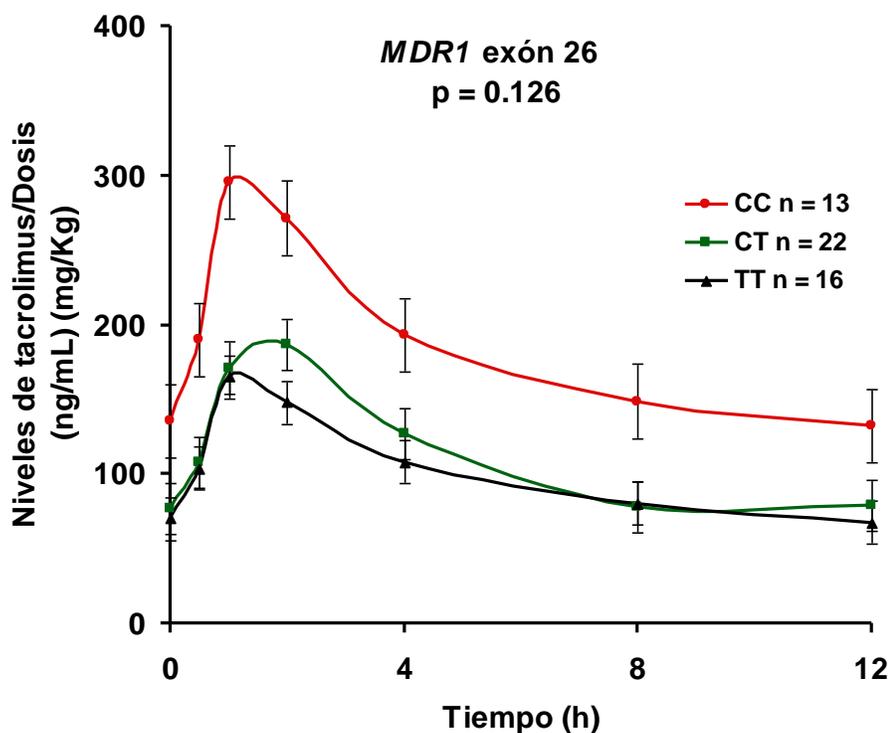
En la tabla 20 se presentan los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus y las cinco variantes alélicas encontradas en el exón 21. No se encontró diferencia significativa en ninguno de los parámetros analizados.

Tabla 20. Farmacocinética del tacrolimus y genotipo MDR1(ABCB1) exón 21. Valores mediana (intervalo).

Parámetros	GG n(%)	GA n (%) 4 (7.8%)	GT n (%) 15 (29.4 %)	TT n (%) 10 (19.6%)	TA n (%) 4 (7.8%)	Valor de p
Dosis (mg/kg/d)	0.08 (0.02-0.24)	0.13 (0.03-0.14)	0.07(0.02-0.25)	0.07 (0.03-0.21)	0.05 (0.03-0.09)	0.15
C <sub>min</sub> (ng/mL)	5.5 (2.1-11.3)	6.2 (4.8-13.7)	4.7 (1.7-7.7)	4.7 (2.8-7.9)	6 (4.7-9.4)	0.33
C <sub>max</sub> (ng/mL)	18.1 (3.7-59.8)	17.4 (16.1-27.3)	16.8 (3.3-32.4)	12.9 (5.9-33.6)	13.6 (7.4-15.1)	0.463
C <sub>max</sub> /D (ng*mL/mg*kg*d)	245.4 (33.6-598)	268.7 (115-910)	146.3 (29.2-430)	166.9 (48.5-560)	312.3 (82.2-477)	0.25
t <sub>½</sub> (h)	12(5.8-31.9)	13.8(6.7-17.6)	9.3 (5.7-24.7)	11.2(2.9-17.6)	16.4 (4.7-29.8)	0.531
t <sub>max</sub> (h)	1 (0-4)	2 (1-2)	2 (1-6)	2 (1-8)	1.5 (1-3)	0.163
ABC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	111.6 (32.2-218)	118.4 (112-221)	92.9 (29-269)	95 (52-174)	104.9 (70-145)	0.642
ABC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	1580 (305-2562)	1683 (869-6525)	737.1 (293-3782)	1168.5 (450-4253)	2366 (758-4680)	0.195
ABC <sub>0-∞</sub> (h*ng/mL)	243.5 (75-494)	262.1 (163-604)	152.1 (47-760)	154.4 (110-412)	280.7 (140-366)	0.18
ABC <sub>0-∞</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	3130 (709-1349)	2687(2292-7821)	1227 (572.7-507)	2129 (922-5195)	5190 (2572-788)	0.111
CL (L/h)	0.160(0.04-0.70)	0.186 (0.03-0.22)	0.407 (0.07-0.87)	0.235 (0.10-0.54)	0.115 (0.04-.19)	0.111

Los pacientes con genotipo GA requirieron mayor dosis del tacrolimus que los genotipos GG, GT, TT y TA, pero con estas dosis, los genotipos GT y TT no alcanzaron los niveles en valle esperados de 5 a 10 ng/mL. La concentración ajustada por la dosis fue mayor en los pacientes con genotipo GT. Al comparar todos los genotipos con respecto a los parámetros farmacocinéticos ninguno mostró diferencia significativa.

En la Figura 24 se muestran los niveles del tacrolimus normalizados contra el tiempo en los 51 pacientes pediátricos, según las variantes alélicas CC, CT y TT del exón 26 encontradas del gen que codifica para la glicoproteína-P. Se puede observar que la variante CC mostró mayores niveles del tacrolimus que las variantes alélicas CT y TT, pero al ser analizados los tres grupos de pacientes no mostraron diferencia estadísticamente significativa.



**Figura 24.** Concentración del tacrolimus con respecto al genotipo *MDR1* exón 26 en 51 niños con trasplante renal. La  $p = 0.126$  es el resultado de la comparación de los tres grupos formados. Prueba de Kruskal- Wallis.

Los tres grupos formados por las variantes CC, CT y TT del exón 26 del gen *MDR1(ABCB1)* y su análisis con los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus son mostrados en la tabla 22. Como se puede apreciar en la tabla, el genotipo CC presenta en su mayoría parámetros farmacocinéticos mayores que los genotipos CT y TT, pero estos no son estadísticamente significativos, esto se debe a la gran dispersión de los datos. En lo referente al aclaramiento, se ve una tendencia mayor en las variantes CT y TT con respecto a la CC.

La distribución de los genotipos para el exón 26, encontrados en los pacientes participantes, cumplen con el equilibrio de Hardy-Weinberg, los resultados del análisis se muestran en la tabla 21.

Distribución  $\chi^2$  para un grado de libertad, valor crítico 3.84 para  $p = 0.05$ . El cálculo del equilibrio Hardy-Weinberg se hizo mediante la página web (90).

$$p_{cal} = 0.92 < p_{tab} = 3.84$$

**Tabla 21.** Equilibrio de Hardy-Weinberg (91) para *MDR1(ABCB1)* para el exón 26.

GENOTIPO <i>MDR1</i> EXÓN 26	VALOR ESPERADO	VALOR OBSERVADO	FRECUENCIA ALÉLICA p	FRECUENCIA ALÉLICA q	$\chi^2$
CC	11.29	13			
CT	25.41	22	0.47	0.53	0.92
TT	14.29	16			

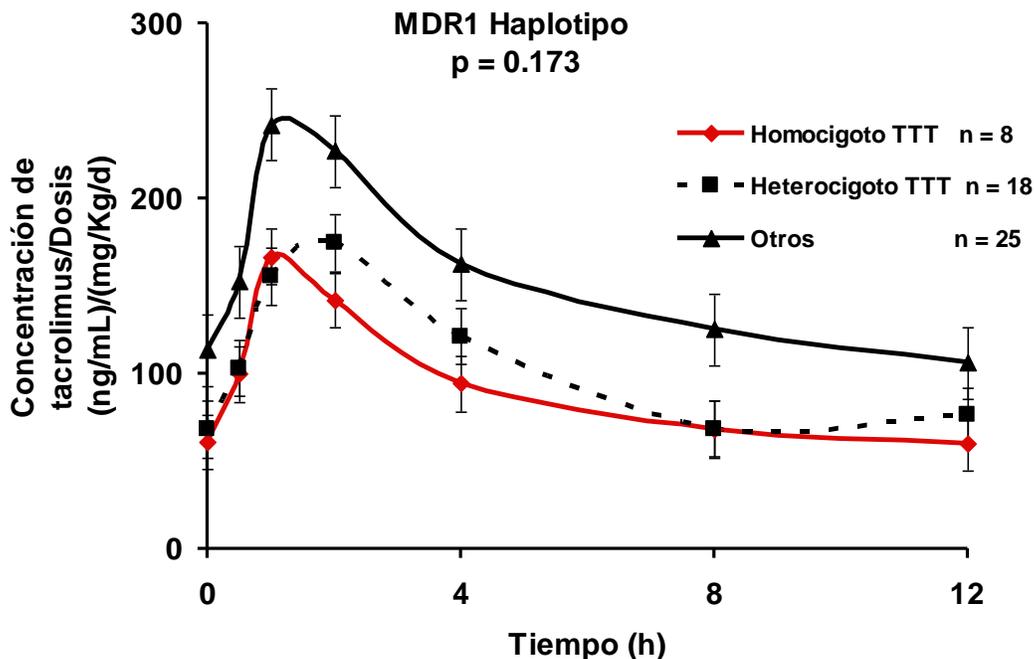
p = frecuencia del alelo silvestre determinada experimentalmente.

q = frecuencia de la variante mutante determinada experimentalmente.

