



## UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología.

### VARIABILIDAD FARMACOCINÉTICA EN PACIENTES CON TRASPLANTE RENAL TRATADOS CON CICLOSPORINA: EVALUACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS COMO COVARIABLES.

Tesis para la obtención del título de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

**B.Q. FERNANDO JAVIER CORVALÁN NAZAL**

**DIRECTOR: DR. LUIS QUIÑONES SEPÚLVEDA PhD**

**CO-DIRECTOR: JUAN PABLO CAYUN PhD (C)**

Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF), Departamento de Oncología Básico-Clinico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**SANTIAGO, DICIEMBRE DE 2017**

## Tabla de contenidos

ABREVIACIONES .....	V
RESUMEN .....	VI
SUMARY.....	VII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Trasplante renal .....	1
1.2 Manejo del paciente trasplantado .....	1
1.3 Mecanismos de acción y toxicidad de Ciclosporina .....	2
1.4. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE CICLOSPORINA .....	3
1.5. POSOLOGÍA Y MONITORIZACIÓN DE CICLOSPORINA .....	3
1.6. EVIDENCIA FARMACOGENÓMICA.....	4
1.6.1. CYP3A4 Y CYP3A5 .....	4
1.6.2. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS .....	6
2. HIPOTESIS .....	7
3. OBJETIVOS .....	7
3.1. Objetivo general.....	7
3.2. Objetivos específicos.....	7
4. VOLUNTARIOS, MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
4.1. DISEÑO DE ESTUDIO.....	8
4.1.1. Tipo de estudio y variables de evaluación .....	8
4.1.2. Pacientes .....	8
4.1.3. Criterios de elegibilidad.....	8
4.2. CONCENTRACIÓN DE CICLOSPORINA.....	9
4.3. REVISIÓN DE FICHAS CLÍNICAS Y SEGUIMIENTO CLÍNICO .....	9
4.4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN .....	9
4.5. ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	10
4.5.1. Análisis de variantes genéticas mediante discriminación alélica con sondas <i>TaqMan</i> . .	10
4.6. ASPECTOS ÉTICOS.....	10
4.7. ANÁLISIS ESTADISTICO .....	10
5. RESULTADOS .....	11
5.1. PACIENTES .....	11
5.2. TERAPIA FARMACOLÓGICA Y EVENTOS ADVERSOS.....	12
5.3. ANALISIS GENOTIPICO .....	14

5.4 CORRELACIÓN ENTRE LA DOSIFICACIÓN Y LOS NIVELES SANGUINEOS DE CICLOSPORINA SOBRE LOS NIVELES DE CREATININEMIA Y PRESIÓN ARTERIAL.....	16
5.4.1 Correlación entre dosis y concentración ajustada de Csa.....	16
5.4.2 Correlación entre Concentración de CsA y creatinemia .....	17
5.4.3 Correlación entre Concentración de Csa y presión arterial. ....	19
5.4.4 Correlación entre grado de creatinina y C2.....	22
5.4.5 Correlación entre Isquemia Fría y creatinina. ....	22
5.5 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE LA RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA DE CICLOSPORINA.....	23
5.5.1 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de dosificación y niveles sanguíneos de ciclosporina durante los 3 primeros meses. ....	23
5.5.2 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de creatininemia durante los 3 primeros meses .....	31
5.5.3 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de presión arterial durante los primeros 3 meses .....	31
5.5.4 Asociación entre polimorfismos genéticos y aparición de eventos adversos.....	37
6. DISCUSIÓN .....	38
7 REFERENCIAS .....	41
8 ANEXOS.....	46
ANEXO I CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	46
ANEXO II Formulario de reportes de casos (CRFI), .....	50
ANEXO III FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFII).....	52
ANEXO IV FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFIII).....	53
ANEXO V FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFIV) .....	54
ANEXO VI FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFV) .....	55
ANEXO VII TRASLADO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DESDE EL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS AL LABORATORIO CQF.....	56
ANEXO VIII ANÁLISIS GENOTÍPICO .....	57
ANEXO IX REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS SIGNIFICATIVOS.....	58

## Listado de Figuras

Figura N°1 Mecanismo acción ciclosporina .....	3
Figura N°2 Parámetros de medición promedio durante los 3 primeros meses de tratamiento .....	12
Figura N° 3 Efectos adversos registrados_ .....	13
Figura N°4A Alteración en los niveles de creatinina .....	13
Figura N°4B Alteración en los niveles de presión arterial sistólica .....	13
Figura N°5 Comparación de medias entre Nivel de Dosis a diferentes tiempos y C0 (A) C2(B) .....	16
Figura N°6 Correlación entre promedio de Dosis, C0 y C2.....	17
Figura N°7 Correlación entre Nivel de Creatinina a diferentes tiempos y C0 (A) y C2 (B) .....	18
Figura N°8 Correlación entre promedio de Creatinina y Dosis, C0 y C2 .....	19
Figura N°9 Correlación entre Presión arterial a diferentes tiempos y C0 (A) y C2 (B) .....	20
Figura N°10 Correlación entre promedio de Presión arterial y Dosis, C0 y C2 .....	21
Figura N°11 Comparación de medias entre la C2 y los niveles de creatinina según rango .....	22
Figura N°12 Correlación entre IF a la primera semana y C2 .....	23
Figura N°13 Niveles de creatinina de los tres meses en portadores de CYP3A4*1B .....	32
Figura N°14 Promedio de niveles de presión sistólica de tres meses en portadores de MDR 1 2677 .....	32

## Listado de Tablas

Tabla N°1 Polimorfismos en genes candidatos que afectan la farmacocinética de Inhibidores de Calcineurina.....	10
Tabla N°2 Características de los pacientes.....	11
Tabla N° 3 Frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes trasplantados renales para los diferentes polimorfismos_ .....	15
Tabla N°4 Frecuencia de la cantidad de SNP que presentó cada paciente.....	15
Tabla N°5 Análisis de comparación de medias de dosis según genotipos .....	26
Tabla N°6 Análisis de comparación de medias de concentración C0 según genotipos .....	28
Tabla N°7 Análisis de comparación de medias de concentración C2 según genotipos .....	30
Tabla N°8 Análisis de comparación de medias de creatininemia según genotipos .....	34
Tabla N°9 Análisis de comparación de medias de presión arterial sistólica según genotipos.....	36
Tabla N°10 Presentación de efectos adversos con respecto al genotipo .....	38

## ABREVIACIONES

- Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).
- Agencia Europea de Medicamentos (EMA)
- Análisis de Varianza (ANOVA).
- Buenas Prácticas Clínicas (BPC)
- Centro Nacional de Información de Medicamentos y Farmacovigilancia (CENIMEF)
- Comité de Evaluación Ético-Científico (CEEC)
- Conferencia Internacional de Armonización (ICH)
- Consentimiento Informado (CI)
- Evento adverso (EA)
- Evento Adverso Serio (EAS)
- Reacción Adversa a Medicamento (RAM)
- Formulario de Reporte de Casos (CRF).
- Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).
- Ministerio de Salud de Chile (MINSAL).
- Organización Mundial de la Salud (OMS, WHO).
- Procedimiento Operacional Estándar (POE).
- CsA: Ciclosporina.
- CYP: Citocromo P450 (*del inglés Cytochrome P450*).
- MDR1: *Multi drug Resistance Protein 1*.
- C<sub>0</sub>: Concentración previo a la dosis, 0 horas.
- C<sub>2</sub>: Concentración a las 2 horas posterior a la *dosis*.
- SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (*del inglés Single Nucleotide Polymorphism*).
- VFG: Velocidad de Filtración Glomerular.
- IRC: Insuficiencia Renal Crónica.
- IRCT: Insuficiencia Renal Terminal.
- RCT: Receptor de Célula T.
- NFAT: Nuclear Factor of Activated T-Cells.
- Mismatch: incompatibilidad HLA. Antígenos HLA presentes en el donante y ausentes en el receptor.
- CNIs: Inhibidores de la Calcineurina

## RESUMEN

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

En este estudio se investigó variantes genéticas involucradas en la metabolización y transporte de Csa que pueden afectar la farmacocinética de este fármaco, con el objetivo de establecer una relación entre el perfil farmacogenético de las variantes responsables de la metabolización de las ciclosporinas, las concentraciones sanguíneas de ciclosporina (CsA) y la seguridad y eficacia del tratamiento durante los primeros tres meses del tratamiento inmunosupresor. Para esto, pacientes trasplantados renales serán genotipificados para las variantes genéticas *CYP3A4\*1B* rs2740574, *CYP3A4\*22* RS25599367, *CYP3A5\*3* rs776746, *POR\*28* rs1057868, *MDR1 3435* rs1045642, *MDR1 2677* rs2032582 y *MDR1 1236* rs1128503 mediante qPCR utilizando sondas *TaqMan*. Los genotipos obtenidos se asociaron con las concentraciones sanguíneas de ciclosporina (CsA), los niveles de creatinina y presión arterial dentro de los primeros tres meses post-trasplante. De los análisis se obtuvo que los pacientes heterocigotos para *CYP3A4\*1B* presentaron un menor nivel de creatinina a partir de la segunda semana. En cuanto a la presión arterial se obtuvo que los pacientes heterocigotos de *MDR1 2677* presentaron mayores presiones arteriales a partir de la primera semana, así mismo se encontró una correlación positiva entre la isquemia fría y los niveles de creatinina en la primera semana. Finalmente, para las concentraciones ajustada de Csa se observó un aumento significativo para los pacientes tanto *het/mut* de *CYP3A5\*3*, a partir de la segunda semana.

## SUMMARY

Ciclosporin (CsA) is an immunosuppressant drug used to prevent organ rejection in transplant patients. However, this drug is characterized by have a narrow therapeutic range and high inter- and intra-individual pharmacokinetic variability, it is recommended to monitor this medication constantly to prevent adverse effects. Therefore, explaining, modeling and predicting the pharmacokinetic variability of CsA is of crucial importance to maximize the clinical outcomes of organ transplant patients. In addition, the impact on the pharmacokinetic variability of this drug in Chilean patients is unknown. In this study, we investigated genetic variants involved in the metabolism and transport of CsA and the effect on pharmacokinetics to make a profile of safety and efficacy of the treatment during the first three months of the immunosuppressive treatment. For this, kidney transplant patients were genotyped for the genetic variants *CYP3A4 \* 1B rs2740574*, *CYP3A4 \* 22 RS25599367*, *CYP3A5 \* 3 rs776746*, *POR \* 28 rs1057868*, *MDR1 3435 rs1045642*, *MDR1 2677 rs2032582* and *MDR1 1236 rs1128503* using qPCR using *TaqMan* probes. The genotypes were associated with blood levels of ciclosporin (CsA), creatinine levels and blood pressure within the first three months' post-transplant. Patients heterozygous for *CYP3A4 \* 1B* had a lower creatinine level from the second week. About blood pressure, heterozygous patients with *MDR1 2677* had higher blood pressures after the first week, and a positive correlation was found between cold ischemia and creatinine levels in the first week. Finally, for the adjusted Csa concentrations a significant increase was observed for Het / Mut patients of *CYP3A5 \* 3* from the second week.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Trasplante renal

El trasplante renal es un procedimiento quirúrgico para situar un riñón funcional desde un donante en un receptor, reemplazando un riñón que no funciona correctamente en un paciente con patología renal severa. Es el tratamiento de elección para los pacientes afectados de insuficiencia renal crónica terminal (Lillo, 2005). El riesgo de muerte es menos de la mitad comparando con los pacientes tratados con diálisis (Wolfe *et al.*, 1999).

En Chile, en el año 2015 la tasa de trasplante renal fue de 16,7 trasplantes por millón de habitantes y hasta ese mismo año en nuestro país se han realizado 7.565 trasplantes renales, sin embargo, 1.726 pacientes se encuentran aún en espera de un riñón (Instituto Salud Pública, n.d.) y de 7.025 pacientes trasplantados un 41% presentó un rechazo.

## 1.2 Manejo del paciente trasplantado

Los pacientes candidatos a trasplante antes del procedimiento quirúrgico son sometidos a diversos tipos de exámenes con el fin de evaluar el estado completo de salud y además tratar y controlar enfermedades tales como diabetes, hipertensión, anemia y otros. Entre estos exámenes, se incluyen del tipo inmunológico, cardíaco, sanguíneo, ginecológico y urológico. Además, se realizan interconsultas dentales, otorrinas y oftalmológicas para descartar cualquier tipo de infección en los órganos asociados (Lillo, 2005).

Uno de los principales problemas de los trasplantes en general, es que el sistema inmune reconoce el órgano trasplantado como foráneo y, por lo tanto, lo ataca conduciendo al rechazo del órgano. La activación del sistema inmune compromete dos vías. La vía directa compromete la activación de células T CD4+ por células presentadoras de antígenos del donante (APC). La vía indirecta compromete el procesamiento de los antígenos generados por el donante por las células APC del receptor que luego activan el sistema inmune. Además, se sabe que la presencia de células plasmáticas y células B CD20+ se asocian a injuria irreversible (Bhatti & Usman, 2015).

El tratamiento de inmunosupresión en trasplante renal es bastante complejo, al disponer de una gran cantidad de fármacos en distintas combinaciones. Un alto grado de inmunosupresión puede llevar a evitar el riesgo de rechazo, pero puede aumentar el riesgo de infección y cáncer (Gallagher *et al.*, 2010). El riesgo de rechazo aumenta durante el periodo post trasplante inmediato, rechazo agudo (RA). Por esta razón en el primer periodo es necesario tener un mayor nivel de inmunosupresión (dosis altas, mayor número de fármacos o asociar un fármaco de inducción). Luego se va produciendo una adaptación al injerto. Sin embargo, el uso a largo plazo con inhibidores de calcineurina, puede generarse un cuadro de Nefropatía Crónica del Injerto (CAN). La inmunosupresión considera las



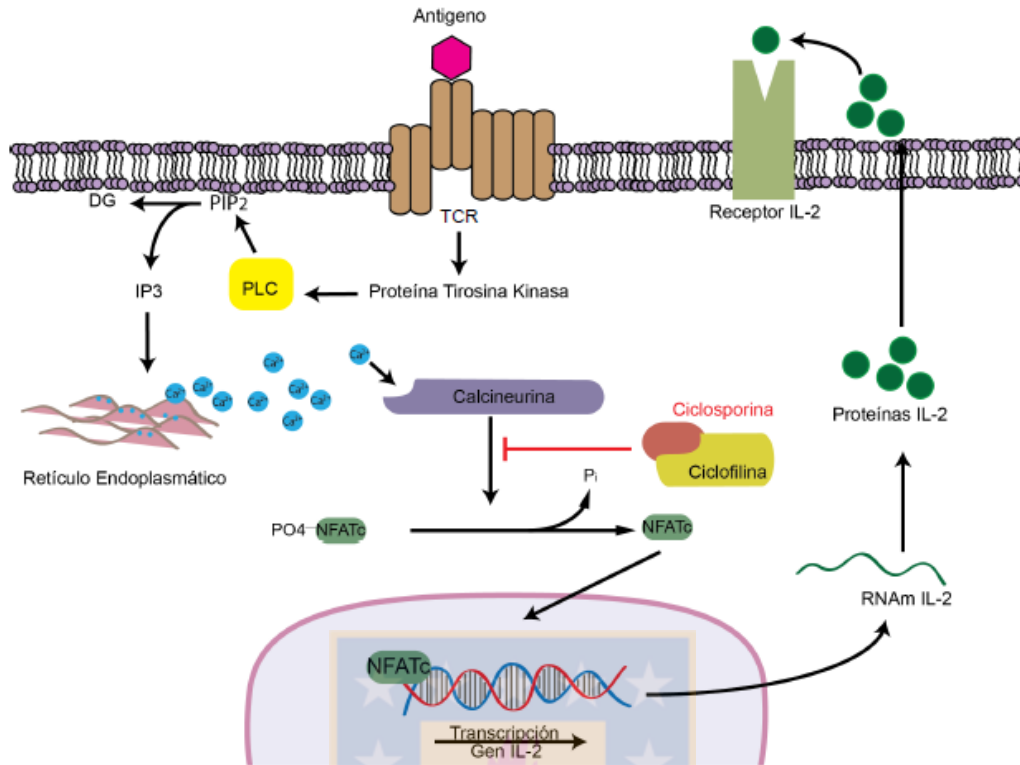
terapias de inducción con anticuerpos monoclonales o policlonales y una terapia de mantención (anticalcineurínicos, antiproliferativos, esteroides), que se inician en el post trasplante inmediato o secuencialmente (Pefaur *et al.*, 2010). Dentro de los agentes importantes en el tratamiento farmacológico, podemos encontrar a los fármacos Anticalcineurínicos (CNI) como la Ciclosporina.

### 1.3 Mecanismos de acción y toxicidad de Ciclosporina

La ciclosporina es un polipéptido cíclico, lipofílico producido por distintas cepas de hongos. Es una de las drogas más efectivas utilizadas para reducir el rechazo de órganos ya que posee una alta actividad inmunosupresora. Su efecto inmunosupresor se debe a la habilidad de bloquear la activación temprana de linfocitos T para inhibir la síntesis de citoquinas y en particular interleuquina-2 (IL-2) (Bauer, 2008).

Las células T poseen un receptor llamado Receptor de Linfocito T (*T cell receptor*, TCR) el cual al activarse eleva el calcio intracelular y activa la subunidad catalítica de calcineurina. Una vez activada, ésta desfosforila el factor de transcripción, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-Cells*), y causa su translocación al núcleo donde regula la expresión de múltiples citoquinas y otras moléculas necesarias para la activación completa de las células T (**Figura 1**). En este punto actúa ciclosporina, la cual se une a proteínas intracelulares llamadas inmunofilinas, específicamente ciclofilina, formando un complejo proteico. Este complejo se une a calcineurina inhibiendo su actividad y por lo tanto, la activación de las células T (Azzi *et al.*, 2013). (**Figura 1**)

La nefrotoxicidad (10% al 38%) puede aparecer como nefrotoxicidad aguda, la cual es caracterizada por ser dosis dependiente y es causada principalmente por efectos tóxicos en la vasculatura renal y efectos sistémicos de ciclosporina. Ocurre en la etapa temprana post-trasplante presentándose con aumentos de niveles de creatinina e hipertensión arterial en la mayoría de los casos, ambos de los cuales son normalizados al reducir la dosis de ciclosporina. La nefrotoxicidad crónica no es dosis dependiente, por lo tanto, en pacientes trasplantados renales se requiere una biopsia para diferenciar entre el rechazo y nefrotoxicidad por ciclosporina. La hipertensión puede ocurrir aproximadamente entre un 8% al 53% de los pacientes; náusea (23%); edema (5% al 14%); hirsutismo (21% al 45%); hipertrichosis (5% al 19%); hiperplasia gingival, aparece entre un 4% y 15% (Busauschina, Schnuelle, & van der Woude, 2004; Lexi-Comp, 2011). Una frecuencia importante es la aparición de cáncer (Dantal *et al.*, 1998; Gallagher *et al.*, 2010).