**Tabla 22.** Farmacocinética del tacrolimus y genotipo *MDR1(ABCB1)* exón 26. Valores mediana (intervalo).

Parámetros Farmacocinéticos	CC	CT	TT	Valor de p
Gen <i>MDR1</i> exón 26	n (%)	n (%)	n(%)	
	<b>13(25.5)</b>	<b>22(43.1)</b>	<b>16(31.4)</b>	
Dosis (mg/kg/d)	0.06 (0.02-0.24)	0.09 (0.02-0.25)	0.07 (0.03-0.21)	0.268
C <sub>min</sub> (ng/mL)	5.4 (2.8-13.7)	4.8 (1.7-11.3)	5.2 (2.2-8.6)	0.669
C <sub>max</sub> (ng/mL)	23 (5.9-59.8)	16.5 (3.3-32.4)	15.2 (3.5-33.6)	0.787
C <sub>max</sub> /D (ng*mL/mg*kg*d)	253.3 (124-910)	149.5 (32.2-435)	188.4 (29.2-560)	0.167
t <sub>1/2</sub> (h)	13.7 (5.8-31.9)	11.3 (5.8-29.8)	10.5 (2.9-24.7)	0.351
t <sub>max</sub> (h)	1 (0-3)	2 (1-3)	2 (1-8)	0.383
ABC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	123.1 (51.5-221.2)	103.5 (29.8-269)	106 (36-174)	0.766
ABC <sub>0-12h</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	1585.3 (760-6524)	989.2 (305-3782)	1451.6 (293-4253)	0.207
ABC <sub>0-∞</sub> (h*ng/mL)	253.9 (92.3-604)	169.7 (47.4-760)	165 (110-412)	0.418
ABC <sub>0-∞</sub> /D (h*ng*mL/mg*kg*d)	3389 (1053-17821)	2257 (572.7-7507)	3860 (922-7265.5)	0.180
CL (L/h)	0.148 (0.03-0.47)	0.233 (0.07-0.87)	0.209 (0.07-0.54)	0.180

Al clasificar los datos de acuerdo al haplotipo, formado por los genotipos encontrados en los exones 12, 21 y 26 del gen *MDR1(ABCB1)*, se formaron 3 grupos identificados como homocigotos para TTT, heterocigotos TTT y Otros. El último grupo fue formado con los haplotipos encontrados en los 51 niños estudiados, que no se incluyeron en los grupos con haplotipos TTT. Cada grupo formado, fue analizado en relación con los niveles del tacrolimus presentes en cada punto de la farmacocinética. En la figura 25 podemos observar que el grupo denominado como otros presentó mayores niveles del tacrolimus aparentemente con respecto al tiempo de los grupos homocigoto y heterocigoto para TTT, pero no hubo diferencia significativa entre los grupos.



**Figura 25.** Curva de la concentración del tacrolimus contra tiempo según haplotipo del gen *MDR1(ABCB1)* exones 12, 21 y 26 en 51 niños. La  $p = 0.173$  es el resultado de la comparación de los tres grupos. Prueba de Kruskal-Wallis.

A su vez, se analizaron los parámetros farmacocinéticos del tacrolimus contra el tiempo de acuerdo al haplotipo del gen MDR1, los resultados son mostrados en la tabla 23 en la que podemos observar que existe una tendencia a que aquellos pacientes homocigotos o heterocigotos para el haplotipo TTT requirieron aparentemente mayor dosis que los otros haplotipos con una  $p = 0.089$ , sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa.

**Tabla 23.** Farmacocinética del tacrolimus y haplotipo *MDR1(ABCB1)* exones 12, 21 y 26. Valores mediana (intervalo).

<b>Parámetros</b>				
<b>Farmacocinéticos</b>	<b>TTT/TTT</b>	<b>Otros/TTT</b>	<b>Otros</b>	<b>Valor p</b>
<b>Haplotipo</b>	<b>n = 8</b>	<b>n = 18</b>	<b>n = 25</b>	
<b><i>MDR1(ABCB1)</i></b>				
<b>exones 12,21 y 26</b>				
Dosis (mg/kg/d)	0.09 (0.03-0.21)	0.12 (0.02-0.25)	0.06 (0.02-0.24)	0.089
C <sub>min</sub> (ng/mL)	5.1 (3-7.9)	4.7 (2.2-7.7)	5.5 (1.7-13.7)	0.582
t <sub>½</sub> (h)	11.2 (2.9-17.6)	11.3 (5.7-29.8)	11.2(4.7-31.9)	0.876
t <sub>max</sub> (h)	2 (1-8)	2 (1-6)	1 (0-4)	0.346
ABC <sub>0-12h</sub> (h*ng/mL)	103.6 (58-174)	92.9 (36.6-269)	113 (30-221)	0.731
CL (L/h)	0.240 (0.100-0.540)	0.313 (0.070-0.870)	0.170 (0.070-0.700)	0.315

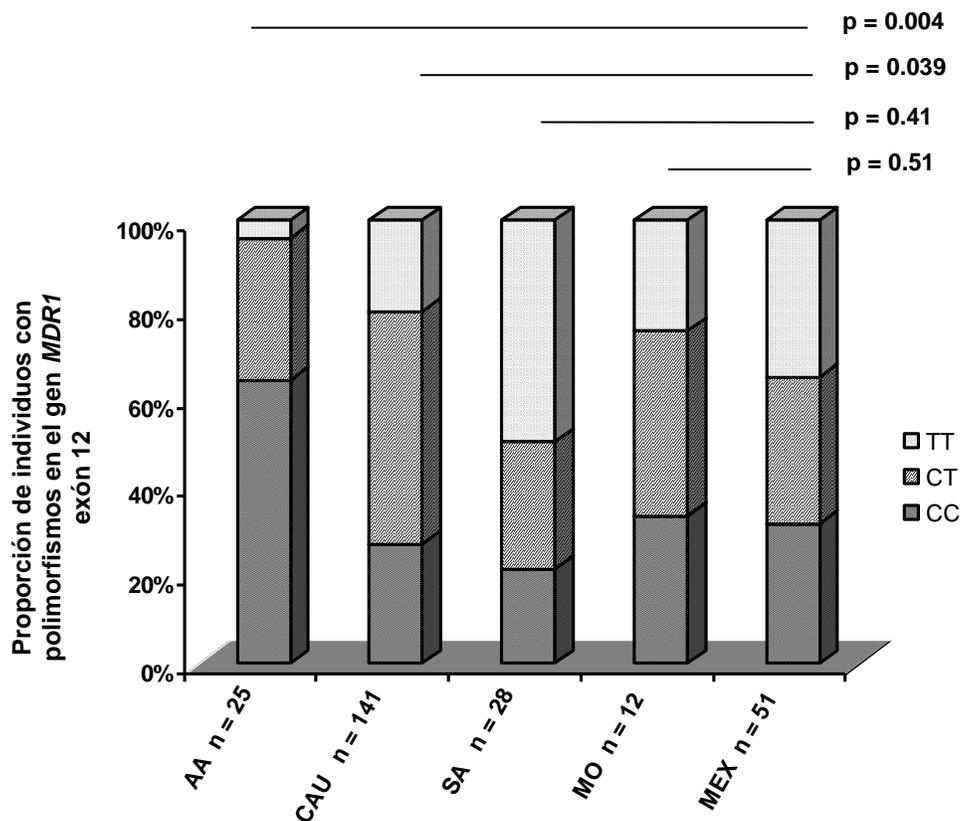
En la tabla 24, son mostradas las comparaciones realizadas entre la proporción de rechazo, la hipertensión y la tasa de filtración glomerular y los tres haplotipos considerados del gen *MDR1* a 12 meses de seguimiento. Los pacientes con haplotipo TTT mostraron menor número de rechazos, menor hipertensión, pero el daño renal fue similar en todos los grupos. No hubo diferencias significativas entre los tres grupos.

**Tabla 24.** Haplotipos del gen *MDR1* y la proporción de rechazo agudo, hipertensión y velocidad de filtración glomerular a 12 meses post-trasplante renal.

	<b>Homocigoto</b>	<b>Heterocigoto</b>	<b>Otros</b>	
	<b>TTT</b>	<b>TTT</b>		<b>Valor p</b>
	<b>n = 8</b>	<b>n = 18</b>	<b>n = 25</b>	
Pacientes con Rechazo Agudo n (%)	5 (62.5)	7 (38.8)	9 (36)	0.40
HTA post-trasplante n(%)	7 (87.5)	14 (77.7)	16 (64)	0.35
VFG (mL/min/1.73) promedio±DS	78 ± 33	80.9 ± 24	82.5 ± 21	0.95

Se hizo la comparación de cada uno de los genotipos encontrados en los exones 12, 21 y 26 del gen *MDR1* en los 51 pacientes pediátricos con los reportados en otras poblaciones. La población mexicana mostró ser diferente en la frecuencia de los polimorfismos estudiados en el exón 12 contra las poblaciones afroamericana y caucásica ( $p = 0.004$  y  $p = 0.039$  respectivamente), pero no mostró ser diferente a las poblaciones medio oriental ( $p = 0.51$ ) y asiática ( $p = 0.41$ ), figura 26.

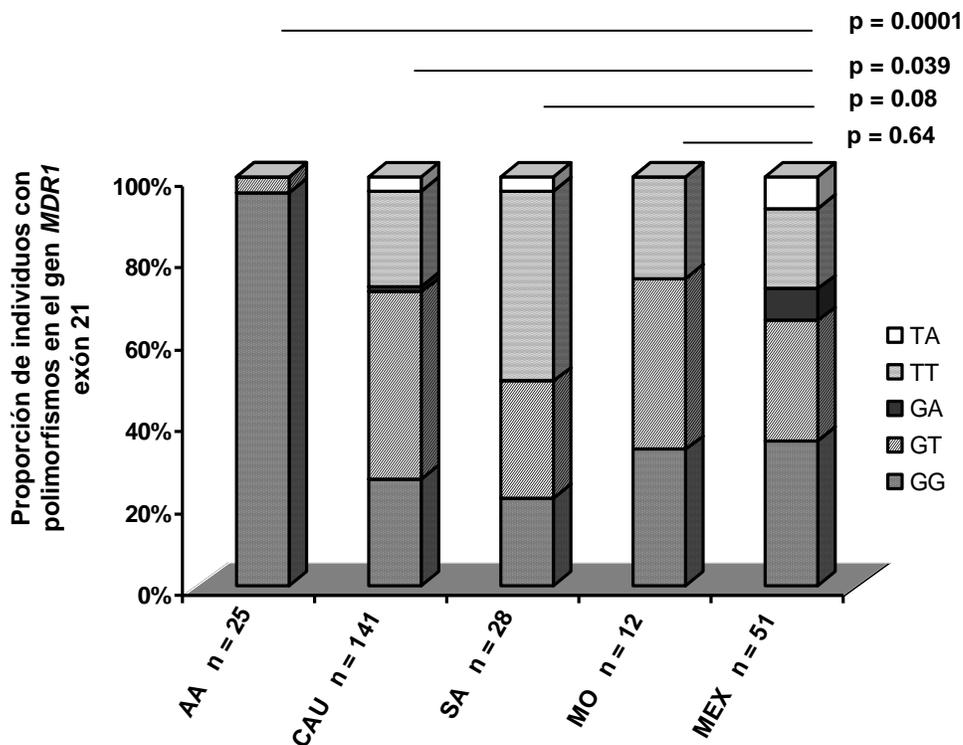
### Variantes polimórficas del gen *MDR1* en diferentes poblaciones



**Figura 26.** Representación gráfica de la frecuencia de los polimorfismos del gen *MDR1* exón 12 en diferentes poblaciones. AA: afroamericanos, Cau: caucásicos, SA: asiáticos, MO: medio orientales, MEX: mexicanos. Los datos de las poblaciones diferentes a la mexicana fueron obtenidos de Fredericks et al., 2006 (82).