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

#### 1.4. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE CICLOSPORINA

La ciclosporina posee una absorción errática e incompleta y ocurre principalmente en el intestino delgado. El pico de concentración se ha observado entre 1 a 6 horas luego de la administración oral. La variabilidad en la absorción ocurre principalmente durante las primeras 4 horas post dosis (Belitsky *et al.*, 2001). La vida media varía entre 5 a 18 horas, con un promedio de 8,4 horas. Tiene una biodisponibilidad promedio de 23% y puede estar afectada por múltiples variables tales como el consumo de alimentos y la cantidad de bilis secretada, dentro de las más importantes. Su volumen de distribución varía entre 4 a 6 L/Kg. El 90% al 98% se une a proteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas. Se metaboliza principalmente en el hígado (>99%) vía el sistema citocromo P450 (CYP), principalmente por la enzima *CYP3A4* y además es sustrato de glicoproteína-P. Finalmente, su eliminación es principalmente biliar y menos del 1% de la dosis administrada es excretada sin cambios en la orina (Lexi-Comp, 2011).

#### 1.5. POSOLOGÍA Y MONITORIZACIÓN DE CICLOSPORINA

La ciclosporina es un fármaco de uso crónico y debe ser administrado en dos dosis divididas por un intervalo de 12 horas (mañana y tarde). El método más utilizado y respaldado por estudios farmacocinéticos para determinar la dosis de inicio de ciclosporina es mediante el peso (Han, Pillai, & Venkataramanan, 2013), el cual usualmente se encuentra en un rango de 3 a 6 mg/Kg/día en pacientes adultos. A largo plazo la dosis se

va disminuyendo a un ritmo que depende de la respuesta de cada paciente y de acuerdo con el protocolo según el riesgo (**Anexo I**).

Estudios indican que la concentración plasmática post 2 horas de ingesta ( $C_2$ ) es el punto más efectivo para predecir la concentración del área bajo la curva post 4 horas de ingesta ( $AUC_{0-4}$ ) (Belitsky *et al.*, 2001; Yatscoff, 1991), sin embargo, en 2 estudios clínicos controlados, no se han observado diferencias entre la incidencia de rechazo agudo, pérdida del injerto o eventos adversos, entre utilizar  $C_2$  y  $C_0$  (Kyllonen & Salmela, 2006), de hecho, en las recomendaciones con nivel de recomendación *KDIGO 2D*, mencionadas en el Anexo I, indican que la monitorización puede ser realizada usando 12 horas en el nivel más bajo ( $C_0$ ), 2 horas post dosis ( $C_2$ ) o AUC abreviado.

La dosis de CsA estándar puede ser definida como  $C_0$  de 200 ng/mL o  $C_2$  de 1400-1800 ng/mL en etapas tempranas y 800-1200 ng/mL en etapas posteriores al trasplante (H Ekberg *et al.*, 2007; Henrik Ekberg *et al.*, 2007). También se ha descrito una baja dosis definida como  $C_0$  75 ng/mL.

## **1.6. EVIDENCIA FARMACOGENÓMICA**

Dentro de las fuentes que conducen a la variabilidad inter-sujeto en la respuesta a las terapias farmacológicas podemos encontrar la adherencia al tratamiento, interacciones, dieta, y variabilidad genética (R. S. Huang & Ratain, n.d.) (Feero, Guttmacher, et al, 2011; Walko & McLeod, 2009). Las variaciones genéticas pueden cambiar la estructura y la funcionalidad de las proteínas (transportadores, enzimas metabolizadoras de fármacos, etc.). Lo anterior puede llevar a cambios en la cantidad de fármaco que logra alcanzar el torrente sanguíneo y llegar al blanco terapéutico, es decir, modificando la farmacocinética del fármaco (Evans & McLeod, 2003).

### **1.6.1. CYP3A4 Y CYP3A5**

Ciclosporina es sustrato de la subfamilia de enzimas citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 3 y 4, *CYP3A4* y *CYP3A5*, respectivamente. Las diferentes variantes genéticas de *CYP3A4* y *CYP3A5* causan una variación en el metabolismo de este fármaco. Esto puede conducir a diferentes concentraciones de la droga dentro del sistema circulatorio y en los sitios blancos, influenciando tanto la eficacia del fármaco como la susceptibilidad del individuo ante las interacciones del medicamento o la toxicidad de éste (Kuypers, et al, 2014; Thervet, et al, 2008).

El gen *CYP3A4* está localizado en el cromosoma 7q22.1 y tiene 27Kb de largo aproximadamente y consiste en 13 exones y 12 intrones. Han sido identificados hasta la fecha más de 23 SNP de *CYP3A4* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>). La variante *CYP3A4\*1A* se ha referido como silvestre, ya que fue la primera en ser descubierta, es más frecuente y presenta una actividad enzimática considerada normal. *CYP3A4\*1B* (rs2740574) es el SNP más estudiado, el cual posee una transición de A a G en la posición -392 en la región promotora 5' del gen *CYP3A4*. El efecto de este polimorfismo es controversial. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que su expresión lleva a un aumento en la actividad de transcripción de *CYP3A4*, mientras que otros estudios, no han mostrado efectos funcionales en el metabolismo de algunas drogas (Staatz, et al , 2010).

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

Otra variante recientemente descrita es *CYP3A4\*22* el cual se describió por primera vez en 2011 (Wang, Guo, Wrighton, Cooke, & Sadee, 2011), y se caracteriza por una sustitución C> T (rs35599367) en la posición 15389 en el intrón 6 de *CYP3A4* con una frecuencia de 5-7% en la población caucásica (Elens, van Gelder, Hesselink, Haufroid, & van Schaik, 2013). En un estudio transversal que incluyó a 50 receptores de trasplante de riñón estable, el alelo *CYP3A4\*22* se asoció con concentraciones de CsA 1,6 veces más altas (IC del 95%: 1,1-2,6; p = 0,019), lo que sugiere que los portadores de esta variante necesitan menores dosis de CsA para alcanzar los niveles plasmáticos necesarios cuando se compara con pacientes homocigotos *wild type* (Elens *et al.*, 2011).

En estudio realizado por en 298 trasplantados renales que estaban utilizando CsA se observó que los portadores del alelo *CYP3A4\*22* estaban asociados significativamente con una disminución de la depuración de la ciclosporina de un 15 % en comparación con los no portadores (Moes *et al.*, 2014).

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

La frecuencia de *CYP3A5\*1* también depende de la etnia. Está presente en aproximadamente el 5% a 15% de los caucásicos, 45 a 73% de los afroamericanos, 15 a 35% de los asiáticos y 25% de los mexicanos (Schuetz *et al.*, 1992). En la población Chilena la frecuencia de esta variante es de 24% (Roco *et al.*, 2012).

Varios SNPs en el gen de la oxidorreductasa P450 (*POR*) se han relacionado con actividades diferenciales de CYP, incluyendo *CYP1A2*, *CYP2C19* y *CYP3A* (Agrawal, et al, 2010; Agrawal, Huang, & Miller, 2008). La actividad de *POR* es un requisito previo importante para la oxidación de la CYP porque transfiere los electrones de nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato-oxidasa a las enzimas CYP (Hubbard, Shen, Paschke, Kasper, & Kim, 2001; Masters, 2005). *POR* es una proteína de 78 kDa que contiene 680 aminoácidos y está codificada en el cromosoma 7 que contiene 16 exones (Yamano *et al.*, 1989). *POR* es altamente polimórfico y posee más de 40 SNP, siendo el SNP 1508C > T (rs1057868; *POR\*28*) el más común (N. Huang, Agrawal, Giacomini, & Miller, 2008).

*POR\*28* codifica la variante de aminoácidos A503V, que se encuentra en el dominio de unión flavina-adenina-dinucleótido. Esta variante se ha asociado con la actividad enzimática diferencial de *CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* y *CYP3A*, con la naturaleza y la magnitud del efecto dependiendo de la isoforma CYP investigada (Gomes *et al.*, 2008;

Sandee *et al.*, 2010). Para *CYP3A4*, se ha sugerido que el impacto de la variante *POR\*28* es incluso específico del sustrato. Se ha observado que pacientes trasplantados tratados con CsA, los que presentan *POR\*28/\*28* poseen una disminución del 15% de la concentración ajustada comparados con los que no son portadores (Elens *et al.*, 2014).

### 1.6.2. PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Ciclosporina es transportada fuera de la célula por la bomba de eflujo, glicoproteína-P (P-gp) la cual es producto del gen de Multi-resistencia a Drogas (*MDR-1* o *ABCB1 ATP-binding cassette1*), que constituye una gran familia de proteínas que transportan una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos a través de la membrana en contra de la gradiente de concentración mediante la utilización de ATP. Por lo tanto, reducen la carga de sustancias potencialmente dañinas en el cuerpo, causando resistencia a las drogas. La familia ABC está compuesta por subfamilias, las cuales son *ABCB1* (*MDR1*/glicoproteína-P de la subfamilia *ABCB*), subfamilia *ABCC* (MRPs), y *ABCG2* (*BCRP* de subfamilia *ABCG*), y que son expresados en varios órganos (Brunton, *et al.*, 2011; Choudhuri & Klaassen, 2006).

La proteína de *ABCB1* (*MDR1* o *P-gp*), se encuentra en el epitelio del intestino, hígado, riñón, barrera hemato-encefálica, testículos, placenta y pulmones. La ciclosporina es un sustrato de *ABCB1*, por lo que a nivel intestinal puede ser la responsable de la reducida absorción de ésta en el intestino (Lown *et al.*, 1997; Sakaeda *et al.*, 2003). Además, las variaciones interindividuales en su expresión y función pueden deberse a factores genéticos. Varios *SNPs* han sido identificados para *MDR1* (Allabi, Gala, & Horsmans, 2005). El polimorfismo *3435 C>T* (rs1045642) produce un cambio de nucleótido de citosina a timina en el exón 26, el cual corresponde a un cambio sinónimo, es decir que no lleva a cambios en la secuencia aminoacídica de la proteína; sin embargo, puede reducir la estabilidad del ARNm de *ABCB1* en el hígado, como también cambiar el doblamiento de la proteína y su actividad. El homocigoto para el alelo T ha resultado en una reducción de dos veces de la expresión de P-gp en el estómago (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Otro polimorfismo estudiado es el *2677 G>T/A* (rs2032582) y corresponde a un cambio del nucleótido guanina a timina o adenina en el exón 21, que deriva en un cambio aminoacídico de alanina a serina o treonina, respectivamente. Similarmente a *3435 C>T*, el homocigoto para el alelo T o A se ha encontrado con una menor actividad (Komar, 2007) y finalmente el polimorfismo *1236 C>T* que es el cambio de una citosina por una treonina en el exón 12. Se ha observado que estos tres polimorfismos al estudiarlos como haplotipo, se asocian a una alteración en la farmacocinética de la ciclosporina, en específico el haplotipo TT (*1236TT-2677TT-3435TT*) con respecto a los otros haplotipos estudiados (Chowbay, Cumaraswamy, Cheung, Zhou, & Lee, 2003).

## PROBLEMA

Los ajustes de dosis para los inhibidores de calcineurina (CNIs) son terrenos poco investigados en nuestro país y son cruciales para guiar los tratamientos en los pacientes con trasplante renal. Específicamente, falta por descifrar si la variación en las concentraciones sanguíneas de ciclosporina a lo largo del tratamiento y la presencia de eventos adversos pueda ser explicada por la presencia de variantes genéticas relacionadas con el metabolismo de ciclosporina, lo que nos lleva a plantear la siguiente hipótesis:

## 2. HIPOTESIS

**Variantes genéticas implicadas en la farmacocinética de ciclosporina modifican las concentraciones plasmáticas, la seguridad y eficacia del tratamiento en pacientes chilenos con trasplante renal durante los primeros tres meses.**

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Establecer una relación entre el perfil farmacogenético de las variantes responsables de la metabolización de las ciclosporinas, las concentraciones sanguíneas de ciclosporina (CsA) y la seguridad y eficacia del tratamiento durante los primeros tres meses del tratamiento inmunosupresor.

### 3.2. Objetivos específicos

**Objetivo 1: Relacionar** la presencia de variantes genéticas implicada en la farmacocinética de ciclosporina con la seguridad y eficacia del tratamiento los tres primeros meses posteriores al trasplante renal.

- Establecer la relación entre dosis de ciclosporina y los niveles de creatinina y presión arterial durante los 3 meses post trasplante.
- Determinar la presencia de las variantes *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435*, *MDR1 2677*, *MDR1 1236*, *CYP3A4\*22* y *POR\*28* en pacientes trasplantados renales.
- Asociar la presencia de las variantes genéticas individuales o combinadas y los niveles de creatinina y presión arterial durante los 3 meses post trasplante.

**Objetivo 2:** Asociar la presencia de variantes genéticas implicada en la farmacocinética de ciclosporina con las variaciones en las concentraciones sanguíneas de Ciclosporina durante los tres primeros meses posteriores al trasplante renal.

- Establecer la relación entre la dosis y los niveles de Csa basal y a las 2 horas post ingesta de ciclosporina durante los primeros 3 meses de tratamiento.
- Asociar la presencia de las variantes genéticas previamente determinadas, individuales o combinadas y los niveles plasmáticos de ciclosporina.

## 4. VOLUNTARIOS, MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. DISEÑO DE ESTUDIO

#### 4.1.1. TIPO DE ESTUDIO Y VARIABLES DE EVALUACIÓN

El estudio es observacional del tipo caso-control, se definen los casos como los pacientes que presentan eventos adversos (niveles de creatinina y presión arterial) durante los primeros 3 meses del tratamiento (“*outcome primario*”). El factor de exposición es presentar variantes genéticas desfavorables para el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina en trasplante renal. Para el grupo de pacientes se evaluará la diferencia en los niveles sanguíneos y dosis de ciclosporina durante los primeros 3 meses a diferentes tiempos (“*outcome secundario*”) según las variantes genéticas desfavorables.

#### 4.1.2. PACIENTES

Se invitó a participar al estudio a pacientes que fueron sometidos a un trasplante renal entre los años 2004 y 2016 en el Hospital San Juan de Dios y que habían sido tratados con ciclosporina como parte del esquema inmunosupresor.

Todos los pacientes fueron informados, a través de su médico tratante, sobre el estudio en cuanto a los riesgos y beneficios, se llevó a cabo el proceso de consentimiento informado (**ANEXO 1**). Los pacientes fueron reclutados desde la unidad de trasplante de la Hospital San Juan de Dios.

#### 4.1.3. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

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

##### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con trasplante renal
- Mayores de 18 años
- No presentar nefrotoxicidad debido a la Csa (Creatinina mayor 12 mg/dL)
- En tratamiento con ciclosporina dentro del esquema terapéutico con más de 3 meses desde el inicio del reclutamiento. Apto para comprender su participación en el estudio.

## **Criterios de exclusión**

- Pacientes con trasplante renal que comenzaron su tratamiento farmacológico en otro centro asistencial.

## **4.2. CONCENTRACIÓN DE CICLOSPORINA**

La medición de ciclosporina se llevó a cabo en el Hospital San Juan de Dios mediante un sistema de inmunoensayo homogéneo en el equipo *Cobas e-411*.

Desde el sistema informático del Hospital San Juan de Dios, se obtuvieron las concentraciones de ciclosporina disponibles en el periodo de un año post-trasplante. Estos niveles corresponden a la concentración encontrada en sangre antes de la primera dosis el día de control (Co) y a las 2 horas luego de la administración de ciclosporina (C2).

Se debe destacar, que las concentraciones C2 que se utilizaron en esta investigación están ajustada a dosis y peso (ng/mL por mg/kg) de cada día en que se registran niveles, por cada paciente (Concentraciones C2 ajustada). Además, para asegurar que las concentraciones C2 ajustada de ciclosporina se encuentren en estado estacionario, se considerará la vida media máxima de ciclosporina (18 horas) utilizando cinco vidas medias para el cálculo; por lo tanto, desde el día 3,75 (~4 días), se comenzaron los análisis.

## **4.3. REVISIÓN DE FICHAS CLÍNICAS Y SEGUIMIENTO CLÍNICO**

El acceso a la revisión de la ficha clínica se realizó con el fin de obtener los datos clínicos de respuesta terapéutica y fueron transferidos a un formulario de reporte de caso (CRF) detallados en el **Anexo II**. Dentro de los parámetros clínicos analizados, los valores de creatinina, presión arterial y concentración de ciclosporina C0 y C2 reportados corresponden a mediciones realizadas el mismo día.

## **4.4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN**

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



## 4.5. ANÁLISIS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 4.5.1. ANÁLISIS DE VARIANTES GENÉTICAS MEDIANTE DISCRIMINACIÓN ALÉLICA CON SONDAS *TAQMAN*.

El análisis de las variantes genéticas mediante discriminación alélica se realizó mediante sondas *Taqman*. Las muestras de ADN mediante el método de extracción por columnas fueron cuantificadas y diluida hasta concentración final de 30 ng/mL. Posterior a la extracción, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Este se realizó mediante discriminación alélica con sondas *Taqman*. Luego de cargar la muestra, el protocolo de PCR que se llevó a cabo es el siguiente: un periodo de activación de 10 min a 95°C, un periodo de denaturación de 15 Segs a 95°C (40 ciclos) y un periodo de alineamiento/elongación de 1 min a 60°C. La determinación de los genotipos mediante discriminación alélica se observó mediante el registro de las curvas de amplificación.

**Tabla 1.** Polimorfismos en genes candidatos que afectan la farmacocinética de Inhibidores de Calcineurina (Fuente: Elaboración propia).