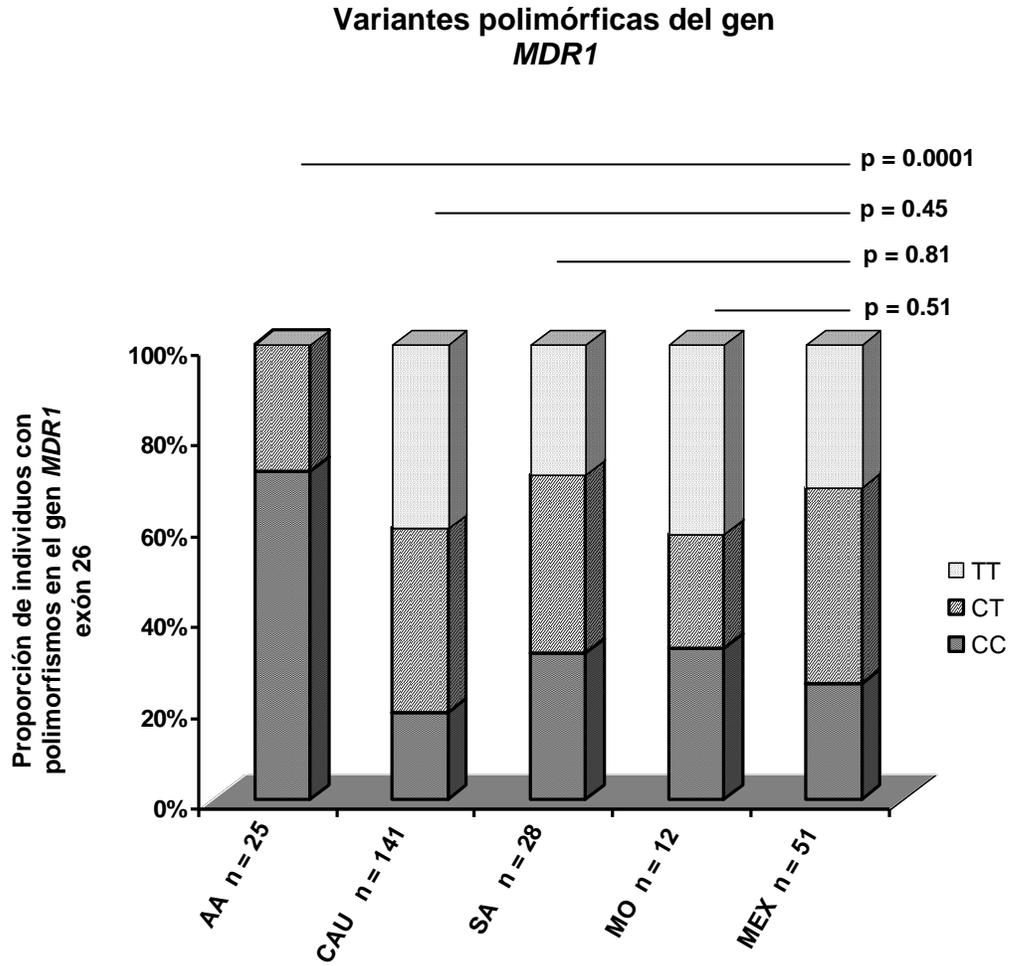
Resultados similares fueron encontrados en el exón 21, para las poblaciones afroamericana y asiática, se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.0001$  y  $p = 0.039$ ), pero no hubo diferencia en las poblaciones asiática y de medio oriente ( $p = 0.08$  y  $p = 0.64$ ), los resultados son mostrados en la figura 27.

**Variantes polimórficas del gen *MDR1*  
en diferentes poblaciones.**



**Figura 27.** Frecuencia polimórficas del gen *MDR1(ABCB1)* exón 21 en diferentes poblaciones. AA: afroamericanos, CAU: caucásicos, SA: asiáticos, MO: medio orientales, MEX: mexicanos. Los datos de las poblaciones diferentes a la mexicana fueron obtenidos de Fredericks et al. 2006 (82).

Se observa en la figura 28 que la población mexicana muestra similitud con las poblaciones caucásica, asiática y medio oriental ( $p = 0.45$ ,  $p = 0.81$  y  $p = 0.51$  respectivamente, pero la población afroamericana fue diferente a la mexicana ( $p = 0.0001$ ))



**Figura 28.** Representación gráfica de la frecuencia de los polimorfismos del gen *MDR1(ABCB1)* exón 26 en diferentes poblaciones. AA: afroamericanos, CAU: caucásicos, SA: asiáticos, MO: medio orientales, MEX: mexicanos. Los datos de las poblaciones diferentes a la mexicana fueron obtenidos de Fredericks et al., 2006 (82).

## **8. Discusión**

La población mexicana es mestiza (90%), resultado de la mezcla entre amerindios, afroamericanos y europeos (22), por lo que, las diferencias entre mexicanos y otras poblaciones, en el genotipo como en el fenotipo de las proteínas que intervienen en la farmacocinética de los medicamentos son esperadas. La genotipificación de los genes que codifican para las isoformas del citocromo P450 como el CYP3A4, y CYP2E1 (32, 51), CYP2C9 (92), CYP2D6 (93), CYP1A2 y CYP1B1 (53) se han relacionado con el metabolismo de algunos fármacos y han mostrado ser diferentes entre la población mexicana y otras poblaciones. Por ejemplo, estudios farmacocinéticos de nifedipino (23, 24), midazolam (25), ciclosporina (26), sildenafil (27), omeprazol (28) y meloxicam (29) muestran que existe diferencia entre la población mexicana y la población caucásica.

El conocimiento de los factores que se encuentran involucrados en la variabilidad interindividual es de gran importancia en la dosificación de los fármacos con estrecho índice terapéutico como los inhibidores de calcineurina empleados en el tratamiento profiláctico para evitar el rechazo en los pacientes con trasplante de órganos sólidos.

El trasplante renal es uno de los tratamientos sustitutivos en la ERCT, pero el riesgo de rechazo hace necesario el empleo de medicamentos inmunosupresores, por lo que, la inmunoterapia tiene que continuar durante toda la vida del injerto, para permitir que el órgano trasplantado se mantenga por más tiempo. El régimen inmunosupresor inicial se basa en una combinación de varios fármacos, que a menudo incluyen esteroides, un antiproliferativo y un inhibidor de calcineurina. Entre los inhibidores de calcineurina se encuentran tacrolimus, medicamento con estrecho índice terapéutico con gran variabilidad intra e inter-individual, que al ser administrado por vía oral, su absorción depende de la expresión de la glicoproteína-P y su biotransformación de las enzimas CYP3A4 y CYP3A5 (94, 95), las cuales se encuentran vinculados a la presencia de polimorfismos genéticos. La función de CYP3A5 y la glicoproteína-P en la biodisponibilidad y el metabolismo del tacrolimus, la relación entre los polimorfismos que estas proteínas presentan y la farmacocinética del tacrolimus es de interés en el ámbito clínico.

Estudios previos muestran que la población afroamericana requiere dosis del tacrolimus mayores en comparación con los pacientes procedentes de la población caucásica, para alcanzar niveles sanguíneos comparables (54, 55), esto ha sido parcialmente explicado por el polimorfismo encontrado en la enzima CYP3A5 (32, 54, 55, 57, 96), el fenotipo expresor (*CYP3A5\*1\*1*) es más frecuente en los afroamericanos, mientras que

los caucásicos tienen mayor frecuencia del genotipo *CYP3A5\*3\*3* (no expresor).

En el presente estudio se evaluaron, las frecuencias alélicas en el gen *CYP3A5* (variantes *CYP3A5\*1\*1*, *CYP3A5\*1\*3* y *CYP3A5\*3\*3*) y su relación con las dosis administradas y los niveles en valle del tacrolimus en sangre en 291 pacientes con trasplante renal. Los pacientes con genotipo *CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3* requirieron mayor dosis del tacrolimus comparados con los pacientes con genotipo *CYP3A5\*3\*3*. Estos resultados fueron similares a los reportados por MacPhee en 2004 y 2008, Travent 2003, Staats 2010 y Coto 2009, en donde individuos con genotipo *CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3* (expresores) requirieron elevadas dosis del tacrolimus a diferencia de aquellos individuos con genotipo *CYP3\*3\*3* (32, 54, 55, 57, 96). En este estudio, no se observó diferencia significativa entre los pacientes pediátricos y los pacientes adultos que alcanzaron la concentración objetivo, la cual fue del 68% y 59.6%, respectivamente. Esto a su vez mostró que hay pacientes en ambos grupos que a pesar de las dosis administradas no alcanzan los niveles esperados. Se debe considerar, además del genotipo, la comedición, las condiciones fisiológicas incluyendo el flujo hepático, la edad, las interacciones fármaco-alimento que son importantes en la biodisponibilidad de los agentes inmunosupresores (32, 54, 55, 57, 96).

Al hacer la comparación de las frecuencias genotípicas con lo reportado en otras poblaciones se observó que los genotipos expresores (*CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3*) fueron más frecuentes en mexicanos que en caucásicos, pero menos frecuentes que en afroamericanos. Sin embargo, no hubo diferencia entre los mexicanos y los asiáticos, esto concuerda con los datos reportados por Castañeda et al. en 1996, en donde mencionan que el aclaramiento de nifedipino en mexicanos es significativamente diferente a los caucásicos, pero comparable a la población asiática (23); sin embargo, el perfil farmacocinético en otros fármacos como el omeprazol, en mexicanos presenta diferencias significativas con el perfil farmacocinético de caucásicos y asiáticos nuestros datos difieren con lo reportado por González et al. en el 2003, en el que mencionan que la población mexicana presenta diferencias significativas en la farmacocinética de omeprazol, con las poblaciones asiática y caucásica (28). Estos datos demostraron que los regímenes de dosificación de los fármacos establecidos en otras poblaciones no son totalmente aplicables a la población mexicana.

En el presente estudio, se evaluó el efecto de las variaciones polimórficas en los genes que codifican para el *CYP3A5* y la glicoproteína-P y su relación con la farmacocinética del tacrolimus en 51 pacientes pediátricos con trasplante renal. En este grupo de

pacientes la presencia del genotipo \*3\*3 se relacionó con bajas dosis del tacrolimus para alcanzar los niveles esperados del tacrolimus. También se relacionó con una mayor exposición del tacrolimus (valor de ABC/D de 1918.6 h\*ng\*mL/mg\*kg\*d), con respecto a los pacientes con genotipo \*1\*1 y \*1\*3 (ABC/D de 537.3 y 848.7), respectivamente. El aclaramiento del grupo \*3\*3 (0.133 L/h) fue menor estadísticamente que el de los grupos expresores (0.527 y 0.374 L/h). Datos similares fueron reportados por MacPhee (2007), Satoh (2008), Tirelli (2008) y Op den Buijsch (2007) (32, 53, 59, 97-100). Estudios realizados en japoneses, chinos y caucásicos reportaron que la cantidad del tacrolimus que alcanzó la circulación sistémica con respecto a la dosis fue menor en individuos que expresaron el *CYP3A5* que aquellos que no lo expresaron, resultados que concuerdan con nuestros datos (32, 59, 97, 101-103).