GEN	MUTACIÓN	RS	FRECUENCIA ALÉLICA*
CYP3A4	c.-392A>G	rs2740574	0,06 (Chile)* 0,23 (ALL)
CYP3A4	c.522-191C>T	rs35599367	0,04 (IBS) 0,02 (ALL)
CYP3A5	c.-253-1A>G	rs776746	0,24 (Chile complemento del 0,76 reportado en* )
POR	c.1508C>T	rs1057868	0,29 (población general mundial)
MDR1	c.1236C>T	rs1128503	0,59 (Chile complemento del 0,41 reportado en**)
MDR1	c.2677A>T	rs2032582	0,09 (Chile)**
MDR1	c.3435C>T	rs1045642	0,33 (Chile)**

## 4.6. ASPECTOS ÉTICOS

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

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

## 4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para calcular medidas de tendencia central y dispersión de datos para características antropométricas. Para comparar los promedios entre grupos en un solo punto en el tiempo se utilizó *test t de student*. Para evaluar el riesgo

de la presencia de efectos adversos y episodios de rechazo asociados a los genotipos de cada paciente, se utilizó cálculo de *odd ratios* (OR), mediante tablas de cálculo de 2x2. Los análisis se realizaron con el programa STATA 12.0 y se utilizó como criterio de significancia un *p-value* de 0,05.

## 5. RESULTADOS

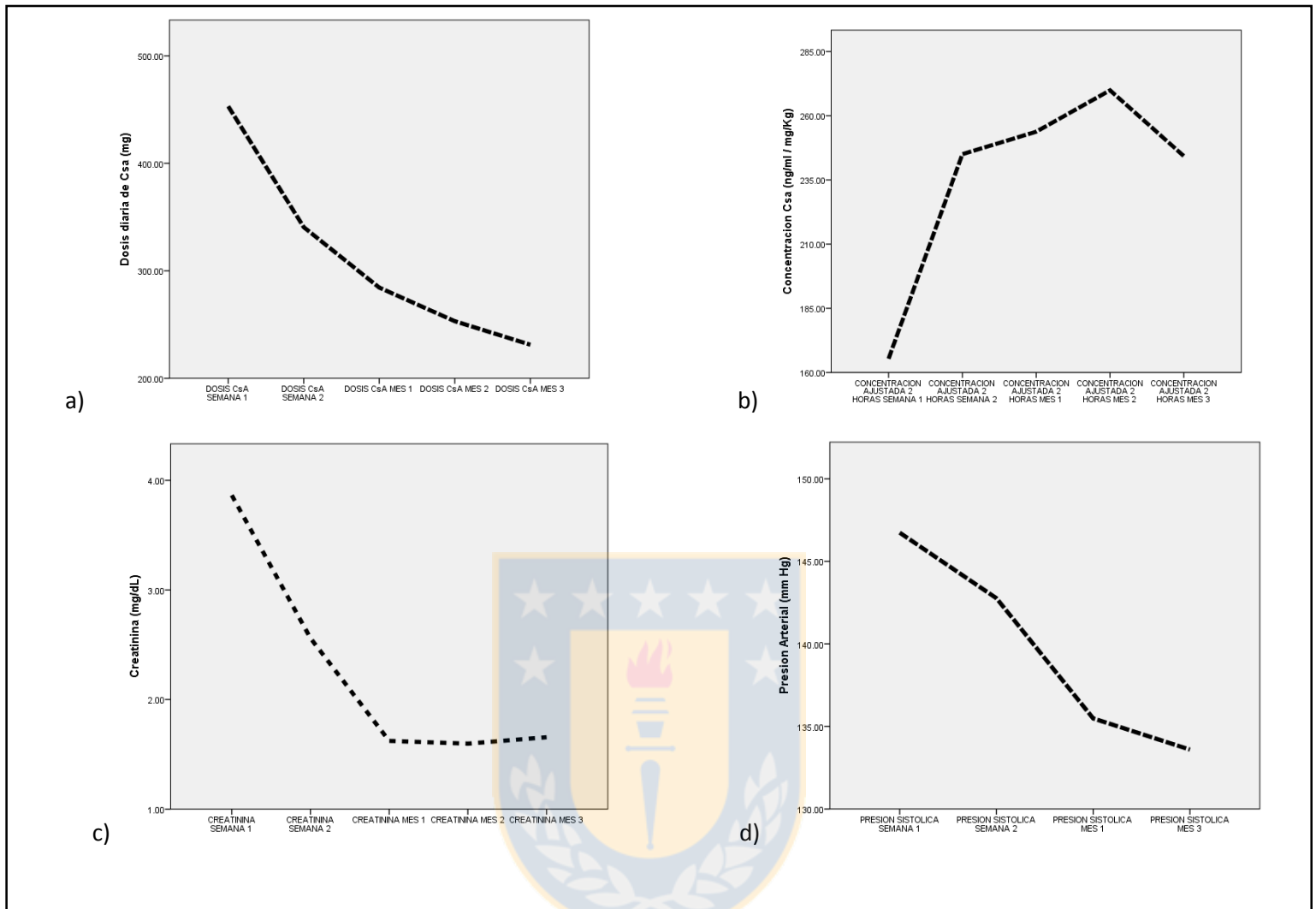
### 5.1. PACIENTES

Posterior a la autorización mediante la firma de un consentimiento informado y el procedimiento normado de acuerdo con la Ley 20.584, se pudo acceder a las fichas clínicas de los 89 pacientes de las cuales se recopiló información desde el primer día post-trasplante hasta los 3 meses. La información extraída corresponde a características mórbidas y clínicas, como también los niveles de Ciclosporina, creatinina y presión arterial indicadas en el periodo.

Los pacientes estudiados, (n = 89) tenían una edad promedio de  $41,6 \pm 13,9$  años, (rango etario 11-71 años), un peso de  $64.7 \pm 11.8$  kg, IMC  $24.47 \pm 3.6$  kg/m<sup>2</sup> y una isquemia fría (IF) de  $20,55 \pm 6,08$  horas. Al momento del trasplante, el 81% de éstos tiene insuficiencia renal crónica terminal (IRCT) por causa desconocida, para el 98% corresponde a su primer trasplante y el 99% recibió un injerto de donante cadavérico. Los parámetros fenotípicos (dosis, niveles de ciclosporina, niveles de creatininemia y presión arterial) se muestran en la **Figura 2**.

**TABLA 2.** Características de los pacientes. \* Promedio  $\pm$  desviación estándar  
IMC: índice de masa corporal, IRCT: insuficiencia renal crónica terminal (Fuente: Elaboración propia).

<b>Características clínicas</b>	
<b>Sexo (n)</b>	
Mujeres	39
Hombres	50
<b>Edad (años) *</b>	41.6 $\pm$ 13.9
<b>Peso (Kg) *</b>	64.7 $\pm$ 11.8
<b>Talla (metros) *</b>	1.63 $\pm$ 0.098
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>) *</b>	24.47 $\pm$ 3.6
<b>Isquemia Fria (horas) *</b>	20.55 $\pm$ 6.08
<b>Número de trasplantes</b>	
Primer trasplante	87 (98%)
Segundo trasplante	2 (2%)
<b>Tipo de donante</b>	
Cadáver	88 (99%)
Vivo	1 (1%)
<b>Etiología de la IRCT n (%)</b>	
Pielonefritis Crónica	5 (6%)
Nefrosclerosis	4 (5%)
Riñón Poliquístico	2 (2%)
Nefropatía Diabética	1 (1%)
Glomerulopatía	1 (1%)
Malformación renal	2 (2%)
Glomerulonefritis	2 (2%)
Desconocida	72 (81%)



**Figura 2.** Parámetros de medición promedio durante los 3 primeros meses de tratamiento. A) Dosis ajustadas por peso, B) Concentración de ciclosporina, C) Niveles de creatininemia, D) Niveles de presión arterial (Fuente: Elaboración propia).

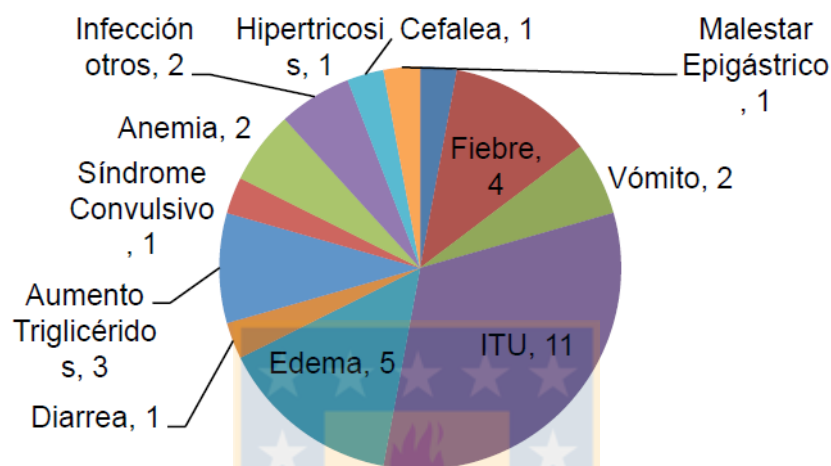
## 5.2. TERAPIA FARMACOLÓGICA Y EVENTOS ADVERSOS

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

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

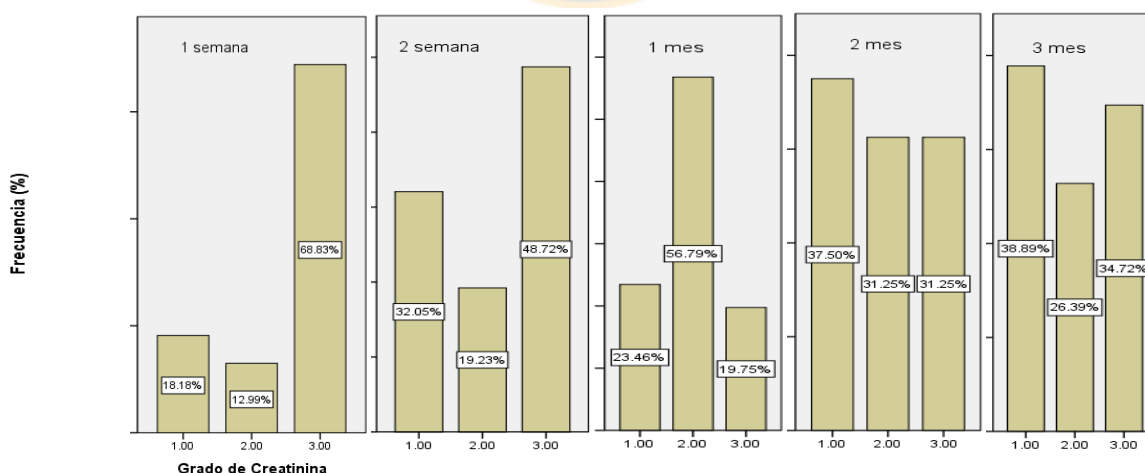
los pacientes reciben tratamientos que están indicados por protocolo para estas enfermedades.

Se registró que el 44,8% de los pacientes presentaron efectos adversos los cuales han sido asociados a ciclosporina y se pueden observar en la **Figura 3**. La presencia de infección del tracto urinario (ITU) es lo más frecuente en estos pacientes, reflejo del estado de inmunosupresión. Con menos frecuencia, se observa la aparición de edema, probablemente debido a una mala función del riñón, localizado en piernas y brazos.

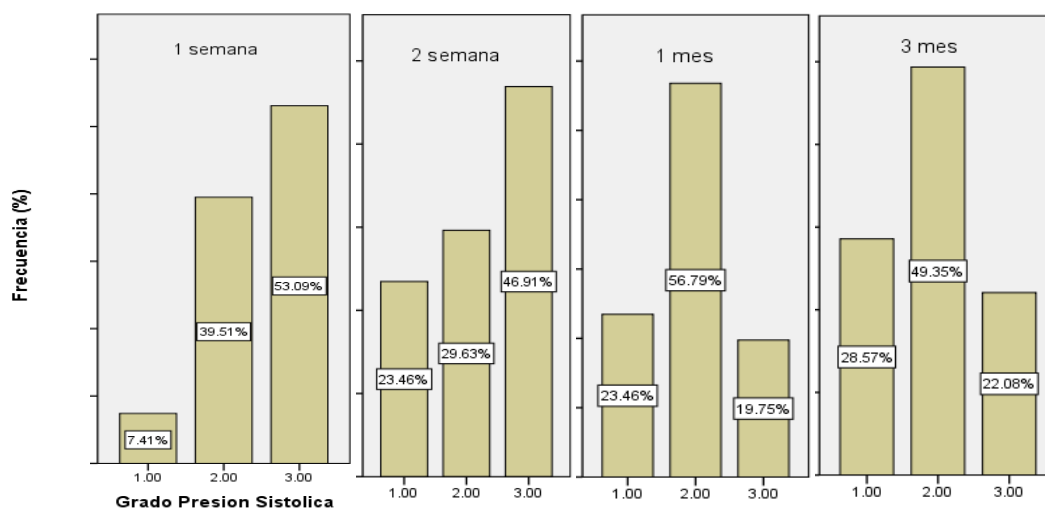


**FIGURA 3.** Efectos adversos registrados. ITU: Infección del Tracto Urinario (Fuente: Elaboración propia)

Al momento de analizar los niveles de creatinina y presión arterial se evidenció que en las primeras semanas hay un alto nivel de alteración en estos parámetros los cuales a medida que transcurre el tiempo se tienden a normalizar como se observa en la **Figuras 4A,4B**.



**FIGURA 4A.** Alteración en los niveles de creatinina, Grado 1 (0 – 1,2 mg/dL), Grado 2 (1,3 – 1,5 mg/dL) y Grado 3 (> 1,6 mg/dL) (Fuente: Elaboración propia).



**FIGURA 4B.** Alteración en los niveles de presión arterial sistólica, Grado 1 (90 – 120 mmHg) , Grado 2 (130 – 140 mmHg) y Grado 3 (> 141 mmHg) (Fuente: Elaboración propia).

### 5.3. ANALISIS GENOTIPICO

Luego de la extracción de ADN de cada muestra de sangre, se procedió a realizar la genotipificación de *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *MDR1 3435*, *MDR1 2677*, *MDR1 1236*, *CYP3A4\*22* y *POR\*28*, de la forma en que se describió anteriormente. Los gráficos que representan las curvas de amplificación mediante *PCR real-time*, se muestran en los **Anexo VIII (Gráficos 1, 2 y 3)**. La **Tabla 3**, muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos analizados en los 89 pacientes trasplantados renales.

Se puede apreciar que para el polimorfismo *CYP3A4\*1B*, 74 pacientes resultaron ser homocigotos silvestres mientras que 14 pacientes son heterocigotos y 1 paciente homocigoto mutado. En cuanto a *CYP3A4\*22* no se encontró ningún paciente homocigoto mutado, 2 heterocigoto y 87 homocigotos silvestres y la frecuencia alélica para este genotipo fue de 1%. Por otra parte, para el polimorfismo *CYP3A5\*3* se identificaron, 55 pacientes homocigotos mutados, 31 heterocigotos y 3 pacientes a homocigoto silvestre (\*1/\*1). Para el genotipo *POR\*28* se encontró 34 pacientes homocigotos silvestres, 47 pacientes heterocigotos y 8 pacientes homocigotos mutados, la frecuencia alélica fue de 35%. Para los genotipos *MDR1 3435*, *1236* y *2677* se observaron que sus frecuencias alélicas fueron 46, 50 y 16% respectivamente.

Para estudiar el efecto de la combinación de los diferentes polimorfismos se consideró solo la presencia del alelo de riesgo, es decir se dividieron en WT vs Hetero/Mut. En los pacientes analizados todos poseían al menos un polimorfismo por lo que se consideró la suma de los diferentes SNP (**Tabla 4**).

**TABLA 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los pacientes trasplantados renales para los diferentes polimorfismos (Fuente: Elaboración propia)**

<b>CYP3A4*1B</b>	N	%	<b>CYP3A4*22</b>	N	%	<b>CYP3A5*3</b>	N	%	<b>POR*28</b>	N	%
WT	74	83,1	WT	87	97,8	WT	3	3,4	WT	34	38,2
HETERO	14	15,7	HETERO	2	2,2	HETERO	31	34,8	HETERO	47	52,8
MUT	1	1,1	MUT	0	0	MUT	55	61,8	MUT	8	9,0
<b>TOTAL</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>
fA	0,91		fC	0,99		fA	0,21		fC	0,65	
fG	0,09		fT	0,01		fG	0,79		fT	0,35	
<b>MDR1 3435</b>	N	%	<b>MDR1 1236</b>	N	%	<b>MDR1 2677</b>	N	%			
WT	30	33,7	WT	22	24,7	WT	70	78,7			
HETERO	36	40,4	HETERO	45	50,6	HETERO	10	11,2			
MUT	23	25,8	MUT	22	24,7	MUT	9	10,1			
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>	<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>			
fC	0,54		fC	0,50		fA	0,84				
fT	0,46		fT	0,50		fT	0,16				

f: frecuencias alélicas fC: frecuencia Citocina fA: frecuencia Adenina fT Frecuencia Timina fG frecuencia Guanina /

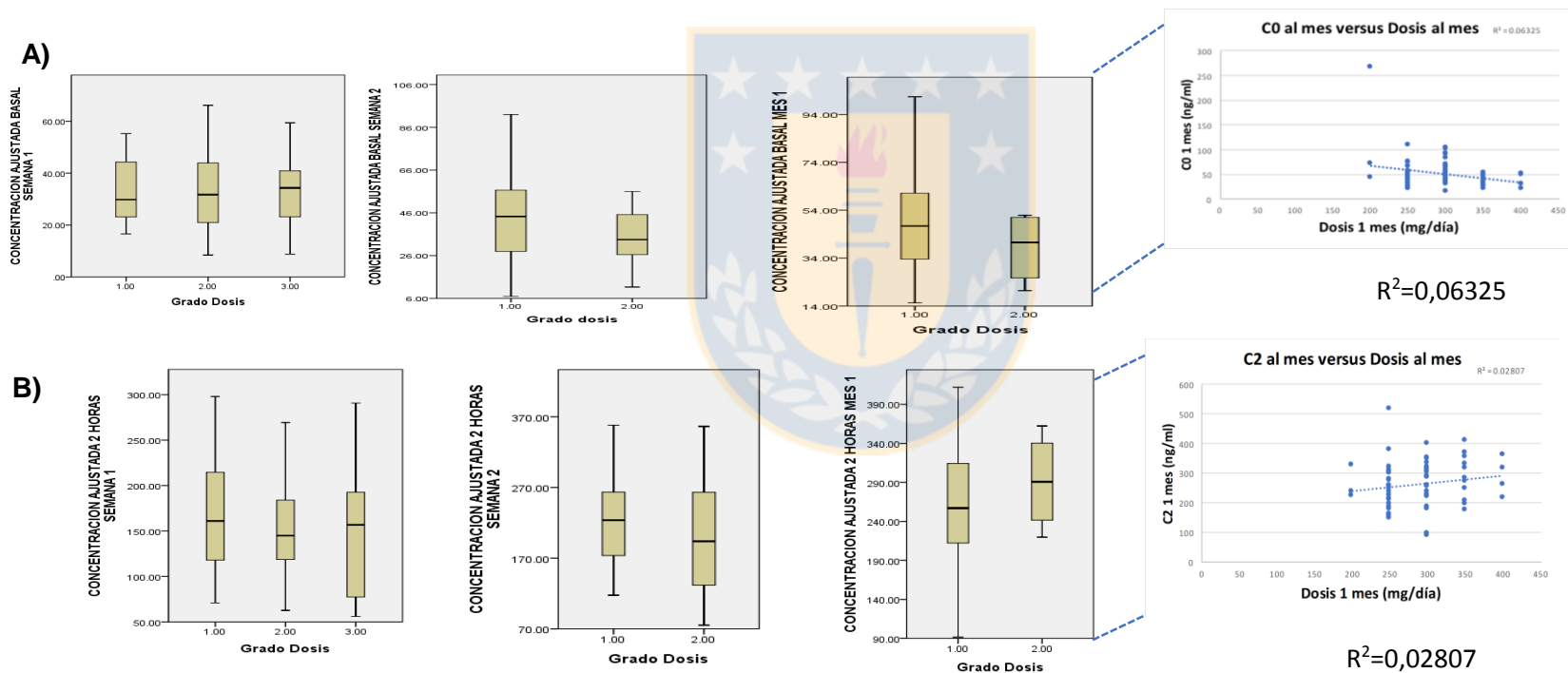
**TABLA 4. Frecuencia de la cantidad de SNP que presentó cada paciente (Fuente: Elaboración propia)**

<b>SNP POR PACIENTE</b>		
<b>N° SNP</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>1</b>	4	4,5
<b>2</b>	14	15,7
<b>3</b>	26	29,2
<b>4</b>	33	37,1
<b>5</b>	11	12,4
<b>6</b>	1	1,1
<b>Total</b>	<b>89</b>	<b>100,0</b>

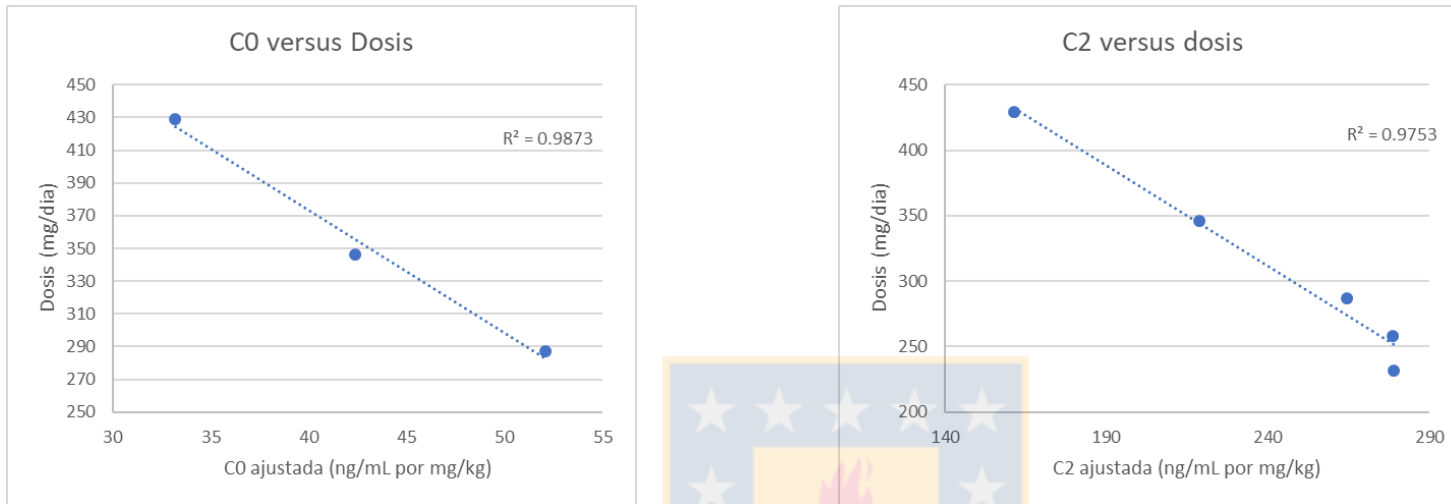
## 5.4 CORRELACIÓN ENTRE LA DOSIFICACIÓN Y LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE CICLOSPORINA SOBRE LOS NIVELES DE CREATININEMIA Y PRESIÓN ARTERIAL

### 5.4.1 Correlación entre dosis y concentración ajustada de Csa.

Como se muestra en la **Figura 2 B**, las concentraciones de Csa van aumentando con el paso de las semanas y se correlacionan con una disminución en la dosis requerida (**Figura 6**). Cuando se realizó un análisis por cada tiempo, se observó que al mes de tratamiento, la C2 de Csa se correlaciona con una dosis mayor (**Figura 5b**), sin embargo, la C0 de Csa al mes de de tratamiento, es inversa la dosis utilizada en ese momento (**Figura 5a**).



**FIGURA 5.** Comparación de medias entre Nivel de Dosis a diferentes tiempos y C0 (A), Grado 1 (200 – 350 mg/día), Grado 2 (351 – 450 mg/día) y Grado 3 (451 - 550 mg/día) y C2 (B). En los gráficos de la derecha se muestran las correlaciones al mes de tratamiento (Fuente: Elaboración propia).



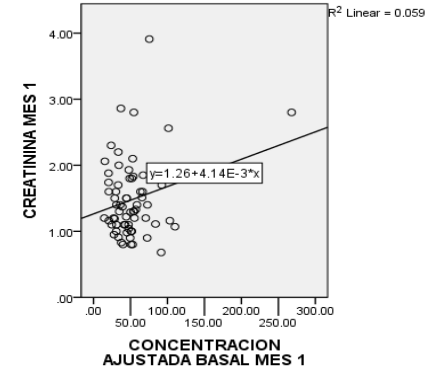
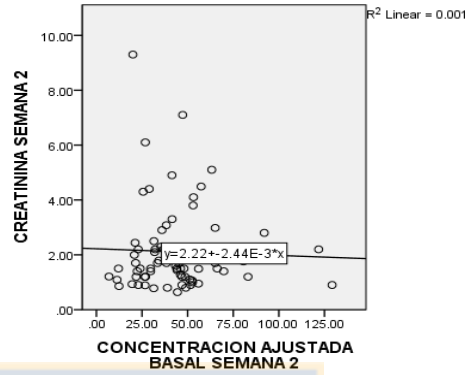
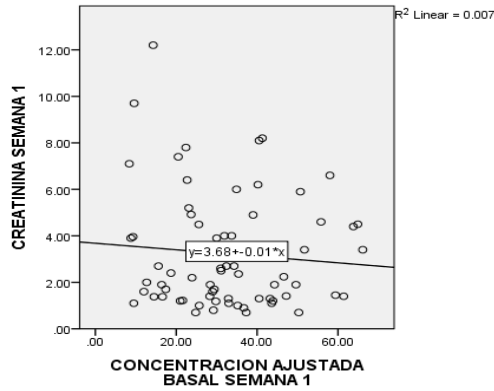
**FIGURA 6.** Correlación entre promedio de Dosis, C0 y C2 (Fuente: Elaboración propia)

#### 5.4.2 Correlación entre Concentración de CsA y creatinemia

Al observar el comportamiento de la concentración de ciclosporina durante el tiempo y los niveles de creatinina sanguínea, se encontró una correlación positiva entre los niveles de creatininemia y los niveles de concentración C0 y C2 de CsA al mes de tratamiento (**Figura 7 a y b**). Sin embargo, al considerar el promedio de creatinina sanguínea *versus* los niveles C0 y C2 de CsA, se observó que la creatina disminuyó a mayor C0 y C2. Por otro lado, la creatinina promedio se correlacionó positivamente con las dosis promedio de CsA (**Figura 8**).



A)



B)

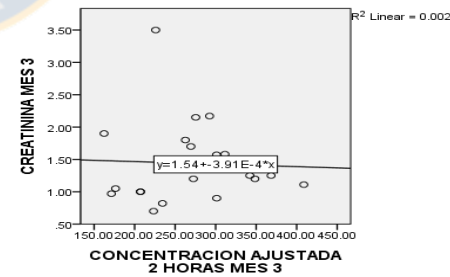
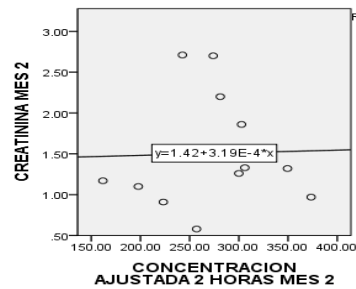
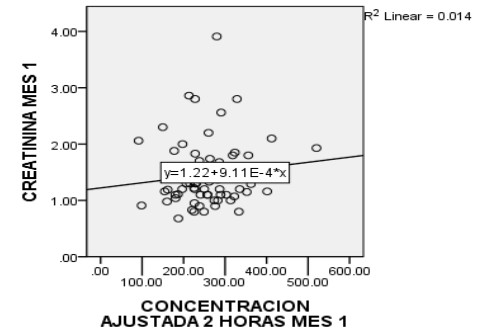
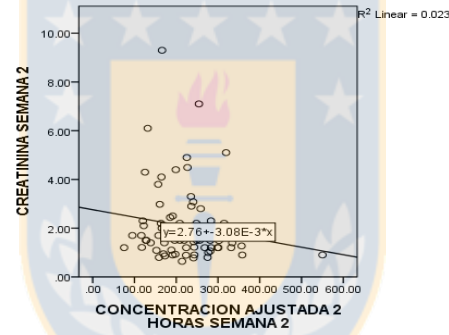
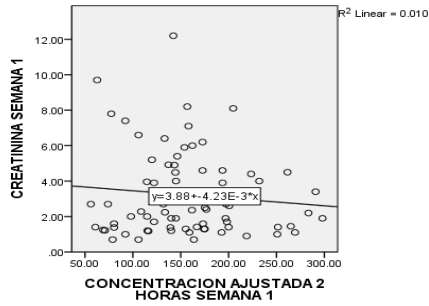
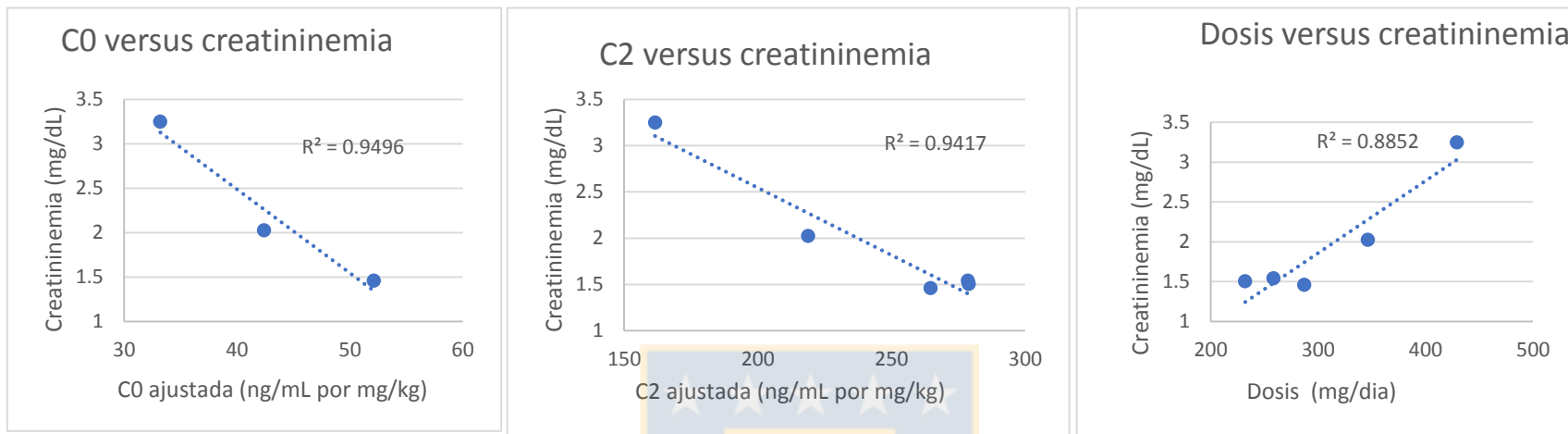


FIGURA 7. Correlación entre Nivel de Creatinina a diferentes tiempos y C0 (A) y C2 (B) (Fuente: Elaboración propia).

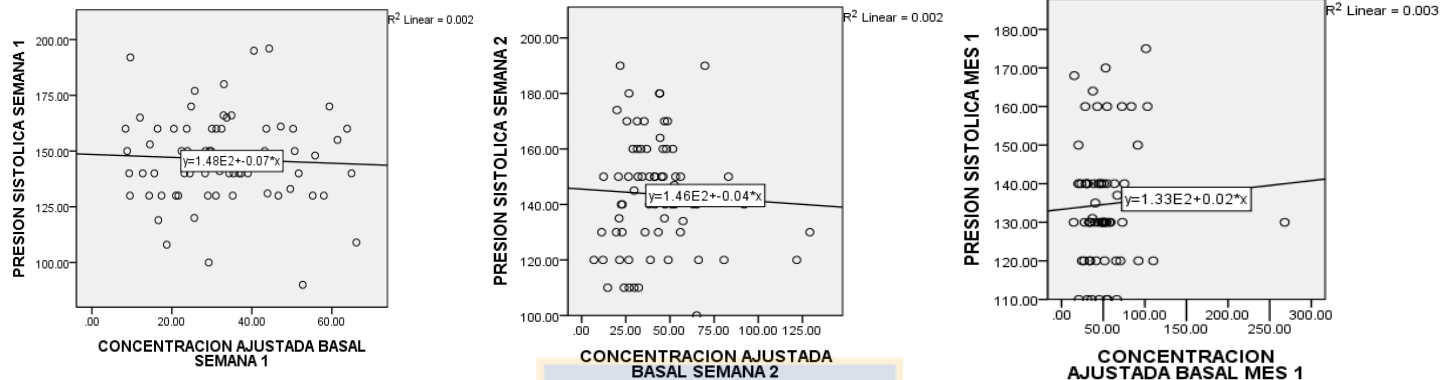


**FIGURA 8.** Correlación entre promedio de Creatinina y Dosis, C0 y C2 (Fuente: Elaboración propia).

#### 5.4.3 Correlación entre Concentración de Csa y presión arterial.

Al momento de analizar las presiones arteriales sistólicas, se observó el mismo efecto que en los niveles de creatinina, mayor en las primeras semanas para después ir disminuyendo al paso del tiempo (**Figura 2 d**). A correlacionar el aumento de la concentración C0, se observó que se correlacionó con una mayor presión arterial al mes de tratamiento (**Figura 9 a**). Por otro lado, el aumento en la C2, se correlacionó con un aumento en las presiones arteriales a las 2 semanas de tratamiento y una disminución al mes de tratamiento (**Figura 9b**). Cuando se analiza el promedio de las presiones arteriales sistólicas, se observó que disminuyen los niveles a medida que aumenta la C0, C2 y la dosis (**Figura 10**).

A)



B)

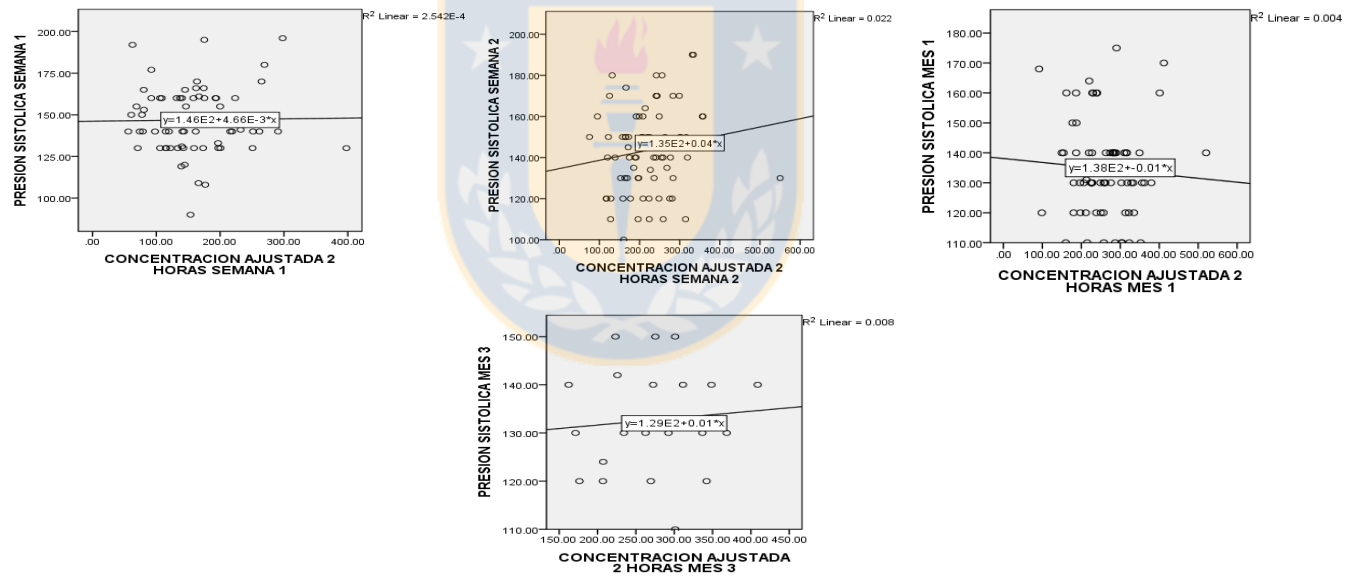
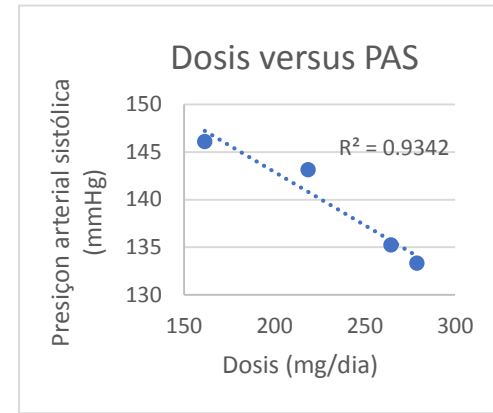
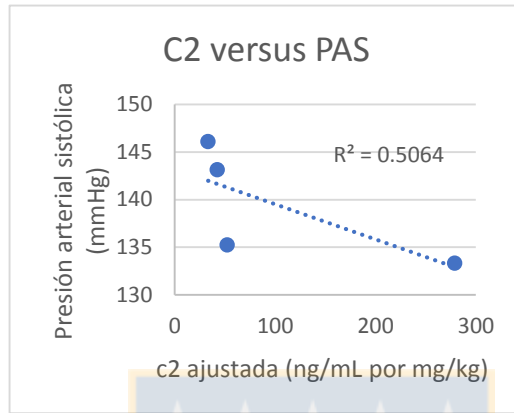
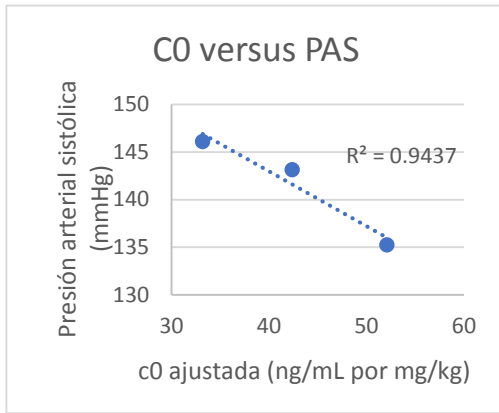


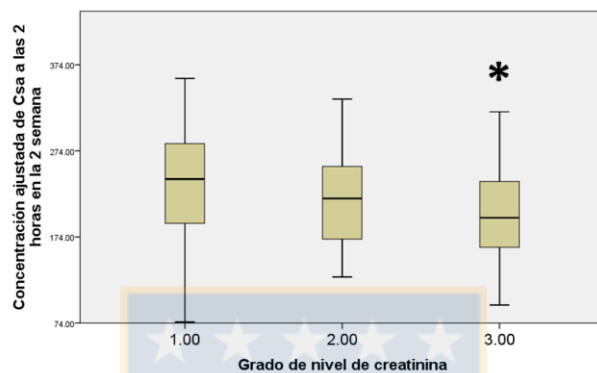
FIGURA 9. Correlación entre Presión arterial a diferentes tiempos y C0 (A) y C2 (B) (Fuente: Elaboración propia).