No se encontró diferencia en los niveles en valle, entre el grupo no expresor y los grupos expresores, esto puede estar relacionado con el monitoreo terapéutico del tacrolimus que se toma como base para hacer el ajuste de dosis a cada paciente, en cada consulta (54, 96, 103-105). En este estudio, la mayoría de los pacientes caen en la ventana terapéutica, lo que muestra la utilidad del monitoreo terapéutico del tacrolimus. Se distinguen dos grupos definidos por el ABC/D que coinciden con los que expresan y no expresan el *CYP3A5*. Además, se sabe que los pacientes con bajos niveles del tacrolimus pueden presentar rechazo agudo, crónico o subclínico, mientras que pacientes con elevado AUC/C<sub>0</sub> tienen sobredosis e incrementan el riesgo de infecciones oportunistas, desórdenes linfoproliferativos y cáncer.

No se encontró relación entre la presencia de rechazo, la hipertensión arterial y la filtración glomerular con el genotipo *CYP3A5*, aunque hay una tendencia a la presentación de rechazo agudo en los primeros 12 meses post-trasplante en los pacientes con genotipo *CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3*. A pesar de que los pacientes tuvieron los niveles en valle esperados en el seguimiento de un año, se pudo observar diferencias significativas al mes ( $p = 0.01$ ) y a los 12 meses ( $p = 0.04$ ) entre los grupos con genotipo expresor y no expresor, lo que se puede explicar en el primer caso por el ajuste de la dosificación en el primer mes y a los 12 meses por la reducción de la dosis que se pretende alcanzar en este periodo.

Por su localización en el intestino, la barrera cerebral, el endotelio capilar de los hepatocitos, las glándulas adrenales y el túbulo proximal renal (106), el transportador de membrana conocido como glicoproteína-P, puede estar asociado con la concentración de los inhibidores de calcineurina tanto a nivel sanguíneo como intrarenal. Su

plegamiento, estructura y expresión están regulados por el gen *MDR1(ABCB1)*, por lo que modificaciones en el gen alteran el funcionamiento de la glicoproteína-P (64, 68, 70). Se han identificado hasta ahora, 50 polimorfismos (SNPs) y 3 polimorfismos relacionados con inserción y deleción en este gen (68, 69, 107), pero los SNPs localizados en los exones 12, 21 y 26 son los mayormente estudiados y han sido asociados con inhibidores de la calcineurina. Se ha hipotetizado que los individuos sin mutación en dicho gen es probable que puedan sacar tacrolimus del interior de las células intestinales, a la luz intestinal y por lo tanto, necesitan una mayor dosis diaria para alcanzar niveles adecuados del tacrolimus en sangre. Por otro lado, la baja expresión de glicoproteína-P intestinal puede incrementar la bioadisonibilidad del tacrolimus.

Existen reportes realizados tanto en voluntarios sanos como en pacientes con trasplante sólido en donde se ha tratado de definir el efecto que estos tres polimorfismos tienen sobre la farmacocinética del tacrolimus y los resultados aún son controversiales (108-110).

Nosotros observamos que la relación  $C_0/D$  fue menor en los genotipos CT y TT con respecto al CC en el exón 12, resultados similares fueron observados por Anglicheau et al., 2003 quienes reportaron que pacientes con genotipo CT o TT tuvieron menor  $C_0/D$  que pacientes con genotipo CC (61). Este mismo autor, en otro estudio, en el que relacionó la dosis diaria del tacrolimus con la dosis de esteroides reportó mayor  $C_0/D$  del tacrolimus en pacientes con trasplante renal con genotipo *ABCB1* 1236 CT o TT comparado con los pacientes con variante silvestre *ABCB1*1236CC (53, 61).

El estudio realizado por Hoffmeyer en el 2000 reportó que los individuos con variante alélica CC se relacionaban con la elevada expresión de la glicoproteína a nivel intestinal (69), lo que se ha asociado con niveles bajos de fármacos en sangre.

Con respecto a la variante del exón 21 (G2677T/A), nosotros no encontramos diferencias significativas en ninguno de los parámetros farmacocinéticos, a diferencia de lo reportado en otros estudios en donde resultó una menor  $C_0/D$  en las variantes GT y TT comparado con GG (61, 82) y un mayor requerimiento de la dosis en los individuos con el polimorfismo GG con respecto a otras variantes en 103 pacientes chinos (102).

Con respecto a la variante C3435T presente en el exón 26, nuestros resultados no mostraron relación con la farmacocinética de tacrolimus, lo que coincide con los estudios reportados por Siegmund, Goto y Staatz (32, 111, 112). Yu en el 2011 reportó que la variante CC disminuye el requerimiento de la dosis (113), por otro, lado existen

datos controversiales con respecto al polimorfismo TT, algunos afirman que la presencia de esta variante disminuye la expresión intestinal de la glicoproteína-P, por lo que se aumenta la absorción, así como la concentración sistémica y un riesgo potencial de nefrotoxicidad (32, 69, 74, 76, 114), otros estudios han demostrado una asociación opuesta (70, 72, 108, 115).

Roy en el 2006 reportó que la presencia de las variantes alélicas -129C, 3435T y 2677T reducían significativamente la C<sub>0</sub>/D del tacrolimus con respecto a los pacientes con las variantes alélicas -129T, 3435C y 2677G, esto se relacionó con la baja actividad de la glicoproteína-P, el incremento en la absorción del fármaco y una disminución en su excreción (116).

Moore et al., en 2012 mostraron la asociación del genotipo CC del exón 3435 del gen *MDR1* del donador y el daño renal a largo plazo (124). Cosio en el 2005 determinó la asociación entre el genotipo TT y la presencia de fibrosis intersticial y atrofia tubular en las biopsias de los pacientes con tratamiento de Tac a 3 años post-trasplante (118).

En este trabajo, las discrepancias de los resultados obtenidos en el gen *MDR1*, con lo reportado en otros estudios puede deberse a la cantidad de pacientes analizados. La variabilidad existente en el exón 21 y el no encontrar ningún individuo con la variante AA en este exón, sugieren que al aumentar el número de individuos darían una idea más clara del efecto de este gen sobre tacrolimus. Los resultados mostrados en esta investigación se basaron en el análisis de los exones 12, 21 y 26, pero como se mencionó previamente se han descrito hasta el momento 50 SNPs dentro de este gen; no tenemos suficiente información del impacto que tiene cada uno de esos polimorfismos, en la estructura y función de la glicoproteína-P. Como se ha demostrado, la especificidad de las proteínas (el distinguir ligandos y catalizar determinadas transformaciones químicas), depende de su estructura tridimensional; como la cadena polipeptídica se sintetiza de manera lineal, requiere de acoplarse con proteínas conocidas como chaperonas, las cuales permiten un correcto plegamiento de la proteína. King Lung Fung et al. en el 2009 reportaron que una mutación sinónima puede crear una pausa de traducción en el ribosoma. Un retraso significativo podría interrumpir la interacción chaperona-proteína por un corto tiempo y producir una proteína con un ligero cambio de conformación, el cual afectaría la función de la proteína, o producir un plegamiento inadecuado de la proteína, llevándola a su destrucción. La pausa de traducción también puede afectar a la vía de plegamiento de la glicoproteína-P específicamente en los dominios adyacentes (70,117). El

entendimiento de la fisiología y bioquímica de esta proteína con respecto a las variaciones genéticas puede ser importante para la individualización en la farmacoterapia.

Por otro lado, al determinar el equilibrio de Hardy-Weinberg, los exones 12 y 21, no cumplieron con dicho equilibrio, lo cual puede ser efecto del número de individuos analizados o bien estar sujeta a alguna fuerza evolutiva relacionada con la selección, migración, mutación o deriva genética, las cuales son determinadas en dicho equilibrio. Además, cabe resaltar que la población mexicana es la mezcla de otras poblaciones, y su bagaje genético, la hace diferente a otras poblaciones.

Otros autores han documentado que la exposición sistémica del fármaco en términos del ABC y la absorción correlaciona mejor con los eventos clínicos como el rechazo agudo y la nefrotoxicidad que con la  $C_0$ , pero la evaluación de este parámetro de forma rutinaria es poco práctica.

Al analizar el genotipo *MDR1* como haplotipo no se encontró relación entre este y la farmacocinética del tacrolimus ni con la presencia de rechazo agudo, la tasa de filtración glomerular y la presencia de hipertensión a los 12 meses post-trasplante.

Es importante recordar que los estudios con pocos pacientes pueden contar con muchas inconsistencias en los resultados, y aunque en la segunda parte de nuestro estudio sólo se incluyeron 51 pacientes para la genotipificación del gen *CYP3A5*, los resultados obtenidos fueron similares con la primera parte realizada con 291 pacientes y con los resultados de genotipificación obtenidos por Ibarra en el 2009, en pacientes mexicanos (125). Por otro lado, la poca frecuencia de algunas variantes alélicas y la gran variabilidad que presenta el exón 21 (G2677T/A) del gen *MDR1(ABCB1)*, al ser analizado con un número pequeño de individuos, hace difícil detectar diferencias y relacionar los efectos que estas diferencias tienen en la farmacocinética y farmacodinamia de fármacos con estrecho índice terapéutico como el tacrolimus. También, la influencia de la etnicidad puede jugar un papel importante en la dosificación y farmacocinética del tacrolimus. La farmacogenética pretende personalizar la terapia de cada individuo, pero la influencia de la farmacogenética sobre la farmacocinética de los inhibidores de calcineurina es aún complejo, porque existen otros factores que influyen tanto en la dosificación como en la farmacocinética de cada medicamento como lo es la edad, el estado nutricional, el estado fisiológico, la relación entre los polimorfismos de otras proteínas involucradas las cuales pueden ser de tipo enzimático o mediadores incluyendo *CYP3A4*, *PXR*, *FKBP12*.

El apego al tratamiento, el mismo tratamiento concomitante y sus posibles interacciones farmacológicas, y el consumo de alimentos que podrían modificar la farmacocinética del tacrolimus (126, 127), son variables de difícil control en nuestro medio y son otros de los factores que influyen en las diferencias encontradas.

Una cantidad sustancial de injertos desarrollan disfunción progresiva y fracasan durante la década posterior al trasplante. A largo plazo, la pérdida de los injertos se debe principalmente a la lesión vascular, las enfermedades malignas, las infecciones, la nefropatía crónica del trasplante y la nefrotoxicidad por los inhibidores de calcineurina.

Se sabe que la edad del donador es uno de los factores de riesgo de lesión progresiva del riñón trasplantado. Naesens en el 2009 (117, 128) proporcionó evidencia de la relación entre los polimorfismos del gen *MDR1* (de donadores y receptores), la lesión tubulointersticial crónica de los riñones trasplantados, la función del injerto, y la probable acumulación local renal del tacrolimus. También demostraron que la variante genotípica TT del donador en el exón 26 tenía efecto en los procesos antes mencionados. Woillard et al. en 2010 reportaron que la presencia de la variante TTT del gen *MDR1* se relacionó con un incremento en el riesgo de pérdida del injerto en receptores de trasplante renal cuyo tratamiento inmunosupresor se mantuvo a base de ciclosporina, lo que sugiere que las variaciones genéticas en el gen *MDR1* son predictivas de la evolución del injerto (129), estos datos fueron similares a los resultados de Naesens en 2009, quien además mencionó que este deterioro fue independiente de la calidad del trasplante.

Por otro lado, la búsqueda de biomarcadores, como la producción de interleucina 2, interferón- $\gamma$ , el factor de necrosis tumoral, y otras citocinas, las que reflejan procesos inflamatorios y/o de rechazo, su relación de estos con los niveles de los inmunosupresores y el conocimiento del genotipo, en cada paciente, de las proteínas relacionadas con la farmacocinética de los fármacos empleados para prevenir el rechazo de órganos trasplantados, permitirá hacer dosificaciones individualizadas y así evitar la incidencia de rechazo al injerto y los eventos adversos.

## **9. Conclusiones**

Los pacientes que expresan el genotipo *CYP3A5\*1\*1* y *CYP3A5\*1\*3* requieren mayor dosis del tacrolimus a diferencia de los pacientes que presentan el genotipo *CYP3A5\*3\*3*.

La genotipificación del gen *CYP3A5* podría ser utilizada para determinar la dosificación del tacrolimus en pacientes con trasplante renal,

La población mexicana es diferente a otros grupos étnicos (afroamericanos y caucásicos) en el genotipo del gen *CYP3A5*.

Los genotipos de glicoproteína-P exón 12, 21 y 26 podrían no estar asociados a la farmacocinética del tacrolimus.

Las frecuencias de los polimorfismos del gen *MDR1* en mexicanos difieren de lo reportados en otros grupos étnicos.

Se requieren más estudios para determinar si la dosificación del tacrolimus a través del conocimiento del polimorfismo genético pre-trasplante, mejoraría la sobrevida del injerto al disminuir la incidencia de los rechazos y/o la nefrotoxicidad.

## **10. Limitaciones del estudio**

El estudio farmacocinético no se realizó en el mismo momento postrasplante en todos los pacientes, el intervalo fue de 9 a 36 meses, con mediana de 9 meses.

La muestra fue pequeña para *MDR1*, no hubo equilibrio de Hardy Weinberg en los exones 12 y 21.

No se determinó el impacto que tuvieron en este estudio, el apego al tratamiento, las posibles interacciones farmacológicas del tratamiento concomitante, y el consumo de alimentos.

Es importante considerar la asociación de estos polimorfismos con otros que pueden presentarse en los mismos genes o en los genes de las proteínas relacionadas como el PXR, OAT o los sitios blancos de los inhibidores de calcineurina.

## **11. Estudios Propuestos**

1.- Polimorfismo de glicoproteína-P en el donador renal y su relación con la toxicidad por tacrolimus en el receptor. HIM/2010/018.

2.- Relación farmacocinética-farmacodinamia en inhibidores de calcineurina en niños con trasplante renal. HIM/2011/026.

3.- Asignación de dosis del tacrolimus y micofenolato según genotipo en niños en el trasplante renal con evolución del injerto a doce meses. Ya fue aceptado.

## 12. Referencias

1. Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007;22:1839-48.
2. KIDNEY N. K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, clasification and stratification. 2002;38:S1-S266.
3. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296-305.
4. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:288-96.
5. Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology--drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* 2003;349:1157-67.
6. Medeiros M, Romero N, Valverde R, Delgadillo R, Varela-Fascinetto G, Muñoz A. Renal transplantation in children. *Rev Invest Clin* 2005;57:230-6.
7. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in pediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:283-95.
8. Fine R. Renal transplantation for children the only realistic choice. *Kidney Int* 1985;28:S-15.
9. Najarian J, Almond P, Gillighan K. Renal transplantation in the first five years of life. *Kidney Int* 1993;44:40.
10. Tejani A, Sullivan K. Long-term follow-up of grow in children post-transplantation. *Kidney Int* 1993;44:56-58.
11. Friis-Hansen B. Body water compartments in children: changes during growth and related changes in body composition. *Pediatrics* 1961;28:169-81.
12. Danovitch G. *Trasplante Renal*. Madrid, España: Ed. Marbán libros, S.L. 2002.
13. Abbas A, Lichtman A. *Inmunología Celular y Molecular*. Madrid, España: Elsevier, 2004.
14. [http://www.inmunologialinea.es/index.pho?option=com.\\_content&view=article&id=83:activacion&catid=44:activacion-linfocitos&=126](http://www.inmunologialinea.es/index.pho?option=com._content&view=article&id=83:activacion&catid=44:activacion-linfocitos&=126). In: 2010 Rs, ed. Revisado en sep 2010.
15. Bruton L, Lazo J, Parker K. Las bases farmacológicas de la terapéutica. *Fármacos que se usan en la inmunomodulación*. , 2006.
16. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med* 2004;351:2715-29.
17. NAPRTCS. Annual Transplant Report: [http://web.emmes.com/study/pad/annrept/2010\\_report.pdf](http://web.emmes.com/study/pad/annrept/2010_report.pdf). Revisado sep 2010.
18. Pascual J, Ortuño J. Nuevos tratamientos inmunosupresores de indución en el trasplante renal,. *Med Clin* 2001;117:147-55.
19. Alexopoulos E, Papagianni A, Tselamashvili M, Leontsini M, Memmos D. Induction and long-term treatment with cyclosporine in membranous nephropathy with the nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3127-32.
20. Balistreri WF, Heubi JE, Suchy FJ. Bile acid metabolism: relationship of bile acid malabsorption and diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:105-21.
21. West DP, Worobec S, Solomon LM. Pharmacology and toxicology of infant skin. *J Invest Dermatol* 1981;76:147-50.
22. Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, et al. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8611-6.

23. Castaneda-Hernández G, Palma-Aguirre JA, Montoya-Cabrera MA, Flores-Murrieta FJ. Interethnic variability in nifedipine disposition: reduced systemic plasma clearance in Mexican subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1996;41:433-4.
24. Castaneda-Hernández G, Hoyo-Vadillo C, Palma-Aguirre JA, Flores-Murrieta FJ. Pharmacokinetics of oral nifedipine in different populations. *J Clin Pharmacol* 1993;33:140-5.
25. Chávez-Teyes L, Castaneda-Hernández G, Flores-Murrieta F. Pharmacokinetics of midazolam in Mexicans: evidence for interethnic variability. *Clin Drug Invest* 1999;17:233-39.
26. Palma-Aguirre JA, González-Llaven J, Flores-Murrieta FJ, Castaneda-Hernández G. Bioavailability of oral cyclosporine in healthy Mexican volunteers: evidence for interethnic variability. *J Clin Pharmacol* 1997;37:630-4.
27. Flores-Murrieta FJ, Castaneda-Hernández G, Granados-Soto V, Herrera JE. Increased bioavailability of sildenafil in Mexican men. *JAMA* 2000;283:1825-6.
28. González HM, Romero EM, Peregrina AA, et al. CYP2C19- and CYP3A4-dependent omeprazole metabolism in West Mexicans. *J Clin Pharmacol* 2003;43:1211-5.
29. Carrasco-Portugal M del C, Aguilar-Carrasco JC, Luján M, Reyes-García G, Medina-Santillán R, Flores-Murrieta FJ. Further evidence for interethnic differences in the oral pharmacokinetics of meloxicam. *Clin Drug Investig* 2005;25:307-13.
30. Reyes H, Medeiros M. Tacrolimus en Pediatría. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006;63:276-85.
31. Alberu J, Urrea EM. [Immunosuppression for kidney transplant recipients: current strategies]. *Rev Invest Clin* 2005;57:213-24.
32. 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;49:207-21.
33. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:404-30.
34. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003;63:1247-97.
35. Machida M, Takahara S, Ishibashi M, Hayashi M, Sekihara T, Yamanaka H. Effect of temperature and hematocrit on plasma concentration of FK 506. *Transplant Proc* 1991;23:2753-4.
36. Piekoszewski W, Jusko WJ. Plasma protein binding of tacrolimus in humans. *J Pharm Sci* 1993;82:340-1.
37. Vicari-Christensen M, Repper S, Basile S, Young D. Tacrolimus: review of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and pharmacogenetics to facilitate practitioners' understanding and offer strategies for educating patients and promoting adherence. *Prog Transplant* 2009;19:277-84.
38. Glicoproteína-P (o ATPasa transportadora de fármacos) <http://www.medicinapertutti.altervista.org/glicoproteina-p-o-atpasi-transportatrice-di-farmaci>. Revisado octubre 2012.
39. Zahir H, McLachlan AJ, Nelson A, McCaughan G, Gleeson M, Akhlaghi F. Population pharmacokinetic estimation of tacrolimus apparent clearance in adult liver transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2005;27:422-30.
40. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors: one step closer toward individualized immunosuppression? *Pharmacogenomics* 2005;6:323-37.

41. <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/artcles/775/1/vias-de-Administracion-de-Farmacos.html>. Revisado en octubre 2011.
42. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation* 2001;104:3091-6.
43. Gonschior AK, Christians U, Winkler M, Linck A, Baumann J and Sewing KF. Tacrolimus (FK506) metabolite patterns in blood from liver and kidney transplant patients. *Clinical Chem* 1996;42(9):1426-32.
44. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:414-23.
45. Omura T. Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:690-8.
46. [http://www.uv.es/jcastell/Citocromo\\_9450.pdf](http://www.uv.es/jcastell/Citocromo_9450.pdf). Revisado en 2011.
47. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:1-21.
48. Ng FL, Holt DW, MacPhee IA. Pharmacogenetics as a tool for optimising drug therapy in solid-organ transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:2045-58.
49. Eichelbaum M, Burk O. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001;7:285-7.
50. Reyes-Hernández OD, Arteaga-Illan G, Elizondo G. Detection of CYP3A4\*1B and CYP3A4\*2 polymorphisms by RFLP. Distribution frequencies in a Mexican population. *Clin Genet* 2004;66:166-8.
51. Reyes-Hernández OD, Lares-Asseff I, Sosa-Macías M, Vega L, Albores A, Elizondo G. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations. *Pharmacology* 2008;81:97-103.
52. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-91.
53. Staatz 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;49:141-75.
54. MacPhee IA, Holt DW. A pharmacogenetic strategy for immunosuppression based on the CYP3A5 genotype. *Transplantation* 2008;85:163-5.
55. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnsoton A, Goldberg L and Holt DW. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:914-9.
56. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004;5:243-72.
57. Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:1233-5.
58. Zheng H, Webber S, Zeevi A, et al. The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients. *Hum Immunol* 2002;63:765-70.
59. Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K, Suzuki T, Habuchi T and Kato T. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the

- pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004;78:1182-7.
60. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A, Goldberg L and Holt DW. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005;79:499-502.
  61. Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martínez F, Cassinat B, Legendre C and Thervent E. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2409-14.
  62. Kreutz R, Zurcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14:665-71.
  63. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003;22:7468-85.
  64. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38:802-32.
  65. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7735-8.
  66. Kioka N, Tsubota J, Kakehi Y, Kamano T, Gottesman MM, Pastan I and Ueda K. P-glycoprotein gene (MDR1) cDNA from human adrenal: normal P-glycoprotein carries Gly185 with an altered pattern of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;162:224-31.
  67. Cavaco I, Gil JP, Gil-Berglund E, Ribeiro V. CYP3A4 and MDR1 alleles in a Portuguese population. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1345-50.
  68. Chinn LW, Kroetz DL. ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:265-9.
  69. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Rotts I, Erchelbaum M and Brinkann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-8.
  70. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV and Gottesman MM. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525-8.
  71. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-62.
  72. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinssey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG and Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-99.
  73. Masuda S, Goto M, Fukatsu S, Uesugi M, Ogura Y, Oike F, Kiuchi T, Takada Y, Tanaka K and Inui K. 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.
  74. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N and Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1137-43.

75. Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fijimoto S, Matsuo M, Kasua M and Okumura K. Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1356-9.
76. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB and Telenti A. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30-6.
77. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Parrot JY, Tang R, Chaoui D, Morjani H, Marzac C, Marie JP and Legrand O. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:7764-72.
78. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brikmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW and Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003;348:1442-8.
79. Potocnik U, Ferkolj I, Glavac D, Dean M. Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004;5:530-9.
80. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M and Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11:293-8.
81. Drescher S, Schaeffeler E, Hitzl M, Hoffmann U, Schwab M, Brinkmann U, Eichelbaum M and Fromm MF. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:526-34.
82. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, Carter ND, Golberg L, Holt DW and MacPhee IA. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006;82:705-8.
83. 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;47:1048-52.
84. Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR, and Meibohm B. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003;43:555-64.
85. Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJ. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics* 2003;13:89-95.
86. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C and Thervent E. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1889-96.
87. <http://www.ensembl.org/index.html>. Revisado en abril 2010.
88. <http://frodo.wi.mit.edu/>. Revisado en abril 2010.
89. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Revisado en diciembre 2011.

90. <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>. Revisado en mayo 2012.
91. Rodríguez S, Gaunt TR and Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol Adv Access* published 2009. DOI:10.1093/aje/kwn359.
92. Dorado P, Sosa-Macías MG, Peñas-Lledo EM, Alanis-Bañuelos RE, Wong ML, Licinio J, Lares\_Aseff I and Lerena A. CYP2C9 allele frequency differences between populations of Mexican-Mestizo, Mexican-Tepehuano, and Spaniards. *Pharmacogenomics J* 2010;11:108-12.
93. López-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltrán Catalán S, Milara Paya J, Pallardo Mateu LM, Jiménez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc* 2010;42:3031-3.
94. Marcen R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009;69:2227-43.
95. Millán O, Brunet M, Campistol JM, Faura A, Rojo I, Vidal E, Jiménez O, Vives J, Oppheimer F and Monrell J. Pharmacodynamic approach to immunosuppressive therapies using calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil. *Clin Chem* 2003;49:1891-9.
96. Coto E, Tavira B. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in renal transplantation. *Transplantation* 2009;88:S62-7.
97. Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA, van Hoff JP, van Dieijen-Visser MP and Bekers O. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:427-35.
98. Zhao Y, Song M, Guan D, Bi S, Meng J, Li Q and Wang W. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005;37:178-81.
99. Tirelli S, Ferrareso M, Ghio L, Meregalli E, Martina V, Belingheri M, Mattiolo C, Torresani E and Edefonti A. The effect of CYP3A5 polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in adolescent kidney transplant recipients. *Med Sci Monit* 2008;14:CR251-254.
100. Satoh S, Kagaya H, Saito M, et al. Inoue T, Miura M, Inoue K, Numakura K, Tsuchiya N, Tada H, Suzuki T and Habuchi T. Lack of tacrolimus circadian pharmacokinetics and CYP3A5 pharmacogenetics in the early and maintenance stages in Japanese renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:207-14.
101. Tada H, Tsuchiya N, Satoh S, Kagaya H, Li Z, Sato K, Miura M, Suzuki T, Kato T and Habuchi T. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005;37:1730-2.
102. Cheung CY, Op den Buijsch RA, Wong KM, Chan HW, Chau KF, Li CS, Leung KT, Kwan TH, de Vries JE, Wijnen PA, van Dieijen-Visser MP, and Bekers O. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2006;7:563-74.
103. Anglicheau D, Legendre C, Thervet E. Pharmacogenetics of tacrolimus and sirolimus in renal transplant patients: from retrospective analyses to prospective studies. *Transplant Proc* 2007;39:2142-4.
104. Haufroid V, Wallemacq P, VanKerckhove V, Elens L, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J Lison D and Mourad M. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and

- tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant* 2006;6:2706-13.
105. Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de fijter JW and Gauchelaar HJ. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2009;31:187-97.
  106. Fojo AT, Shen DW, Mickley LA, Pastan I, Gottesman MM. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J Clin Oncol* 1987;5:1922-7.
  107. Kaya P, Gunduz U, Arpaci F, Ural AU, Guran S. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol* 2005;80:26-34.
  108. Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Pharmacogenomics* 2003;4:397-410.
  109. Choi JH, Lee YJ, Jang SB, Lee JE, Kim KH, Park K. Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2007;64:185-91.
  110. Zhao W, Elie V, Roussey G, Brochard K, Niaudet P, Leroy V, Loirant C, Cochat P, Cloarec S, André JL, Garaix F, Bensman A, Fakhoury M and Jacqz-Aigrain E. Population pharmacokinetics and pharmacogenetics of tacrolimus in de novo pediatric kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86:609-18.
  111. Siegmund W, Ludwig K, Giessmann T, Dazert P, Schroeder E, Sperker B, Warzok R, Kroemer HK and Cascorbi I. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:572-83.
  112. Goto M, Masuda S, Saito H, Uemoto S, Kiuchi T, Tanaka K and Inui K. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002;12:451-7.
  113. Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J, Yan S, Zheng S and Zhou L. Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese liver transplant recipients. *PLoS One* 2011;6:e25933.
  114. Hitzl M, Schaeffeler E, Hocher B, Slowinski T, Halle H, Eichelbaum M, Kaufmann P, Fritz P, Fromm MF and Schwab M. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004;14:309-18.
  115. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, Budde K, Kuypers DR, Pisarski P, Le Meur Y, Mamelok RD and van Gelder T. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:339-48.
  116. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:659-65.
  117. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1794:860-71.

118. Cosio FG, Grande JP, Wadei H, Larson TS, Griffin MD, Stegall MD. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. *Am J Transplant* 2005;5:2464-72.
119. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der werf M, Gregoor PJ, Lindermans J, Weimar W and van Gelder T. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:245-54.
120. Katoh SY, Ueno M, Takakura N. Involvement of MDR1 function in proliferation of tumour cells. *J Biochem* 2008;143:517-24.
121. Robinson LJ, Roberts WK, Ling TT, Lamming D, Sternberg SS, Roepe PD. Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry* 1997;36:11169-78.
122. Petruzzo P, Cappai A, Brotzu G, Batetta B, Putzolu M, Mulas MF, Bonatesta RR, Sanna F and Dessi S. Lipid metabolism and molecular changes in normal and atherosclerotic vessels. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2001;22:31-6.
123. Huls M, Schoeber JP, Verfaillie CM, Luttun A, Ulloa-Montoya F, Menke AL, van Bolderen LR, Eoestenek RM, Merckx GF, Wetzels JF, Russel FG and Masereeuw R. Deficiency of either P-glycoprotein or breast cancer resistance protein protect against acute kidney injury. *Cell Transplant* 2010;19:1195-208.
124. Moore J, McKnight AJ, Dohler B, Simmonds MJ, Courtney AE, Brand OJ, Briggs D, Cockwell P, Patterson CC, Maxwell AP, Gough SC, Opelz G and Borrow R. Donor ABCB1 Variant Associates with Increased Risk for Kidney Allograft Failure. *J Am Soc Nephrol*;23:1891-9.
125. MD IHM. Asociación del polimorfismo 6986A>G de CYP3A5 y el nivel sérico de ciclosporina en pacientes con trasplante renal. Facultad de Medicina. Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas. . Colima, México: Universidad de Colima,, 2009:1-63.
126. López-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltrán Catalán S, Milara Paya J, Pallardo Mateu LM, Jiménez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc*;42:3031-3.
127. Rosso CF, Veras TS, Mendia ELS, Park SI, Tedesco HS, PJO. M. Clinical impact of polymorphism of transport proteins and enzymes involvrd in the metabolism of immunosuppressive drugs. *Transplant Poceeding* 2009;41:1441-45.
128. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:2468-80.
129. Woillard JB, Rerolle JP, Picard N, Rousseau A, Guillaudeau A, Munteanu E, Essig M, Douet M, Le Meur Y, Marquet P. 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.

## **ANEXOS 1**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Título del estudio: ESTUDIO MULTICENTRICO DE LA CORRELACIÓN DEL GENOTIPO *MDR1(ABCB1)* Y *CYP3A5* CON EL PERFIL FARMACOCINÉTICO DEL TACROLIMUS EN NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL.

Introducción. Deseamos invitarlo a participar en este estudio de investigación que se llevará a cabo en el Hospital Infantil de México.

Su participación es voluntaria. Usted puede decidir no participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento. En cualquier caso no perderá ninguna forma de atención médica en el Hospital.

La información puede proporcionar información que ayude, en el futuro inmediato a otros niños con la misma enfermedad que la de su hijo(a).

Antes de decidir participar, lea con cuidado el presente documento y tómese el tiempo que requiera para realizar cualquier pregunta o discutir este estudio con cualquier persona que participe en la investigación, con su familia o con cualquier otro profesional de la salud.

Finalidad del estudio.

El tacrolimus es un medicamento que su hijo(a) recibe para prevenir el rechazo del riñón trasplantado. El uso de este medicamento requiere que se vigilen los niveles en sangre ya que niveles bajos pueden favorecer el rechazo y niveles altos toxicidad.

Se sabe que los niveles del medicamento pueden variar en cada persona dependiendo de las enzimas que se encargan de sacarlo de la sangre y la cantidad de la enzima esta determinada por la genética.

El propósito del estudio es estudiar los genes que regulan las enzimas que participan en la absorción y el metabolismo del tacrolimus en sangre y los efectos adversos del medicamento.

Procedimiento del estudio.