**FIGURA 10.** Correlación entre promedio de Presión arterial y Dosis, C0 y C2 (Fuente: Elaboración propia).

#### 5.4.4 Correlación entre grado de creatinina y C2

Al analizar el nivel de creatinina según grado y la concentración de Csa, se observó que a mayores niveles de creatinina disminuye la concentración C2 a la semana 2 de tratamiento ( $p = 0,041$ ) (**Figura 11**). Los demás tiempos analizados no muestran diferencias estadísticamente significativas.

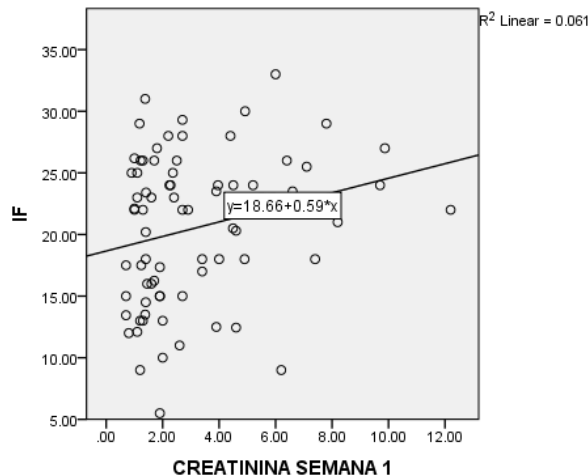


**FIGURA 11.** Comparación de medias entre la C2 y los niveles de creatinina según rango: Grado 1 (0 – 1,2 mg/dL), Grado 2 (1,3 – 1,5 mg/dL) y Grado 3 (> 1,6 mg/dL). \*  $p = 0,041$  al analizar con test student el grado 1 de creatinina a la segunda semana y los niveles de C2 (Fuente: Elaboración propia).

#### 5.4.5 Correlación entre Isquemia Fría y creatinina.

La isquemia fría (IF) es definida como el período desde el inicio de la perfusión con líquido de preservación en frío después del cese de la circulación, debido a un paro cardíaco o pinzamiento arterial, hasta el inicio de la primera anastomosis vascular en implantación.

Se observó que existe una correlación positiva entre la creatinina a la primera semana con la IF (**Figura 12**), es decir, que a mayor tiempo de IF mayor será la creatinina sanguínea a la primera semana.



**FIGURA 12.** Correlación entre IF a la primera semana y C2 (Fuente: Elaboración propia).

## 5.5 EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS SOBRE LA RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA DE CICLOSPORINA

### 5.5.1 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de dosificación y niveles sanguíneos de ciclosporina durante los 3 primeros meses.

Los análisis de comparación de los diferentes polimorfismos y las dosis diarias mostraron que durante las primeras semanas las dosis de Csa son altas en todos los polimorfismos para después ir disminuyendo, pero no arrojaron diferencias significativas al ser comparados con los diferentes alelos de riesgo. Del mismo modo, el análisis que considera como subgrupos pacientes con diferentes números de SNPs de riesgo, tampoco mostró diferencias significativas (**Tabla 5**).

Para estudiar el efecto de la combinación de los diferentes polimorfismos se consideró solo la presencia del alelo de riesgo, es decir se dividieron en WT vs Hetero/Mut. Es por esto que al momento de analizar la presencia del polimorfismo *CYP3A4\*1B* se relacionó con una disminución de la concentración basal ajustada de Csa, llegando a ser significativa a la semana 2 y mes 1 con un  $p=0,032$  y  $0,010$ , respectivamente (**Tabla 6**). Al analizar las concentraciones ajustadas a las dos horas, se observó que la presencia del alelo variante se relaciona con una disminución C2 a la primera semana ( $p= 0,020$ ), para luego ver una tendencia al aumento (**Tabla 7**).

Los pacientes heterocigotos para el polimorfismo *CYP3A5\*3* presentaron un aumento en las C2 a la segunda semana de tratamiento ( $p=0,039$ ), mientras que para los doble variantes se observó una diferencia en la C2 a la primera y segunda semana,  $p= 0,029$  y  $0,001$ , respectivamente (**Tabla 7**).

En el caso de los pacientes con la presencia del polimorfismo *MDR1 3435*, se observó una disminución de la concentración basal ajustada de Csa, tanto para los

pacientes heterocigotos como mutados, llegando a ser significativa en los pacientes heterocigotos a la primera semana ( $p= 0,034$ ) (**Tabla 6**).

Para el polimorfismo *MDR1* 1236, se observó que los pacientes tanto heterocigotos como doble variantes, presentaron una elevación del nivel de concentración basal ajustada de Csa, al comparar ambos grupos se observa un aumento en la C0 en los heterocigotos al primer mes ( $p=0,040$ ) (**Tabla 6**).

Al estudiar *MDR1* 2677, se observó que los pacientes homocigotos para la variante presentaron una disminución al primer mes en la C0 ( $p=0,036$  wt/het vs mut,  $p=0,015$  het vs mut) (**Tabla 6**).

Los análisis de comparación considerando el polimorfismo *POR\*28* y el *MDR1* 3435 no arrojaron diferencias significativas. Del mismo modo, el análisis que considera como subgrupos pacientes con diferentes números de SNPs de riesgo, tampoco muestra diferencias significativas.



**Tabla 5, Análisis de comparación de medias de dosis según genotipos (Fuente: Elaboración propia)**

Dosis promedio ( $\pm$ D,E,)		p-value		Dosis promedio ( $\pm$ D,E,)		p-value		Dosis promedio ( $\pm$ D,E,)		p-value	
Días	CYP3A4*1b wt	CYP3A4*1b het+ mut		Días	CYP3A4*22 wt	CYP3A4*22 Het + mut		Días	CYP3A5*3 wt	CYP3A5*3 Mut + het	
<b>7</b>	432,2464 (58,64610)	419,2308 (63,04252)	0,500	<b>7</b>	430,5556 (59,42432)	375,0000 (35,35534)	0,252	<b>7</b>	433,3333 (28,86751)	429,0625 (60,38428)	0,829
<b>14</b>	344,1176 (52,92166)	358,3333 (41,74236)	0,312	<b>14</b>	346,7949 (50,54235)	325,0000 (106,06602)	0,820	<b>14</b>	383,3333 (28,86751)	344,8052 (51,67231)	0,134
<b>30</b>	290,6250 (51,07961)	270,8333 (25,74643)	0,052	<b>30</b>	287,3333 (47,28674)	275,0000 (106,06602)	0,896	<b>30</b>	300,0000 (70,71068)	286,6667 (48,16451)	0,834
<b>60</b>	260,7143 (39,33979)	250,0000 (26,72612)	0,386	<b>60</b>	255,7143 (33,80617)	350,0000 (35,00000)	<b>0,009</b>	<b>60</b>	250,0000 (37,34914)	258,5714 (45,00000)	0,822
<b>90</b>	235,7143 (35,85686)	212,5000 (25,00000)	0,169	<b>90</b>	232,0000 (37,00000)	,	--	<b>90</b>	,	232,0000 (35,00000)	--
Dosis promedio ( $\pm$ D,E,)		p-value		Dosis promedio ( $\pm$ D,E,)		p-value					
Días	POR*28 wt	POR*28 het + mut		Días	MDR1 3435 wt	MDR1 3435 het + mut					
<b>7</b>	422,5806 (58,93317)	433,1731 (60,86932)	0,434	<b>7</b>	425,0000 (57,00877)	431,1404 (60,92309)	0,658				
<b>14</b>	348,3871 (52,41481)	344,8980 (51,79698)	0,771	<b>14</b>	344,0000 (48,56267)	347,2727 (53,07069)	0,787				

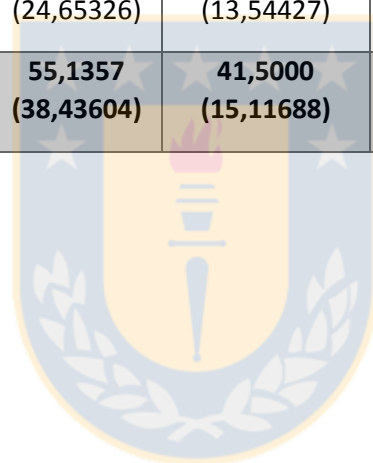


<b>30</b>	291,3793 (46,42383)	284,3750 (52,80589)	0,534		<b>30</b>	290,0000 (57,73503)	285,5769 (43,54009)	0,736	
<b>60</b>	261,5385 (41,60251)	256,5217 (34,79262)	0,716		<b>60</b>	250,0000 (47,14045)	261,5385 (32,58126)	0,490	
<b>90</b>	233,3333 (25,00000)	231,2500 (41,27102)	0,875		<b>90</b>	225,0000 (41,83300)	234,2105 (33,55191)	0,638	
	<b>Dosis promedio (± D,E,)</b>		<b>p-value</b>			<b>Dosis promedio (± D,E,)</b>		<b>p-value</b>	
<b>Días</b>	<b>MDR1 1236 wt</b>	<b>MDR1 1236 het + mut</b>			<b>Días</b>	<b>MDR1 2677 wt</b>	<b>MDR1 2677 mut + het</b>		
<b>7</b>	430,0000 (54,77226)	428,9683 (61,27120)	0,500		<b>7</b>	431,1538 (61,56024)	422,2222 (52,08088)	0,541	
<b>14</b>	339,4737 (48,81640)	348,3607 (52,41439)	0,312		<b>14</b>	344,4444 (51,67447)	352,9412 (51,44958)	0,551	
<b>30</b>	289,4737 (42,74910)	286,2069 (50,25645)	0,052		<b>30</b>	285,8333 (47,91559)	291,1765 (50,72997)	0,701	
<b>60</b>	250,0000 (25,00000)	261,1111 (40,03204)	0,386		<b>60</b>	256,8966 (34,65168)	264,2857 (47,55949)	0,709	
<b>90</b>	221,4286 (26,72612)	236,1111 (37,59520)	0,169		<b>90</b>	230,9524 (37,00064)	237,5000 (25,00000)	0,676	

**Tabla 6, Análisis de comparación de medias de concentración C0 según genotipos (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración c0 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c0 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c0 promedio (± D,E,)		p-value	
Días	CYP3A4*1b wt	CYP3A4*1b het + mut		Días	CYP3A4*22 wt	CYP3A4*22 Het + mut		Días	CYP3A5*3 wt	CYP3A5*3 Mut + het	
7	34,1739 (15,86601)	28,1000 (11,98461)	0,145	7	33,3178 (15,46307)	28,5500 (16,89985)	0,758	7	36,3667 (18,95055)	33,0547 (15,37929)	0,792
14	<b>44,3079</b> <b>(23,00673)</b>	<b>31,2818</b> <b>(15,95837)</b>	<b>0,032</b>	14	42,5849 (22,57922)	26,8000 (38,000000)	0,490	14	31,0000 (19,58239)	42,8521 (22,60899)	0,405
30	<b>54,7883</b> <b>(37,43195)</b>	<b>38,6917</b> <b>(12,56181)</b>	<b>0,010</b>	30	52,1507 (35,25100)	48,9000 (45,098976)	0,927	30	41,2333 (9,13090)	52,5783 (35,65726)	0,151
Concentración c0 promedio (+ D,E,)		p-value		Concentración c0 promedio (+ D,E,)		p-value					
Días	POR*28 wt	POR*28 het + mut		Días	MDR1 3435 wt	MDR1 3435 het + mut					
7	34,1007 (15,69759)	32,6014 (15,34983)	0,687	7	<b>39,4731</b> <b>(17,57544)</b>	<b>30,3549</b> <b>(13,55934)</b>	<b>0,034</b>				
14	44,5677 (21,70991)	40,7884 (23,17430)	0,475	14	46,1333 (23,03301)	40,5660 (22,24555)	0,330				
30	51,5897 (28,37521)	52,4535 (39,16921)	0,914	30	53,5125 (28,91618)	51,4021 (37,95073)	0,794				

	Concentración c0 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c0 promedio (± D,E,)		p-value
Días	MDR1 1236 wt	MDR1 1236 het+mut		Días	MDR1 2677 wt	MDR1 2677 mut + het	
<b>7</b>	32,9250 (13,65399)	33,2617 (15,95416)	0,934	<b>7</b>	32,1155 (15,58734)	36,7882 (14,60830)	0,264
<b>14</b>	37,1706 (13,18260)	43,9228 (24,48594)	0,144	<b>14</b>	43,7000 (24,65326)	38,2389 (13,54427)	0,239
<b>30</b>	45,0059 (17,69691)	54,3000 (38,69685)	0,174	<b>30</b>	<b>55,1357</b> <b>(38,43604)</b>	<b>41,5000</b> <b>(15,11688)</b>	<b>0,036</b>



**Tabla 7, Análisis de comparación de medias de concentración C2 según genotipos (Fuente: Elaboración propia)**

Concentración c2 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c2 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c2 promedio (± D,E,)		p-value	
Días	CYP3A4*1b wt	CYP3A4*1b het+ mut		Días	CYP3A4*22 wt	CYP3A4*22 Het + mut		Días	CYP3A5*3 wt	CYP3A5*3 Mut + het	
<b>7</b>	<b>167,6209</b> <b>(65,23876)</b>	<b>134,3600</b> <b>(42,55724)</b>	<b>0,020</b>	<b>7</b>	161,2750 (63,38955)	172,0000 (46,38620)	0,799	<b>7</b>	127,9667 (20,00033)	148,4600 (63,60006)	0,052
<b>14</b>	223,9926 (74,29440)	189,3083 (83,29819)	0,198	<b>14</b>	219,8924 (76,01717)	131,7000 (80,987658)	0,252	<b>14</b>	<b>162,7667</b> <b>(30,93870)</b>	<b>226,0857</b> <b>(76,66701)</b>	<b>0,039</b>
<b>30</b>	267,4154 (78,68930)	247,5000 (61,40011)	0,355	<b>30</b>	263,3133 (76,16143)	356,0000 (86,16143)	0,231	<b>30</b>	270,8000 (56,69709)	247,6038 (77,38501)	0,565
<b>60</b>	284,2438 (69,16895)	265,3708 (110,41349)	0,609	<b>60</b>	273,7074 (78,73853)	--		<b>60</b>	371,1480 (3,24138)	262,1629 (81,88312)	0,083
<b>90</b>	280,8955 (67,38846)	270,7892 (87,26066)	0,818	<b>90</b>	281,8680 (69,71112)	---		<b>90</b>	,	249,7113 (69,86569)	--
Concentración c2 promedio (± D,E,)		p-value		Concentración c2 promedio (± D,E,)		p-value					
Días	POR*28 wt	POR*28 het + mut		Días	MDR1 3435 wt	MDR1 3435 het + mut					
<b>7</b>	161,5394 (67,02217)	161,5347 (60,56567)	1,000	<b>7</b>	168,9621 (53,53096)	157,4736 (67,52592)	0,401				
<b>14</b>	225,3500 (63,33344)	214,4167 (84,01775)	0,510	<b>14</b>	226,7333 (67,99473)	214,7434 (80,34007)	0,486				

<b>30</b>	255,1100 (79,19067)	270,6783 (74,75216)	0,395		<b>30</b>	274,9440 (68,96245)	259,4294 (79,94270)	0,386	
<b>60</b>	280,0554 (75,21059)	277,4727 (88,87210)	0,926		<b>60</b>	297,9611 (73,02619)	264,5599 (88,04406)	0,223	
<b>90</b>	244,9104 (70,80449)	301,5169 (61,41420)	0,054		<b>90</b>	274,5171 (55,37392)	281,7791 (79,83746)	0,791	
	<b>Concentración c2 promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>			<b>Concentración c2 promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>	
<b>Días</b>	<b>MDR1 1236 wt</b>	<b>MDR1 1236 het+mut</b>			<b>Días</b>	<b>MDR1 2677 wt</b>	<b>MDR1 2677 mut + het</b>		
<b>7</b>	147,4850 (58,11102)	166,0694 (64,07385)	0,234		<b>7</b>	160,4254 (61,00539)	165,2211 (70,21324)	0,790	
<b>14</b>	228,5750 (63,57489)	215,5283 (80,1550)	0,462		<b>14</b>	218,3823 (79,71293)	220,1944 (64,51773)	0,922	
<b>30</b>	250,1250 (75,57940)	269,6786 (76,69921)	0,330		<b>30</b>	270,6633 (80,35170)	241,5438 (55,42635)	0,102	
<b>60</b>	279,7228 (78,2376)	277,8542 (86,50110)	0,949		<b>60</b>	269,4510 (84,45560)	301,9449 (77,10905)	0,285	
<b>90</b>	267,9091 (59,07180)	282,3370 (74,06923)	0,635		<b>90</b>	277,9465 (71,21087)	-----		

### 5.5.2 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de creatininemia durante los 3 primeros meses

Al analizar los niveles de creatinina (**Tabla 8**), se observó una disminución en la semana 2, mes 1 y mes 2 ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,007$  y  $p = 0,010$ ) en sujetos portadores del alelo *CYP3A4\*1B*. Por otro lado, al comparar el promedio de creatinina durante los 3 primeros meses de acuerdo con la presencia del polimorfismo *CYP3A4\*1B*, muestra una disminución en sujetos heterocigotos ( $p = 0,07$ , **Figura 13**).

La presencia del polimorfismo *CYP3A5\*3*, heterocigotos y doble variantes, se relaciona con un aumento en la segunda semana ( $p = 0,003$ ), donde los pacientes con al menos un alelo variante poseen una creatinina de 2,2 mg/dL, versus 1,3 mg/dL en los pacientes *wild-type*.

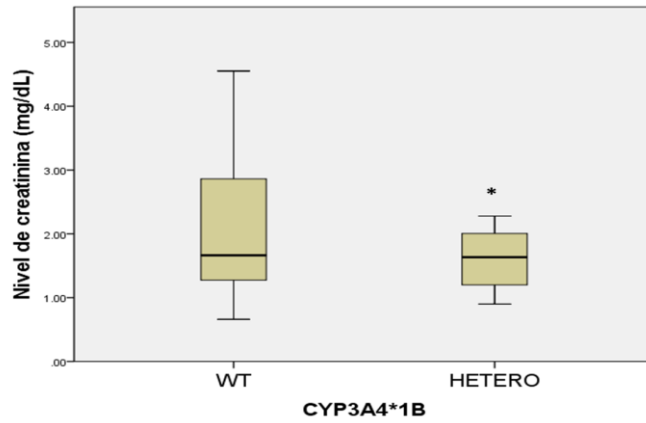
El análisis comparativo considerando los polimorfismos *CYP3A4\*22*, *POR\*28*, *MDR1 3435*, *MDR1 2627*, *MDR1 1236* y la suma de SNPs de riesgo, no muestran resultados significativos.

### 5.5.3 Efecto de los polimorfismos genéticos sobre los niveles de presión arterial durante los primeros 3 meses

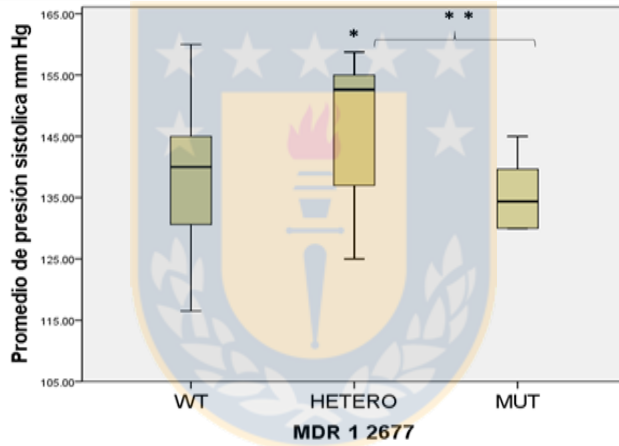
Al analizar los niveles de presión sistólica en los pacientes según el genotipo (**Tabla 9**), se observó que los pacientes portadores del polimorfismo *CYP3A5\*3* se relacionan con un aumento de la presión arterial a la segunda semana ( $p = 0,003$ ).

En cuanto a *MDR1 2677* se observó que los pacientes con al menos un alelo variante presentaron un aumento de la presión arterial llegando a ser significativo en la primera semana y al mes 1 con un  $p = 0,043$  y  $0,026$  respectivamente. Así mismo al comparar los niveles de presión durante los tres meses se observó una disminución en los pacientes significativa con un  $p = 0,046$  con respecto a los pacientes wt y una diferencia de  $p = 0,015$  al compáralo con los pacientes mutados (**Figura 14**).

Para *CYP3A\*22* se observó una disminución a la primera semana de la presión para después presentar una elevación a la segunda semana (142 mmHg vs 150 mm Hg) para posteriormente una disminución significativa de la presión arterial al mes 1 con al menos un alelo variante ( $p = 0,005$ ).



**FIGURA 13.** Niveles de creatinina de los tres meses en portadores de *CYP3A4\*1B* \*p=0.007, analizados con *test t student* contra wt (Fuente: Elaboración propia).



**FIGURA 14.** Promedio de niveles de presión sistólica de tres meses en portadores de *MDR 1 2677*

\* p=0.046 vs sujetos wt y \*\* p= 0.015 vs heterocigotos; analizados con *test t student* (Fuente: Elaboración propia).

**Tabla 8. Análisis de comparación de medias de creatininemia según genotipos (Fuente: Elaboración propia)**

Creatininemia promedio (+- D,E,)		p-value		Creatininemia promedio (+- D,E,)		p-value		Creatininemia promedio (+- D,E,)		p-value	
Días	CYP3A4*1B wt	CYP3A4*1B het+ mut		Días	CYP3A4*22 wt	CYP3A4*22 Het + mut		Días	CYP3A5*3 Wt	CYP3A5*3 mut+ het	
7	3,3669 (2,62524)	2,7021 (1,75512)	0,254	7	3,2104 (2,45774)	4,7400 (4,75176)	0,728	7	4,9667 (2,65769)	3,1813 (2,48432)	0,364
14	2,1521 (1,59304)	1,3592 (0,37540)	<b>0,001</b>	14	1,9862 (1,43584)	3,5500 (3,60624)	0,650	14	<b>1,3333 (0,20817)</b>	<b>2,0514 (1,51618)</b>	<b>0,003</b>
30	1,5058 (0,58407)	1,2223 (0,25097)	<b>0,007</b>	30	1,4626 (0,55498)	1,3500 (0,63640)	0,844	30	1,1500 (0,21213)	1,4677 (0,55717)	0,243
60	1,6300 (0,64506)	1,2000 (0,24739)	<b>0,010</b>	60	1,5458 (0,61728)	-----	-----	60	-----	1,5588 (0,60923)	
90	1,5072 (0,64569)	1,4918 (0,39056)	0,915	90	1,5130 (0,61939)	1,2000 (0,28284)	0,340	90	1,3000 (0,40000)	1,5132 (0,62161)	0,457
Creatininemia promedio (+- D,E,)		p-value		Creatininemia promedio (+- D,E,)		p-value					
Días	POR*28 wt	POR*28 het + mut		Días	MDR1 3435 wt	MDR1 3435 het + mut					
7	2,9507 (2,33906)	3,4318 (2,59504)	0,398	7	2,8977 (1,97164)	3,4215 (2,71833)	0,333				
14	2,0823 (1,42790)	1,9892 (1,54689)	0,783	14	1,8600 (1,35661)	2,0984 (1,55757)	0,489				



<b>30</b>	1,3974 (0,49549)	1,4992 (0,58779)	0,408		<b>30</b>	1,4165 (0,54432)	1,4806 (0,56077)	0,628
<b>60</b>	1,4858 (0,68063)	1,5718 (0,57984)	0,715		<b>60</b>	1,5867 (0,66981)	1,5252 (0,59860)	0,812
<b>90</b>	1,4861 (0,73944)	1,5174 (0,52384)	0,839		<b>90</b>	1,5632 (0,78263)	1,4775 (0,52292)	0,622
	<b>Creatininemia promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>			<b>Creatininemia promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>
<b>Días</b>	<b>MDR1 1236 wt</b>	<b>MDR1 1236 het + mut</b>			<b>Días</b>	<b>MDR1 2677 wt</b>	<b>MDR1 2677 het + mut</b>	
<b>7</b>	3,3400 (2,78985)	3,2183 (2,41444)	0,863		<b>7</b>	3,2267 (2,50413)	3,3375 (2,54660)	0,877
<b>14</b>	2,2347 (2,08184)	1,9605 (1,27701)	0,592		<b>14</b>	2,0117 (1,55883)	2,0706 (1,28059)	0,871
<b>30</b>	1,3665 (0,52564)	1,4908 (0,56244)	0,374		<b>30</b>	1,4695 (0,57677)	1,4235 (0,46721)	0,735
<b>60</b>	1,5100 (0,63722)	1,5528 (0,61078)	0,864		<b>60</b>	1,5489 (0,62149)	1,5067 (0,59604)	0,880
<b>90</b>	1,4221 (0,56626)	1,5317 (0,63109)	0,481		<b>90</b>	1,5260 (0,65914)	1,4237 (0,40076)	0,438

**Tabla 9, Análisis de comparación de medias de presión arterial sistólica según genotipos (Fuente: Elaboración propia)**

Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)		p-value		Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)		p-value		Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)		p-value	
Días	CYP3A4*1b wt	CYP3A4*1b het+ mut		Días	CYP3A4*22 wt	CYP3A4*22 Het + mut		Días	CYP3A5*3 wt	CYP3A5*3 mut+ het	
<b>7</b>	147,8507 (19,28279)	137,7143 (16,64299)	0,057	<b>7</b>	146,4430 (19,14436)	132,5000 (19,09188)	0,487	<b>7</b>	140,0000 (14,14214)	146,2532 (19,30024)	0,643
<b>14</b>	143,4412 (21,12040)	141,5385 (19,93579)	0,759	<b>14</b>	142,9620 (20,50606)	150,0000 (42,42641)	,853	<b>14</b>	135,0000 (13,22876)	143,4487 (21,05629)	0,385
<b>30</b>	135,8088 (16,26759)	132,3077 (15,89227)	0,478	<b>30</b>	<b>135,3797 (16,34508)</b>	<b>130,0000 (0,5232458)</b>	<b>0,005</b>	<b>30</b>	125,0000 (7,07107)	135,5063 (16,26296)	0,253
<b>90</b>	134,0448 (13,46312)	128,9091 (17,69438)	0,376	<b>90</b>	133,5395 (14,21308)	125,0000 (7,07107)	0,317	<b>90</b>	129,3333 (19,00877)	133,4800 (14,03216)	0,743
Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)		p-value		Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)		p-value					
Días	POR*28 wt	POR*28 het + mut		Días	MDR1 3435 wt	MDR1 3435 het + mut					
<b>7</b>	148,4839 (17,29330)	144,6200 (20,24028)	0,363	<b>7</b>	146,5385 (16,91208)	145,8909 (20,26370)	0,881				
<b>14</b>	140,8387 (20,51682)	144,5600 (21,09373)	0,435	<b>14</b>	142,1667 (17,39732)	143,5439 (22,24143)	0,766				
<b>30</b>	136,0938 (18,47991)	134,6939 (14,62761)	0,719	<b>30</b>	133,6538 (14,93705)	136,0000 (16,78844)	0,529				

<b>90</b>	131,7097 (13,81592)	134,3830 (14,35808)	0,413		<b>90</b>	129,9600 (13,17346)	134,9057 (14,38651)	0,139
	<b>Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>			<b>Presión arterial sistólica promedio (+- D,E,)</b>		<b>p-value</b>
<b>Días</b>	<b>MDR1 1236 wt</b>	<b>MDR1 1236 het+mut</b>			<b>Días</b>	<b>MDR1 2677 wt</b>	<b>MDR1 2677 het + mut</b>	
<b>7</b>	150,4500 (17,73630)	144,6721 (19,51557)	0,226		<b>7</b>	<b>144,5625 (17,06279)</b>	<b>160,0000 (18,92749)</b>	<b>0,043</b>
<b>14</b>	146,7368 (20,98900)	142,0323 (20,82083)	0,399		<b>14</b>	143,7302 (20,96634)	149,5000 (18,62644)	0,388
<b>30</b>	138,6500 (18,78486)	134,1311 (15,21126)	0,338		<b>30</b>	<b>134,2969 (16,31114)</b>	<b>147,1111 (13,78808)</b>	<b>0,026</b>
<b>90</b>	129,2105 (11,08843)	134,6441 (14,80070)	0,096		<b>90</b>	133,5323 (14,61497)	136,6667 (10,00000)	0,426

### 5.5.4 Asociación entre polimorfismos genéticos y aparición de eventos adversos

Como se señaló anteriormente, el 44,8% de los pacientes presentaron efectos adversos, por lo tanto, se analizó si estos pacientes poseen una característica genotípica que los predisponga a estas reacciones. Como se observa en la **Tabla 10**, no se encontró relación significativa entre la presencia de efectos adversos y los genotipos analizados.

<b>TABLA 10. Presentación de efectos adversos con respecto al genotipo<sup>**</sup></b> (Fuente: Elaboración propia)					
<b>SNP</b>		<b>Evento*</b>	<b>Sin evento</b>	<b>OR** (IC***)</b>	<b>p-value</b>
CYP3A4*1B	wt	39	35	ref	
	het + mut	5	10	0,449 (0,140-1,441)	0,171
CYP3A4*22	wt	42	45	ref	
	het + mut	2	0	---	---
CYP3A5*3	wt	2	1		
	mut+het	42	44	0,477 (0,042-5,462)	0,544
POR*28	wt	21	13	ref	
	het + mut	23	32	0,445 (0,185 -1,067)	0,067
MDR1 3435	wt	14	16	ref	
	het + mut	30	29	1,182 (0,490 -2,851)	0,709
MDR1 1236	wt	14	8	ref	
	het + mut	30	37	0,463 (0,172 -1,251)	0,125
MDR1 2677	wt	34	36	ref	
	het + mut	10	9	1,176 (0,426 -3,247)	0,754

**\*\*Regresión logística univariada**  
**\*Evento adverso definido como al menos un evento**  
**\*\*Odds ratio**  
**\*\*\* Intervalo de confianza**

## 6. DISCUSIÓN

La ciclosporina ha sido el fármaco inmunosupresor por excelencia a nivel mundial, ya que luego de su introducción en el mercado en 1983, se observó un aumento en la tasa de trasplantes de órganos debido a la disminución de rechazos y aumento de la supervivencia de los pacientes (Churchill Livingstone, 1999). Sin embargo, debido a su alta variabilidad farmacocinética (inter- e intra-individual) y su estrecho margen terapéutico, la aplicación clínica requiere una constante monitorización de sus concentraciones para asegurar la obtención de una inmunosupresión adecuada evitando nefrotoxicidad y otros efectos adversos.

Diferentes investigaciones han sugerido que la concentración de ciclosporina a las 2 horas (C<sub>2</sub>), es el punto que mejor revela su concentración máxima alcanzada en los pacientes (Belitsky et al., 2001), es por esto que éste es un parámetro fundamental en el análisis clínico que realizan los nefrólogos para evaluar la inmunosupresión y la toxicidad. Otro parámetro en constante monitorización se refiere a los niveles de creatinina en suero y la presión arterial, ya que entrega información sobre una posible nefrotoxicidad o rechazo del injerto, sin embargo, es difícil distinguir entre ambas en un trasplantado renal ya que además pueden coexistir (Bennett & Norman, 1986).

El descubrimiento de polimorfismos genéticos que codifican para enzimas metabolizadoras de fármacos y transportadores ha contribuido de manera significativa a la comprensión de la variabilidad inter-individual en la relación dosis-concentración y en la respuesta terapéutica de la droga. El conocimiento de SNPs, que pueden alterar la capacidad funcional de enzimas metabólicas y transportadoras, puede ser útil en el diseño de dosificaciones que sean seguras y efectivas (Chowbay et al., 2003). En base a esto se ha propuesto en este estudio que la variabilidad farmacocinética de ciclosporina puede ser explicada en parte, por factores genéticos, incluyendo polimorfismos en genes que codifican sistemas involucrados en la metabolización y absorción de esta droga.

La ciclosporina se metaboliza principalmente a través del sistema citocromo P-450, específicamente mediante las isoformas CYP3A4 y CYP3A5. Por lo tanto, se analizó el polimorfismo genético CYP3A4\*1B, el cual se ha asociado, con controversia, a un aumento de la actividad enzimática *in vivo* (Amirimani et al., 2003), el polimorfismo CYP3A4\*1B, el cual se asocia a un aumento de la concentración plasmática y además el polimorfismo CYP3A5\*3, el cual produce una enzima no funcional (Kuehl et al., 2001). Por otro lado, la ciclosporina es sustrato del transportador glicoproteína-P (P-gp), una bomba de eflujo que expulsa sustancias endógenas y exógenas de las células. En particular, en este estudio se analizaron los tres polimorfismos respecto a este transportador, los SNPs MDR1 2677, MDR1 3435 y MDR1 1236, los cuales son de interés porque poseen efectos farmacológicos significativos y son asociados con la alteración de la expresión P-gp y su función. Así, se ha demostrado *in vivo* que el genotipo homocigoto mutado para estos SNPs ocurridos en el gen de este transportador produce una menor expresión de P-gp (Llaudó et al., 2013). Adicionalmente, varios SNPs en el gen de la oxidoreductasa P450 (POR) se han relacionado con actividades diferenciales de CYP, incluyendo CYP1A2, CYP2C19 y CYP3A (Agrawal et al., 2010, 2008). Por otro lado, la actividad de POR es un requisito previo

importante para la oxidación de la CYP porque transfiere los electrones de nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato-oxidasa a las enzimas CYP (Hubbard *et al.*, 2001; Masters, 2005). Por lo cual, en este estudio se analizó POR\*28, polimorfismo que se ha asociado con la actividad enzimática diferencial de CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 y CYP3A, con la naturaleza y la magnitud del efecto dependiendo de la isoforma CYP investigada (Gomes *et al.*, 2008; Sandee *et al.*, 2010).

Las frecuencias de las variantes de CYP3A4\*1B, CYP3A5\*3 MDR1 (3435, 2677 G>T/A) y POR\*28 encontradas fueron generalmente consistentes a lo previamente reportado (Roco *et al.*, 2012). Es así como para CYP3A4\*1B las frecuencias alélicas fueron cercanas a la encontrada en la literatura (0,09 vs 0,06), para CYP3A4\*22 la frecuencia alélica para este genotipo fue de 1%, semejante al encontrado en la literatura (0,02). Por otra parte, para el polimorfismo CYP3A5\*3 la frecuencia alélica encontrada también es similar a la encontrada en la literatura (0,76). Para el genotipo POR\*28 la frecuencia alélica fue de 0,35 mientras que la encontrada en la literatura es de 0,29. Finalmente, para los genotipos MDR1 3435,1236 y 2677 se observó que sus frecuencias alélicas fueron: 0,46; 0,50 y 0,16, respectivamente, resultando mayores a las frecuencias reportadas en la literatura (0,41; 0,33 y 0,09) (Wielandt, Vollrath, & Chianale, 2004).