Si usted acepta que su hijo participe en este estudio solamente se le pinchará una vena del brazo, se hará un estudio para ver como maneja el cuerpo el medicamento (tacrolimus) para esto se toman 9 muestras de sangre en un periodo de 12 h, con un volumen total de 18 mL, y se medirán los niveles del medicamento, también se extraerá el ADN para el estudio genético.

Riesgo y molestias.

Su niño puede presentar dolor en el sitio de la punción venosa; este dolor cede en los siguientes minutos después de la punción.

Beneficios

El conocer el genotipo de las enzimas que manejan el tacrolimus permitirá ajustar mejor la dosis del medicamento.

Procedimientos alternativas y costos

La obtención de la muestra y todo el estudio no tendrá costo para usted.

Accesibilidad de los investigadores y confidencialidad

Los médicos que atienden a su hijo estarán en todo momento dispuestos a responder a todas sus preguntas e inquietudes respecto a los resultados del estudio que se realizará a su hijo.

En todo momento se mantendrá la confidencialidad de los resultados de los exámenes practicados en las muestras de su hijo. La información que nos proporcione y la que resulte de las pruebas, será manejada con absoluta confidencialidad y sólo para los fines de esta investigación. Usted y los médicos conocerán los resultados del estudio para mejorar el tratamiento de su hijo(a).

Durante el estudio usted recibirá información de los resultados que se vayan obteniendo del mismo, con el fin de actualizar ante usted la información científica al respecto para que usted pueda tomar las decisiones siguientes con mayor fundamento.

Normas acerca de las lesiones relacionadas con la investigación

Cualquier efecto colateral que se derive de la toma de la muestra de sangre será atendido prontamente con los recursos del Hospital.

Problemas o preguntas

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o cualquier situación relacionada con la misma, debe comunicarse con los médicos que participan en el estudio Dra Mara Medeiros Domingo del Departamento de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez tel 5228-9917 extensión 2366.

Documento de consentimiento

Usted puede decidir no participar en el estudio. En cualquier caso, no perderá ninguna prestación a la que tenga derecho. Le sugerimos que conserve copia de este documento para consultarlo posteriormente.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en el estudio.

---

Nombre y firma del sujeto de estudio, madre o tutor o responsable del niño

---

Testigo: Nombre dirección, relación con el niño, firma

---

Testigo: Nombre dirección, relación con el niño, firma

Nombre del investigador principal en donde puede referir el familiar en caso de duda:  
Dra Mara Medeiros Domingo. Departamento de Nefrología en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tel 5228-9917 ext 2366.

## ANEXOS 2

### HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

CORRELACIÓN DEL GENOTIPO *MDR1(ABCB1)* Y *CYP3A5* CON EL PERFIL FARMACOCINÉTICO del tacrolimus EN NIÑOS CON TRASPLANTE RENAL.

Formato de datos clínicos del paciente

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Nombre \_\_\_\_\_

No. Registro \_\_\_\_\_

Género: Masculino (\_\_\_) Femenino (\_\_\_)

Fecha de Nacimiento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

Fecha del trasplante \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_. DVR (\_\_\_) \_\_\_\_\_  
DF (\_\_\_)

Edad \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ TA \_\_\_\_\_

#### Biometría hemática

Hemoglobina \_\_\_\_\_ g/dl Hematocrito \_\_\_\_\_% Basofilos \_\_\_\_\_%  
Eosinofilos \_\_\_\_\_% Mielocitos \_\_\_\_\_% Juveniles \_\_\_\_\_%  
Bandas \_\_\_\_\_% Plaquetas \_\_\_\_\_ Linfocitos \_\_\_\_\_ Monocitos \_\_\_\_\_  
Blastos \_\_\_\_\_

#### General de orina

Aspecto y color \_\_\_\_\_ pH \_\_\_\_\_  
Densidad \_\_\_\_\_ Albúmina \_\_\_\_\_ gm/L Glucosa \_\_\_\_\_ Acetona \_\_\_\_\_  
Hemoglobina \_\_\_\_\_ Bilirrubina \_\_\_\_\_  
Eritrocitos \_\_\_\_\_ Leucocitos \_\_\_\_\_ Cilindros \_\_\_\_\_ Cristales \_\_\_\_\_  
Otros \_\_\_\_\_  
Glucosuria \_\_\_\_\_ gm/L Cuenta minutada \_\_\_\_\_ Cel. epiteliales \_\_\_\_\_  
Bacterias \_\_\_\_\_

#### Funcionamiento hepático

Bilirrubinas: Directa \_\_\_\_\_ mg Indirecta \_\_\_\_\_ mg Total \_\_\_\_\_ mg  
Proteínas totales \_\_\_\_\_  
Albuminas \_\_\_\_\_ gm Globulinas \_\_\_\_\_ gm Transaminasas glutamico-oxalacetica \_\_\_\_\_ U

Glutamico piruvica\_\_\_\_\_U

Química sanguínea

Bun\_\_\_\_\_ Ac. urico\_\_\_\_\_ Creatinina\_\_\_\_\_ Glucemia\_\_\_\_\_  
Colesterol\_\_\_\_\_ Electrolitos séricos: Cloro\_\_\_\_\_ Sodio\_\_\_\_\_  
Potasio\_\_\_\_\_ Triglicéridos\_\_\_\_\_

Antiginemia

CMV\_\_\_\_\_ EBK\_\_\_\_\_ BKV\_\_\_\_\_ Otra  
infección\_\_\_\_\_

FARMACO	DOSIS	DOSIS PONDERAL	MARCA
TACROLIMUS			
MMF			
PDN			
VERAPAMIL			
PRAZOCIN			
OMEPRAZOL			
TMP/SMZ			
CICLOSPORINA			
OTROS			

RUTA CRITICA DEL MEDICAMENTO

Nombre \_\_\_\_\_

No. Registro \_\_\_\_\_

Fecha de examen \_\_\_\_\_

<b>DIA ANTERIOR A LA TOMA DE MUESTRA</b>		
<b>Medicamentos que tomo:</b>		<b>Hora de la toma:</b>
<b>Cenó: si</b>	<b>¿Qué cenó?</b>	<b>Hora:</b>
<b>no</b>		
<b>TOMA DE MUESTRA</b>		
<b>Ingreso al hospital</b>		<b>Hora real</b>
<b>Instalar catéter y toma de muestra de sangre predosis. Colocar el adaptador para toma múltiple con previa purga de solución de heparina.</b>	Muestra 0	
<b>ADMINISTRACIÓN del tacrolimus O CICLOSPORINA Hora:</b>		
<b>Muestra de sangre de 0.5 hora</b>	Muestra 1	
<b>Muestra de sangre de 1 hora</b>	Muestra 2	
<b>DESAYUNO LIGERO</b>		
<b>Muestra de sangre de 2 horas</b>	Muestra 3	
<b>Muestra de sangre de 3 horas</b>	Muestra 4	
<b>Muestra de sangre de 4 horas</b>	Muestra 5	
<b>Muestra de sangre de 5 horas</b>	Muestra 6	
<b>Muestra de sangre de 6 horas</b>	Muestra 7	
<b>Muestra de sangre de 8 horas</b>	Muestra 8	
<b>Muestra de sangre de 12 horas</b>	Muestra 9	

Observaciones:

QuickTime™ and a  
TIFF (LZW) decompressor  
are needed to see this picture.

**Anexo 3**

QuickTime™ and a  
TIFF (LZW) decompressor  
are needed to see this picture.

*M en C Maria Inés del Pilar García Roca.*

*M en C Maria Inés del Pilar García Roca.*

El presente trabajo se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, en el Laboratorio de Investigación en Nefrología y Metabolismo Mineral Óseo y el Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Mara Medeiros Domingo y el Dr. Gilberto Castañeda Hernández. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número 2008/COI/87381, así como por Fondos Federales otorgados por la Secretaría de Salud con el número HIM/2008/020 y beca CONACYT 215813.

## Agradecimientos

A mis padres Fernando García Ramírez y María Elena Roca de García, por los valores enseñados, la dedicación, el esfuerzo, el amor y la comprensión, brindados a lo largo de mi vida.

A mis hermanos Everardo, Carmen, Rosario, Fernando, Raúl, Juan Ignacio y Víctor, quienes me acompañaron a lo largo de este camino.

A mis cuñados, sobrinos y nietos con todo mi amor.

A la Dra. Mara Medeiros, por su ejemplo, enseñanzas, apoyo y orientación que me condujeron al camino de la superación académica.

Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández por sus enseñanzas.

A los integrantes de mi Comité Tutorial: Dr. Guillermo Elizondo Azuela, a la Dra. Liliana Favari Perozzi, al Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, al Dr. Carlos Hoyo Vadillo, al Dr. José Luis Reyes Sánchez, al Dr. Jorge Alberto Sánchez Rodríguez por sus valiosas aportaciones al mejoramiento de este escrito.

Al personal del Laboratorio de Investigación en Nefrología y Central, en especial a Germán Sosa Cárdenas, Alfredo Mendoza Chávez y M en C Herlinda Reyes Pérez por su ayuda en la toma de muestras y procesamiento de muestras.

Al M en C Benjamín Rodríguez Espino, Dr. Saúl Valverde Rosas y al Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández por los conocimientos y apoyo otorgados durante la realización de este trabajo.

Por su respaldo y amistad a Armando López González, Héctor Moreno Hernández, Sandra Olivas y Mariela Esparza.

A la Bióloga Alejandra Bernabé Moctezuma † por su fortaleza ante los momentos difíciles.

Al CINVESTAV, al Hospital Infantil de México Federico Gómez y CONACYT. Por los recursos brindados para la realización del presente estudio.

*M en C María Inés del Pilar García Roca*

Dedico el presente trabajo, a los niños que acuden al Hospital Infantil de México Federico Gómez de quienes aprendo día a día, y son una constante motivación en mi vida.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pag.