Se registraron reacciones adversas en el 44,8% de los pacientes, en los cuales la presencia de infección del tracto urinario (ITU) fue la más frecuente (32%), a pesar de estar recibiendo fármacos antibacterianos como profilaxis. Adicionalmente, se presentaron reacciones adversas como edema (14%), fiebre (12%) y aumento de triglicéridos (9%), todas asociadas al tratamiento con ciclosporina. En base a la manifestación o no de reacciones adversas, se estudió la asociación de éstas con los distintos genotipos; sin embargo, los resultados no mostraron asociaciones entre los genotipos estudiados y el riesgo de presentar reacciones adversas a ciclosporina.

En trasplante renal, la isquemia fría (IF) es definida como el período desde el inicio de la perfusión con líquido de preservación en frío después del cese de la circulación, debido a un paro cardíaco o pinzamiento arterial, hasta el inicio de la primera anastomosis vascular en implantación. Este período entre la recuperación y la implantación se puede utilizar para la tipificación de tejido donante, asignación, transporte de órganos, preparación del receptor y planificación de la sala de operaciones. La preservación en frío de los injertos de órganos sólidos disminuye el metabolismo anaeróbico y su posterior acumulación de productos de desecho metabólico, el agotamiento de los niveles de ATP y la inhibición de la bomba de Na-K-ATPasa. En este estudio, al momento de analizar la IF, se encontró una correlación positiva entre el tiempo hasta la implantación y los niveles de creatinina en la primera semana. Lo anterior, podría constituir un factor de riesgo para un posible rechazo agudo del órgano, en efecto, en estudios realizados en modelos murinos, al aumentar la IF se ha evidenciado un mayor daño al riñón los días post trasplante (Yin, Li, Zou, Li, & Wang, 2016). Considerando lo anterior, la recomendación es que el riñón no posea mas allá de 20 horas de IF (van der Vliet & Warlé, 2013).

Al analizar los niveles de creatinina en portadores del polimorfismo CYP3A4\*1B se encontró que los pacientes heterocigotos presentaron menores niveles de creatinina (mejor función renal) a partir de la segunda semana, al comparar con los pacientes wt. Adicionalmente, al analizar el promedio de creatininemia dentro de los tres primeros meses, también se observó esta disminución en los valores de los pacientes heterocigotos. Este

fenómeno podría deberse a que los pacientes heterocigotos tienen una modificación en la enzima metabolizadora CYP3A4, que provoca menor función metabólica, por consiguiente prevalecen mayores niveles de ciclosporina en sangre, alcanzando un mejor nivel de inmunosupresión y mejorando la calidad de respuesta del riñón. Esto se confirmó al comparar los niveles de ciclosporina con los niveles de creatinina, encontrándose una correlación inversa de los valores. Estudios clínicos han demostrado que manteniendo los niveles de ciclosporina al rango terapéutico a lo largo del tiempo se observaba una mejoría en los niveles de creatinina y una disminución del rechazo renal (Yu *et al.*, 2015).

En diversos estudios multicéntricos se ha reportado que la ciclosporina genera un aumento de la presión arterial entre 5 y 11 mm Hg (Robert, Wong, & Wright, 2010). En este estudio se observó que en los pacientes heterocigotos para el polimorfismo MDR1 2677 existe un aumento de la presión arterial a partir de la primera semana. Resultados similares se encontraron al comparar el promedio de las presiones arteriales dentro de los primeros tres meses post trasplante. Estos resultados indican que la presencia del polimorfismo confiere una alteración en los transportadores encargados en la expulsión de la ciclosporina de las células, tanto intestinales como hepáticas, generando un aumento de ciclosporina en el sitio de acción.

Por otra parte, se analizó la influencia de los polimorfismos genéticos sobre las concentraciones C<sub>2</sub> de ciclosporina ajustada por dosis y peso. Se consideraron los niveles de esta droga desde el séptimo día posterior al trasplante, para asegurar que se encontrara en estado estacionario. Se encontró que existe un aumento significativo de C<sub>2</sub> en los pacientes tanto heterocigotos como homocigotos para la variante en relación con el polimorfismo CYP3A5\*3, este efecto se observó a partir de la segunda semana para los heterocigotos y la primera semana para los homocigotos portadores de esta variante. Posiblemente, este efecto se debe a que dicho polimorfismo genera una alteración de la CYP3A5, disminuyendo su actividad y generando una disminución de la metabolización de ciclosporina, y por ende aumentando de la concentración. Lo anterior se encuentra reportado previamente, en donde se observa un aumento en la concentración ajustada de ciclosporina en estos pacientes (Masuda & Inui, 2006), como también en la menor dosis diaria requerida de ciclosporina con respecto a los wt, para mantener una inmunosupresión adecuada (Hu *et al.*, 2006).

Una de las limitaciones de este estudio fue el tamaño muestral. Para los diversos polimorfismos y suma de alelos de riesgo, en algunos casos se observaron tendencias de aumento o disminución, tanto de los niveles de creatinina como en las concentraciones ajustadas, sin alcanzar significancia estadística, posiblemente debido al insuficiente tamaño de la muestra.

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

## 7 REFERENCIAS

- Agrawal, V., Choi, J, H., Giacomini, K, M., & Miller, W, L, (2010), Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase, *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(10), 611–618, <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833e0cb5>
- Agrawal, V., Huang, N., & Miller, W, L, (2008), Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19, *Pharmacogenetics and Genomics*, 18(7), 569–576, <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32830054ac>
- Allabi, A, C., Gala, J,-L., & Horsmans, Y, (2005), CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoin metabolism in a Black Beninese population, *Pharmacogenetics and Genomics*, 15(11), 779–86, Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16220110>
- Amirimani, B., Ning, B., Deitz, A, C., Weber, B, L., Kadlubar, F, F., & Rebbeck, T, R, (2003), Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42(4), 299–305, <https://doi.org/10.1002/em.10199>
- Anuario Farmacológico, (1998), Interacciones de los medicamentos y principios activos, *Ediciones Y Comunicaciones*, 103–105,
- Azzi, J, R., Sayegh, M, H., & Mallat, S, G, (2013), Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without ,, *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(12), 5785–91, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1390055>
- Belitsky, P., Mahalati, K., Humar, A., Hassoun, A., Kandaswamy, R., al., et, ... al., et, (2001), Recent advances in therapeutic monitoring of cyclosporine: Absorption profiling, *Transplantation Reviews*, 15(3), 142–155, <https://doi.org/10.1053/trre.2001.25653>
- Bennett, W, M., & Norman, D, J, (1986), Action and toxicity of cyclosporine, *Annual Review of Medicine*, 37(1), 215–24, <https://doi.org/10.1146/annurev.me.37.020186.001243>
- Bhatti, A, B., & Usman, M, (2015), Chronic Renal Transplant Rejection and Possible Anti-Proliferative Drug Targets, *Curēus*, 7(11), e376, <https://doi.org/10.7759/cureus.376>
- Brunton, L, L., Chabner, B, A., Knollmann, B, C, (2011), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed,)
- Busauschina, A., Schnuelle, P., & van der Woude, F, J, (2004), Cyclosporine nephrotoxicity, *Transplantation Proceedings*, 36(2 Suppl), 229S–233S, <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.01.021>
- Choudhuri, S., & Klaassen, C, D, (2006), Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters, *International Journal of Toxicology*, 25(4), 231–59, <https://doi.org/10.1080/10915810600746023>
- Chowbay, B., Cumaraswamy, S., Cheung, Y, B., Zhou, Q., & Lee, E, J, D, (2003), Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporin disposition in heart transplant recipients, *Pharmacogenetics*, 13(2), 89–95, Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563178>



- Churchill Livingstone, (1999), *Therapeutic Drugs* (2nd ed.), Edinburgh,
- Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blanco, G., Dreno, B., & Souillou, J, P, (1998), Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens, *Lancet (London, England)*, 351(9103), 623–8, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)08496-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)08496-1)
- Ekberg, H., Grinyó, J., Nashan, B., Vanrenterghem, Y., Vincenti, F., Voulgari, A., ... Rashford, M, (2007), Cyclosporine sparing with mycophenolate mofetil, daclizumab and corticosteroids in renal allograft recipients: the CAESAR Study, *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(3), 560–70, <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01645.x>
- Ekberg, H., Tedesco-Silva, H., Demirbas, A., Vítko, Š., Nashan, B., Gürkan, A., ... Halloran, P, F, (2007), Reduced Exposure to Calcineurin Inhibitors in Renal Transplantation, *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2562–2575, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa067411>
- Elens, L., Hesselink, D, A., Bouamar, R., Budde, K., de Fijter, J, W., De Meyer, M., ... van Schaik, R, H, N, (2014), Impact of POR\*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients, *Therapeutic Drug Monitoring*, 36(1), 71–9, <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31829da6dd>
- Elens, L., van Gelder, T., Hesselink, D, A., Haufroid, V., & van Schaik, R, H, N, (2013), CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy, *Pharmacogenomics*, 14(1), 47–62, <https://doi.org/10.2217/pgs.12.187>
- Elens, L., van Schaik, R, H., Panin, N., de Meyer, M., Wallemacq, P., Lison, D., ... Haufroid, V, (2011), Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients, *Pharmacogenomics*, 12(10), 1383–1396, <https://doi.org/10.2217/pgs.11.90>
- Evans, W, E., & McLeod, H, L, (2003), Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects, *The New England Journal of Medicine*, 348(6), 538–49, <https://doi.org/10.1056/NEJMra020526>
- Feero, W, G., Guttmacher, A, E., Wang, L., McLeod, H, L., & Weinshilboum, R, M, (2011), Genomics and Drug Response, *New England Journal of Medicine*, 364(12), 1144–1153, <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010600>
- Gallagher, M, P., Kelly, P, J., Jardine, M., Perkovic, V., Cass, A., Craig, J, C., ... Webster, A, C, (2010), Long-Term Cancer Risk of Immunosuppressive Regimens after Kidney Transplantation, *Journal of the American Society of Nephrology*, 21(5), 852–858, <https://doi.org/10.1681/ASN.2009101043>
- Gomes, L, G., Huang, N., Agrawal, V., Mendonça, B, B., Bachega, T, A, S, S., & Miller, W, L, (2008), The Common P450 Oxidoreductase Variant A503V Is Not a Modifier Gene for 21-Hydroxylase Deficiency, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2913–2916, <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0304>
- Han, K., Pillai, V, C., & Venkataramanan, R, (2013), Population pharmacokinetics of cyclosporine in transplant recipients, *The AAPS Journal*, 15(4), 901–12, <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9500-8>

- Healy, D, A,, Daly, P, J,, Docherty, N, G,, Murphy, M,, Fitzpatrick, J, M,, & Watson, R, W, G, (2006), Heat shock-induced protection of renal proximal tubular epithelial cells from cold storage and rewarming injury, *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17(3), 805–12, <https://doi.org/10.1681/ASN.2005090980>
- Hoffmeyer, S,, Burk, O,, von Richter, O,, Arnold, H, P,, Brockmüller, J,, Johne, A,, ... Brinkmann, U, (2000), Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3473–8, <https://doi.org/10.1073/pnas.050585397>
- Hu, Y, F,, Qiu, W,, Liu, Z, Q,, Zhu, L, J,, Liu, Z, Q,, Tu, J, H,, ... Zhou, H, H, (2006), Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(11), 1093–1098, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04492.x>
- Huang, N,, Agrawal, V,, Giacomini, K, M,, & Miller, W, L, (2008), Genetics of P450 oxidoreductase: Sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(5), 1733–1738, <https://doi.org/10.1073/pnas.0711621105>
- Huang, R, S,, & Ratain, M, J, (n,d,), Pharmacogenetics and pharmacogenomics of anticancer agents, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(1), 42–55, <https://doi.org/10.3322/caac.20002>
- Hubbard, P, A,, Shen, A, L,, Paschke, R,, Kasper, C, B,, & Kim, J,-J, P, (2001), NADPH-Cytochrome P450 Oxidoreductase: STRUCTURAL BASIS FOR HYDRIDE AND ELECTRON TRANSFER, *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29163–29170, <https://doi.org/10.1074/jbc.M101731200>
- Instituto Salud Publica, C, (n,d,), Registro Nacional de Trasplante 2014,
- Jacqueline, Pefaur P,, María Pía Rosati M,, Carlos Zehnder B,, José Toro C,, A, M, O, M,, & Susana Elgueta M,, Álvaro Kompatzki G,, Óscar Espinoza N,, M, T, O, (2010), *Guía Trasplante Renal*,
- Komar, A, A, (2007), Silent SNPs: impact on gene function and phenotype, *Pharmacogenomics*, 8(8), 1075–80, <https://doi.org/10.2217/14622416.8.8.1075>
- Kuehl, P,, Zhang, J,, Lin, Y,, Lamba, J,, Assem, M,, Schuetz, J,, ... Schuetz, E, (2001), Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression, *Nature Genetics*, 27(4), 383–91, <https://doi.org/10.1038/86882>
- Kuypers, D, R, J,, de Loor, H,, Naesens, M,, Coopmans, T,, & de Jonge, H, (2014), Combined effects of CYP3A5\*1, POR\*28, and CYP3A4\*22 single nucleotide polymorphisms on early concentration-controlled tacrolimus exposure in de-novo renal recipients, *Pharmacogenetics and Genomics*, 24(12), 597–606, <https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000095>
- Kyllonen, L, E,, & Salmela, K, T, (2006), Early Cyclosporine C0 and C2 Monitoring in De Novo Kidney Transplant Patients: A Prospective Randomized Single-Center Pilot Study, *Transplantation*, 81(7), 1010–1015, <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000203306.72858.df>
- LARRY A, BAUER, (2008), APPLIED CLINICAL PHARMACOKINETICS, *McGraw-Hill*,
- Lexi-Comp, I, (2011), Pediatric & Neonatal Lexi-Drugs®,
- Lillo, R, S, F, C, S, A, D, J, L, G, A, M, (2005), Guía Clínica Insuficiencia Renal Crónica Terminal,

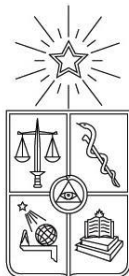
Santiago: Minsal,

- Llaudó, I., Colom, H., Giménez-Bonafé, P., Torras, J., Caldés, A., Sarrias, M., ... Lloberas, N. (2013), Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study, *Transplant International : Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 26(2), 177–86, <https://doi.org/10.1111/tri.12018>
- López-Gil, J, A, (1993), Fluconazole-cyclosporine interaction: a dose-dependent effect? *Ann Pharmacother*, 27, 427–430,
- Lown, K, S,, Mayo, R, R,, Leichtman, A, B,, Hsiao, H, L,, Turgeon, D, K,, Schmieidlin-Ren, P,, ... Watkins, P, B, (1997), Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 62(3), 248–60, [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(97\)90027-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(97)90027-8)
- Masters, B, S, S, (2005), The journey from NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to nitric oxide synthases, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), 507–519, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.165>
- Masuda, S,, & Inui, K, ichi, (2006), An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients, *Pharmacology and Therapeutics*, 112(1), 184–198, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.006>
- Moes, D, J, A, R,, Swen, J, J,, den Hartigh, J,, van der Straaten, T,, van der Heide, J, J, H,, Sanders, J, S,, ... Guchelaar, H, J, (2014), Effect of CYP3A4\*22, CYP3A5\*3, and CYP3A Combined Genotypes on Cyclosporine, Everolimus, and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplantation, *CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, 3(November 2013), e100, <https://doi.org/10.1038/psp.2013.78>
- Robert, N,, Wong, G, W,, & Wright, J, M, (2010), Effect of cyclosporine on blood pressure, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007893.pub2>
- Roco, A,, Quiñones, L,, Agúndez, J, A, G,, García-Martín, E,, Squicciarini, V,, Miranda, C,, ... Varela, N, (2012), Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the chilean population: comparison with caucasian and asian populations, *Frontiers in Genetics*, 3, 229, <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00229>
- Sakaeda, T,, Nakamura, T,, & Okumura, K, (2003), Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs, *Pharmacogenomics*, 4(4), 397–410, <https://doi.org/10.1517/phgs.4.4.397.22747>
- Sandee, D,, Morrissey, K,, Agrawal, V,, Tam, H, K,, Kramer, M, A,, Tracy, T, S,, ... Miller, W, L, (2010), Effects of genetic variants of human P450 oxidoreductase on catalysis by CYP2D6 in vitro, *Pharmacogenetics and Genomics*, 20(11), 677–686, <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833f4f9b>
- Schuetz, E, G,, Schuetz, J, D,, Grogan, W, M,, Naray-Fejes-Toth, A,, Fejes-Toth, G,, Raucy, J,, ... Watlington, C, O, (1992), Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(1), 206–14, Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1550347>

- Seifeldin, R, (1995), Drug interactions in transplantation, *Clin Ther*, 17, 1043–1061,
- Staatz, C, E,, Goodman, L, K,, & Tett, S, E, (2010), Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I, *Clinical Pharmacokinetics*, 49(3), 141–75, <https://doi.org/10.2165/11317350-000000000-00000>
- Sud, K, et al, (1999), Unpredictable cyclosporin--fluconazole interaction in renal transplant recipients, *Nephrol, Dial, Transplant*,, 14, 1698–1703,
- Thervet, E,, Anglicheau, D,, Legendre, C,, & Beaune, P, (2008), Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation, *Therapeutic Drug Monitoring*, 30(2), 143–50, <https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e31816babef>
- van der Vliet, J, A,, & Warlé, M, C, (2013), The need to reduce cold ischemia time in kidney transplantation, *Current Opinion in Organ Transplantation*, 18(2), 174–178, <https://doi.org/10.1097/MOT.0b013e32835e2a08>
- Walko, C, M,, & McLeod, H, (2009), Pharmacogenomic progress in individualized dosing of key drugs for cancer patients, *Nature Clinical Practice, Oncology*, 6(3), 153–62, <https://doi.org/10.1038/ncponc1303>
- Wang, D,, Guo, Y,, Wrighton, S, A,, Cooke, G, E,, & Sadee, W, (2011), Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs, *The Pharmacogenomics Journal*, 11(4), 274–286, <https://doi.org/10.1038/tpj.2010.28>
- Wielandt, A, M,, Vollrath, V,, & Chianale, J, (2004), [Polymorphisms of the multiple drug resistance gene (MDR1) in Mapuche, Mestizo and Maori populations in Chile], *Revista Medica de Chile*, 132(9), 1061–8, <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004000900006>
- Wolfe, R, A,, Ashby, V, B,, Milford, E, L,, Ojo, A, O,, Ettenger, R, E,, Agodoa, L, Y,, ... Port, F, K, (1999), Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant, *The New England Journal of Medicine*, 341(23), 1725–30, <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412303>
- Yamano, S,, Aoyama, T,, McBride, O, W,, Hardwick, J, P,, Gelboin, H, V, & Gonzalez, F, J, (1989), Human NADPH-P450 oxidoreductase: complementary DNA cloning, sequence and vaccinia virus-mediated expression and localization of the CYPOR gene to chromosome 7, *Molecular Pharmacology*, 36(1), 83–8, Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2501655>
- Yatscoff, R, W, (1991), Cyclosporine monitoring: consensus recommendations and guidelines, Canadian Consensus Meeting on Cyclosporine Monitoring, *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 144(9), 1119–20, Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2018961>
- Yin, Z,, Li, B,, Zou, F,, Li, H,, & Wang, X, (2016), Risk factors of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation in China, *EBioMedicine*, (January), 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.008>
- Yu, X,, Ruan, L,, Qu, Z,, Cui, Z,, Zhang, Y,, Wang, X,, ... Yang, L, (2015), Low-dose cyclosporine in the treatment of idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome: Effectiveness and renal safety, *Hong Kong Journal of Nephrology*, 17(2), S69, <https://doi.org/10.1016/j.hkjm.2015.09.033>

## 8 ANEXOS

### ANEXO I CONSENTIMIENTO INFORMADO



## GRUPO ESTUDIO

### Variabilidad farmacocinética en pacientes con trasplante renal tratados con ciclosporina: evaluación de variantes genéticas como covariables,

Código del estudio: CQF-EC-01-16

María Soledad Rodríguez<sup>1</sup>, Luis Quiñones<sup>2</sup>, Gabriel Llull<sup>3</sup>, Alejandro Ramírez<sup>3</sup>, Fernando Corvalán<sup>2</sup>,  
Juan Pablo Cayún<sup>2</sup>

Investigador Principal: Dra, María Soledad Rodríguez, Nefróloga, MD,

Investigador Responsable: Dr, Luis Quiñones, PhD,

1. Unidad de Nefrología, Hospital San Juan de Dios,
2. Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF), Programa de Farmacología Molecular y Clínica, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
3. Laboratorio Clínico, Hospital San Juan de Dios



Versión 1,0

Santiago, Julio 2016

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nos dirigimos a usted con el propósito de solicitar su colaboración en el proyecto de investigación biomédica ***“Variabilidad farmacocinética en pacientes con trasplante renal tratados con ciclosporina: evaluación de variantes genéticas como covariables”***

## **OBJETIVO**

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

## **PROCEDIMIENTOS**

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

La muestra de ADN será utilizada para analizar los genes de las enzimas y proteína involucradas en el metabolismo y respuesta terapéutica en tratamientos con Ciclosporina, Estas muestras no serán utilizadas para otros estudios,

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

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

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

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

## **RIESGOS/BENEFICIOS**

La única molestia eventual podría ser la aparición de un pequeño hematoma (moretón) en la zona de toma de muestra, lo cual es infrecuente,

No existirá un beneficio directo a su persona, sin embargo, los resultados obtenidos con su muestra podrían permitir a futuro, en pacientes en tratamiento con ciclosporina, utilizar

esquemas terapéuticos más personalizados, con menos reacciones adversas y más efectivos,

### **COSTOS**

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

### **CONFIDENCIALIDAD**

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

Sus muestras serán almacenadas por un periodo de 15 años en el Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética, bajo la responsabilidad del Dr, Luis Quiñones y serán utilizadas exclusivamente para los fines de este estudio,

### **VOLUNTARIEDAD**

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

### **DERECHOS DEL PARTICIPANTE**

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

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

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo \_\_\_\_\_ RUT \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

He sido invitado(a) a participar como voluntario(a) en el proyecto de investigación titulado "Variabilidad farmacocinética en pacientes con trasplante renal tratados con ciclosporina : evaluación de variantes genéticas como covariables", dirigido por el Dr, Luis Quiñones S, (fono +56 9 29770741, e-mail [lquinone@med.uchile.cl](mailto:lquinone@med.uchile.cl)), a realizarse en el laboratorio CQF, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile,

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

Indique: Sí o NO	Aspectos o ámbitos
	Conozco y entiendo el OBJETIVO del estudio,
	Comprendo y acepto los PROCEDIMIENTOS a los cuales debo someterme,
	Conozco los posibles RIESGOS y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio,
	Estoy de acuerdo con las COMPENSACIONES y BENEFICIOS asociados a mi participación en este estudio,
	Acepto los resguardos sobre la CONFIDENCIALIDAD de mis datos personales, resultados médicos, análisis clínicos de laboratorio,
	Estoy totalmente informado(a) sobre la VOLUNTARIEDAD de mi participación en este estudio y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino,
	Se me ha informado que frente a cualquier COMPLICACIÓN derivada de mi participación en el presente estudio, y completamente consciente de la posibilidad de retirarme del estudio si yo así lo determino
	He sido instruido sobre mi DERECHO a consultar cualquier duda referente al presente estudio y de retirarme del estudio si yo así lo determino,

Leído y entendido el presente consentimiento, así como sus condiciones, accedo a participar como voluntario(a) en este estudio, firmando el presente documento,

Nombre:	Nombre:	Nombre:
Firma Voluntario	Firma Investigador Responsable o Delegado	Firma Investigador Clínico o Delegado

\_\_\_\_\_  
Nombre y Firma del Director de la Institución o su delegado

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



**ANEXO II Formulario de reportes de casos (CRFI),**

**Hoja clínica de ingreso pacientes voluntarios**

<b>INFORMACIÓN PERSONAL</b>	
Nombres	Apellidos
Fecha de nacimiento DD/MM/AA: _____ Edad: _____	RUT
Dirección	
Teléfono fijo	Celular
<b>ANTECEDENTES MORBIDOS(marcar X cuando corresponda)</b>	
Diabetes Mellitus ____ Hipertensión Arterial ____ Infarto Miocardio ____	
Asma ____ Epilepsia ____	
Alergias _____	
Otros _____	
Antecedentes quirúrgicos: _____	
Hábitos de droga ____ Alcohol ____ Fumador ____ Otro ____	
Medicación concomitante:	
No ____	
Si (Nombre medicamento/desde/hasta)	
Hipoglicemiantes: _____ Antibióticos: _____	
Corticosteroides: _____ TACO: _____	
Otros: _____	
<b>Terapia Farmacoterapeuticalnicial :</b>	

**Código Paciente:** \_\_\_\_\_ **Grupo 1**\_\_ **Grupo 2**\_\_ **Grupo3**\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Ficha Clínica: \_\_\_\_\_

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN (marcar X cuando corresponda)**

1, Paciente con Trasplante Renal	Si	No
2, Paciente mayor de 18 años	Si	No
3, En tratamiento con Ciclosporina o Tacrolimus Fecha de inicio de tratamiento: ____/____/____ Califica para el siguiente grupo (marcar con X): Grupo 1__Grupo 2__Grupo3__	Sí	No
4, El pacientes está apto para comprender su participación en el estudio	Sí:	
5, El paciente está comenzando el tratamiento con Ciclosporina o Tacrolimus	Sí	No

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN (marcar X cuando corresponda)**

1, Paciente con trasplante renal que comenzaron su tratamiento farmacológico en otro centro asistencial	Sí	No
	Sí: excluido/a	

**INFORMACIÓN AL INVESTIGADOR CLINICO O SU DELEGADO**

¿Paciente firmó el consentimiento informado? Sí No

No: excluido/a

Fecha \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

DD/MM/AA

Nombre y Firma del Investigador Clínico

**ANEXO III FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFII)**

**Hoja clínica de seguimiento**

**Código Paciente:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      **Ficha Clínica:** \_\_\_\_\_

<b>INFORMACIÓN PERSONAL</b>	
Nombres	Apellidos

<b>DETECCIÓN DE EVENTOS ADVERSOS</b>
--------------------------------------

Fecha de Trasplante Renal \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Fecha de inicio de tratamiento inmunosupresor \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Fecha de registro de CRFII \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      Tiempo: \_\_\_\_\_

Infecciones	Diagnostico _____ Fecha ____ / ____ / ____ Tratamiento ____ / ____ / ____ Observaciones: _____
Trastornos hematológicos	Diagnostico _____ Fecha ____ / ____ / ____ Tratamiento ____ / ____ / ____ Observaciones: _____
Alteraciones en exámenes de Laboratorios	Fecha: _____ Tipo de examen: _____ Alteración: _____
Otros eventos	Observación: _____
Otros eventos	Observación: _____

\_\_\_\_\_  
**Nombre y Firma del Monitor Clínico**

\*si es necesario, utilizar otro formulario cuando existen una mayor cantidad de eventos adversos,

**ANEXO IV FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFIII)**

**Hoja clínica de seguimiento**

<b>INFORMACIÓN PERSONAL</b>	
Nombres	Apellidos

**Código Paciente:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      **Ficha Clínica:** \_\_\_\_\_

Día / Mes	Dosis diaria administrada post-trasplante	Día / Mes	Creatinina Sanguinea
Día 2-5			
Día 7			
Día 14			
Mes 1			
Mes 1,5			
Mes 2			
Mes 3			
Mes 4			
Mes 5			
Mes 6			
Mes 7			
Mes 8			
Mes 9			
Mes 10			
Mes 11			
Mes 12			

\_\_\_\_\_  
**Nombre y Firma del Monitor Clínico**

ANEXO V FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFIV)

Hoja clínica de seguimiento

Código Paciente: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_      Ficha Clínica: \_\_\_\_\_

<b>INFORMACIÓN PERSONAL</b>	
Nombres	Apellidos

Gen	Mutación	rs	Fecha de análisis	Resultado

**ANEXO VI FORMULARIO DE REPORTES DE CASOS (CRFV)**  
**Hoja clínica de seguimiento**

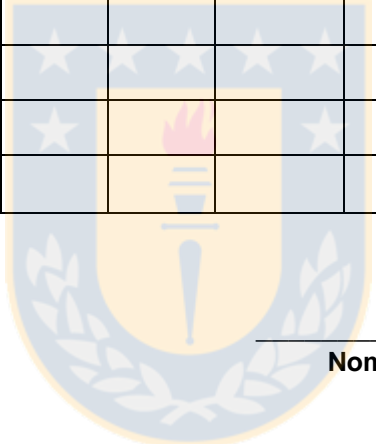
**Código Paciente:** \_\_\_\_\_

**Fecha:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Ficha Clínica:** \_\_\_\_\_

<b>INFORMACIÓN PERSONAL</b>	
Nombres	Apellidos

Tiempo	Primer mes		Tercer mes		Sexto mes		Doce meses	
	Cp	RGE	Cp	RGE	Cp	RGE	Cp	RGE
C0								
C2								
C4								
C6								



\_\_\_\_\_  
**Nombre y Firma del Monitor Clínico**

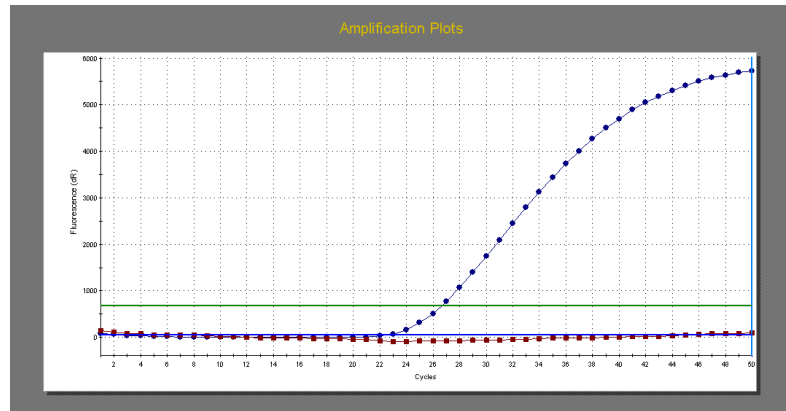
## ANEXO VII TRASLADO DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DESDE EL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS AL LABORATORIO CQF

1. La muestra de sangre en tapa lila con EDTA llegará al Laboratorio de Biología molecular del Hospital San Juan de Dios
2. Por cada muestra de tubo tapa lila se tomarán 300  $\mu$ L para análisis de fármaco en sangre y 300  $\mu$ L de contramuestra, El análisis se realizará de acuerdo a protocolos internos,
3. La cantidad restante de cada tubo se almacenará en un cooler con refrigerante y se llamará al Laboratorio CQF al teléfono +56977813174 para que se realice el traslado
4. El personal del laboratorio CQF trasladará el cooler desde el Hospital San Juan de Dios hasta el laboratorio CQF
5. En el laboratorio CQF se utilizará el volumen de sangre total restante en cada tubo para análisis de expresión según protocolo internos

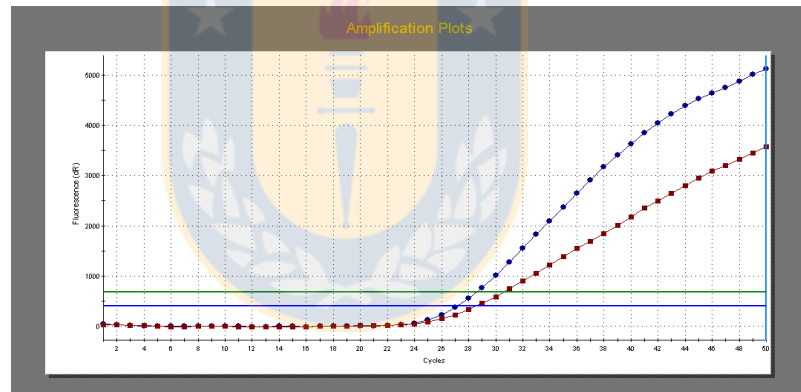


## ANEXO VIII ANÁLISIS GENOTÍPICO

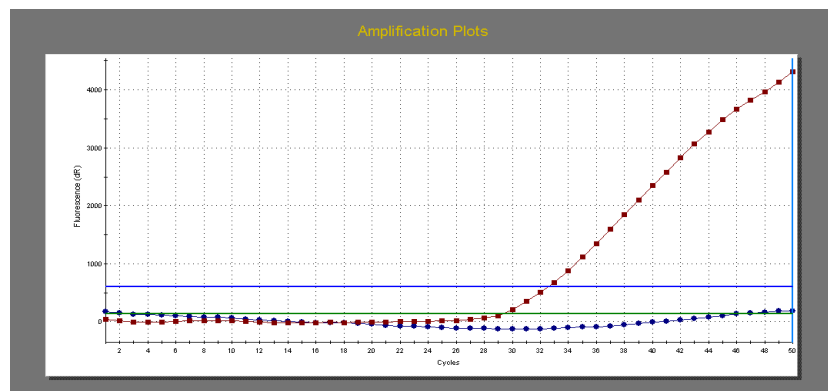
**GRAFICO Curva** de amplificación WT (Fuente: Elaboración propia)



**GRAFICO 4**, Curva de amplificación heterocigoto (Fuente: Elaboración propia)



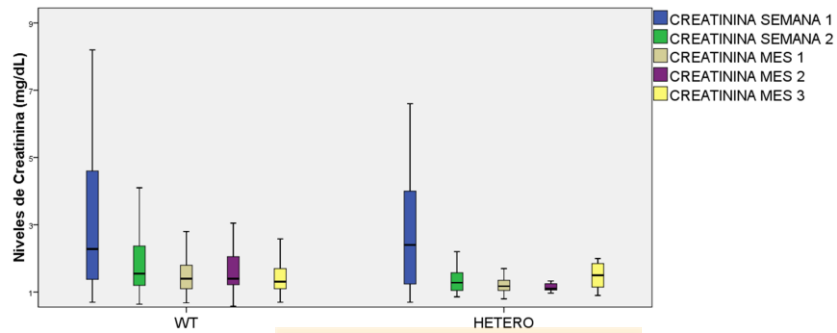
**GRAFICO 3**, Curva de amplificación del genotipo (Fuente: Elaboración propia)



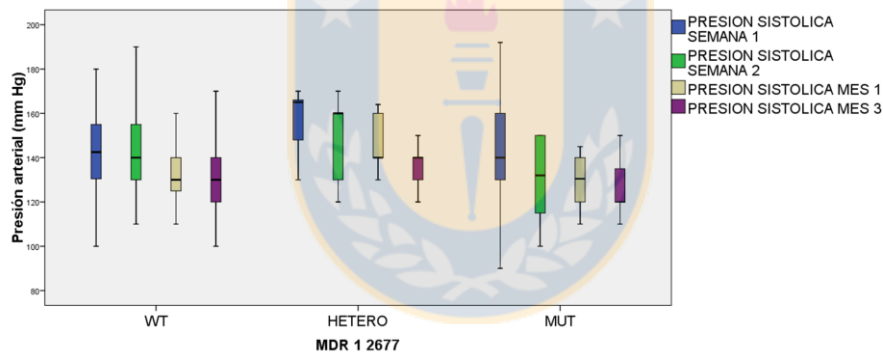


## ANEXO IX REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS SIGNIFICATIVOS

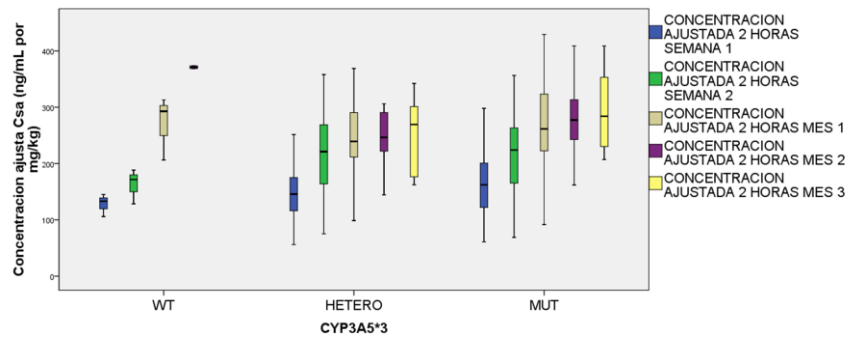
(Fuente: Elaboración propia)



\* p<0.001, \*\* p=0.008 y \*\*\* p = 0.010 al analizar con test t student contra wt



\* p = 0.043 y \*\* p= 0.026 , al analizar con test t student con respecto a los pacientes wt.



\* p=0.039, \*\* p= 0.001 , ° p = 0.029 y \*\* p= 0.001 al analizar con test t student con respecto a los pacientes wt.