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>V</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>3</b>
1.1. Enfermedad renal y trasplante renal .....	<b>3</b>
1.2. Tacrolimus.....	<b>7</b>
1.2.1 Química .....	<b>7</b>
1.2.2 Dosis .....	<b>8</b>
1.2.3 Farmacocinética .....	<b>9</b>
1.2.3.1 Absorción.....	<b>9</b>
1.2.3.2 Distribución.....	<b>9</b>
1.2.3.3 Metabolismo (biotransformación).....	<b>10</b>
1.2.3.4 Eliminación .....	<b>11</b>
1.2.4 Farmacodinamia.....	<b>13</b>
1.2.4.1 Mecanismo de acción .....	<b>13</b>
1.2.4.2 Interacciones farmacológicas .....	<b>14</b>
1.2.4.3 Efectos adversos y toxicidad .....	<b>14</b>
1.2.5 Métodos de detección del tacrolimus .....	<b>14</b>
1.3 Citocromo P450 y metabolismo del tacrolimus.....	<b>15</b>
1.3.1 Subfamilia CYP3A .....	<b>17</b>
1.4. Glicoproteína-P .....	<b>18</b>
<b>2. Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>23</b>
<b>4. Objetivo general</b> .....	<b>23</b>
<b>5. Objetivos particulares</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Material y métodos</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1 Primera etapa. Estandarización</b> .....	<b>24</b>
6.1.1 Purificación del ADN.....	<b>24</b>
6.1.2 Diseño de oligonucleótidos.....	<b>24</b>
6.1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	<b>25</b>
6.1.4 Purificación de los productos de PCR .....	<b>28</b>
6.1.5 Reacción de secuenciación .....	<b>29</b>
<b>6.2 Primera etapa. Frecuencias del genotipo CYP3A5</b> .....	<b>31</b>
6.2.1 Diseño del estudio .....	<b>31</b>
6.2.2 Aspectos éticos .....	<b>31</b>
6.2.3 Población de pacientes.....	<b>31</b>
6.2.3.1 Criterios de exclusión .....	<b>31</b>
6.2.3.2 Criterios de eliminación .....	<b>31</b>
6.2.4 Muestras y métodos .....	<b>32</b>
6.2.5 Análisis estadístico .....	<b>32</b>
<b>6.3 Segunda etapa</b> .....	<b>33</b>
6.3.1 Diseño del estudio .....	<b>33</b>
6.3.2 Aspectos éticos .....	<b>33</b>

6.3.3 Selección de pacientes.....	33
6.3.3.1 Criterios de exclusión .....	33
6.3.3.2 Criterios de eliminación .....	33
6.3.4 Variables.....	34
6.3.5 Tamaño de la muestra.....	34
6.3.8 Población de estudio .....	34
6.3.9 Análisis estadístico .....	35
<b>7. Resultados .....</b>	<b>36</b>
7.1 Primera Fase. Estandarización.....	36
7.2. Segunda Fase: Primera etapa. Frecuencia del gen <i>CYP3A5</i> ....	40
7.3 Segunda Fase. Segunda etapa: Farmacocinética y genotipo ....	43
<b>8. Discusión .....</b>	<b>72</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>79</b>
<b>10. Limitaciones del estudio.....</b>	<b>80</b>
<b>11. Estudios propuestos.....</b>	<b>81</b>
<b>12. Referencias.....</b>	<b>82</b>
<b>13. Anexos .....</b>	<b>90</b>
13.1 <b>Anexos 1. Carta de Consentimiento Informado .....</b>	<b>90</b>
13.2 <b>Anexos 2. Hoja de Recolección de Datos.....</b>	<b>93</b>
13.3 <b>Anexos 3. Carta de Aprobación Institucional .....</b>	<b>96</b>
13.4 <b>Anexos 4. Carta de Aprobación de Comités .....</b>	<b>97</b>
13.5 <b>Anexos 5. Artículo Publicado.....</b>	<b>98</b>

ÍNDICE DE TABLAS	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Fármacos empleados en el post-trasplante .....	6
<b>Tabla 2.</b> Niveles objetivo del tacrolimus.....	9
<b>Tabla 3.</b> Datos farmacocinéticos del tacrolimus.....	12
<b>Tabla 4.</b> Primers y Tm de los genes <i>CYP3A5</i> , <i>MDR1</i> .....	26
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de PCR.....	27
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de la reacción de secuenciación .....	29
<b>Tabla 7.</b> Datos demográficos en 291 pacientes con trasplante renal.....	40
<b>Tabla 8.</b> Genotipo <i>CYP3A5</i> y frecuencia alélica en 291 pacientes mexicanos con trasplante renal.....	41
<b>Tabla 9.</b> Dosis del tacrolimus para alcanzar niveles sanguíneos en valle . .....	41
<b>Tabla 10.</b> Datos demográficos de pacientes pediátricos con trasplante renal. ..	44
<b>Tabla 11.</b> Frecuencia del genotipo y alelos del gen <i>CYP3A5</i> en 51 niños.....	47
<b>Tabla 12.</b> Farmacocinética del tacrolimus y genotipo <i>CYP3A5</i> en niños con trasplante renal. ....	48
<b>Tabla 13.</b> Determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg para el genotipo <i>CYP3A5</i> en niños .....	50
<b>Tabla 14.</b> Relación entre el genotipo <i>CYP3A5</i> y el rechazo, la hipertensión y la velocidad de filtración glomerular a doce meses post-trasplante. ....	51
<b>Tabla 15.</b> Seguimiento de los niveles en valle del tacrolimus según el genotipo <i>CYP3A5</i> .....	51
<b>Tabla 16.</b> Frecuencias alélicas del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exones 12, 21 y 26 en niños con trasplante renal. ....	56
<b>Tabla 17.</b> Equilibrio Hardy-Weinberg para <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12 en pacientes pediátricos con trasplante renal. ....	58
<b>Tabla 18.</b> Farmacocinética del tacrolimus y genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12 en 51 niños. ....	59
<b>Tabla 19.</b> Equilibrio Hardy-Weinberg para el gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 21. ....	61
<b>Tabla 20.</b> Farmacocinética del tacrolimus y genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 21..	62
<b>Tabla 21.</b> Equilibrio de Hardy-Weinberg para <i>MDR1(ABCB1)</i> para el exón 26.	64
<b>Tabla 22.</b> Farmacocinética del tacrolimus y genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 26..	65
<b>Tabla 23.</b> Farmacocinética del tacrolimus y haplotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exones 12, 21 y 26. Valores mediana (intervalo).....	67
<b>Tabla 24.</b> Haplotipos del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> y la presentación del rechazo agudo, la hipertensión y la velocidad de filtración glomerular a 12 meses post-trasplante renal.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Pag.

<b>Figura 1.</b> Esquema de las vías de activación de linfocitos T. ....	<b>5</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura química del tacrolimus.....	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b> Importancia de la gp-P en la absorción del tacrolimus a nivel gastrointestinal.....	<b>11</b>
<b>Figura 4.</b> Disolución, absorción, metabolismo y eliminación del tacrolimus . ....	<b>12</b>
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción del tacrolimus.....	<b>13</b>
<b>Figura 6.</b> Nomenclatura de CYP450.....	<b>15</b>
<b>Figura 7.</b> Proporción del contenido de CYP en el hígado.....	<b>16</b>
<b>Figura 8.</b> Diferentes exones del gen que codifica a la glicoproteína-P.....	<b>20</b>
<b>Figura 9.</b> Condiciones para la amplificación (genes <i>CYP3A5</i> y <i>MDR1</i> ) .....	<b>28</b>
<b>Figura 10.</b> Electroforesis de la estandarización de la concentración de MgCl <sub>2</sub> .	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b> Electroforesis del gen <i>CYP3A5</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b> Electroforesis del gen <i>MDR1</i> exón 12.....	<b>38</b>
<b>Figura 13.</b> Electroforesis del gen <i>MDR1</i> exones 21 y 26.....	<b>39</b>
<b>Figura 14.</b> Representación gráfica de las frecuencias genotípicas en diferentes poblaciones .....	<b>42</b>
<b>Figura 15.</b> Causas de la pérdida de los riñones nativos en los 51 pacientes participantes.....	<b>45</b>
<b>Figura 16.</b> Electroferogramas del polimorfismo intrónico del gen <i>CYP3A5</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 17.</b> Curva de concentración del tacrolimus versus tiempo según el genotipo <i>CYP3A5</i> en 51 niños con trasplante renal .....	<b>50</b>
<b>Figura 18.</b> Polimorfismo <i>CYP3A5</i> en diferentes poblaciones .....	<b>52</b>
<b>Figura 19.</b> Electroferogramas de los polimorfismos del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12.....	<b>53</b>
<b>Figura 20.</b> Electroferogramas de los polimorfismos presentes en el gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 21 .....	<b>54</b>
<b>Figura 21.</b> Electroferogramas de los polimorfismos en el gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 26.....	<b>55</b>
<b>Figura 22.</b> Curva de concentración del tacrolimus contra tiempo de acuerdo al genotipo <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12.....	<b>57</b>
<b>Figura 23.</b> Niveles del tacrolimus normalizados por la dosis administrada a 51 pacientes pediátricos con respecto al tiempo.....	<b>60</b>
<b>Figura 24.</b> Concentración del tacrolimus con respecto al genotipo <i>MDR1</i> exón 26 en 51 niños trasplantados .....	<b>63</b>
<b>Figura 25.</b> Curva de concentración del tacrolimus contra tiempo según haplotipo del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exones 12, 21 y 26 en 51 niños .....	<b>66</b>
<b>Figura 26.</b> Frecuencia en los polimorfismos del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 12 en diferentes poblaciones.....	<b>69</b>
<b>Figura 27.</b> Frecuencia en los polimorfismos del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 21 en diferentes poblaciones.....	<b>70</b>
<b>Figura 28.</b> Representación gráfica de la frecuencia en los polimorfismos del gen <i>MDR1(ABCB1)</i> exón 26 en diferentes poblaciones.....	<b>71</b>

## ABREVIATURAS

A	Base nitrogenada adenina
AA	Afroamericanos
ABC	Familia de genes ATP binding cassette
ABC	Área Bajo la Curva de la concentración plasmática contra tiempo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ATP	Adenosintrifosfato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Asiáticos
bp	Par(es) de base(s)
C	Base nitrogenada citosina
CAU	Caucásicos
CYP	Citocromo P450
°C	Grado Celsius o centígrado
C <sub>0</sub>	Concentración en valle del fármaco
C <sub>min</sub>	Concentración mínima del fármaco
C <sub>max</sub>	Concentración máxima de fármaco
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
D	Dosis
d	Día
EDTA-K2	Etilén diamino tetracético dipotásico
ERCT	Enfermedad Renal Crónica Terminal
DVR	Donador vivo relacionado
DF	Donador fallecido o donador cadavérico
FKBP	Proteína de unión a tacrolimus
g	Gramo
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito macrófago
G	Base nitrogenada guanina
h	Hora
HLA	Antígeno linfocitario humano del complejo mayor de histocompatibilidad
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IRC	Insuficiencia renal crónica
IFN <sub>γ</sub>	Interferón gama
IL-2	Interleucina 2
IC	Inhibidor de calcineurina
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kg	Kilogramo
KDa	Kilodaltones

L	Litro
MEX	Mexicanos
min	Minutos
mg	Miligramos
$\mu$ L	Microlitros
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
MDR1	Gene de multiresistencia a fármacos 1
NFAT	Factor nuclear activador de linfocitos T
ng	Nanogramos
n	Tamaño de muestra
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P-gp	Glicoproteína-P
pM	Picomolar
pmol	Picomoles
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo en una sola base
T	Base nitrogenada timina
Tac	Tacrolimus
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
Tmax	Tiempo máximo
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media, tiempo medio de eliminación
TR	Trasplante renal
Vd	Volumen de distribución
UV	Ultravioleta
VFG	Volumen de Filtración Glomerular