



*A mis padres,  
por su amor incondicional.*



**TESIS DOCTORAL**

**“ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL  
CITOCROMO P450 Y LA GLICOPROTEÍNA-P EN LA TERAPÉUTICA DEL  
TRASPLANTE RENAL”**

Montserrat García Cerrada

DEPARTAMENTO DE TERAPÉUTICA MÉDICO-QUIRÚRGICA

**Conformidad de los Directores**

**Fdo: Guillermo Gervasini Rodríguez**

**Fdo: Julio Benítez Rodríguez**

**2015**

D. GUILLERMO GERVASINI RODRÍGUEZ, Profesor Titular, y D. JULIO BENÍTEZ RODRÍGUEZ, Catedrático, ambos del Departamento de Terapéutica Médico-Quirúrgica de la Universidad de Extremadura:

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> Montserrat García Cerrada, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado “*ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL CITOCROMO P450 Y LA GLICOPROTEÍNA-P EN LA TERAPÉUTICA DEL TRASPLANTE RENAL*”

Como directores del trabajo hacemos constar que éste ha sido realizado con todas las garantías técnicas y metodológicas, y que las conclusiones obtenidas son plenamente válidas. Consideramos además que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Badajoz 07 de octubre de 2015

Fdo. D. Guillermo Gervasini Rodríguez

D. Julio Benítez Rodríguez

Los resultados de la siguiente memoria se han recogido en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos

### **Publicaciones**

- Gervasini G, García M, Macías RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J.  
Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int.* 2012 Apr;25(4):471-80
  
- García M, Macías RM, Cubero JJ, Benítez J, Caravaca F, Gervasini G.  
ABCB1 polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013 Mar;69(3):385-93
  
- Gervasini G, García M, Macías RM, Benitez J, Caravaca F, Cubero JJ.  
CYP2C8\*3 polymorphism and donor age are associated with allograft dysfunction in kidney transplant recipients treated with calcineurin inhibitors. *J Clin Pharmacol.* 2013 Apr;53(4):427-34

### **Congresos**

- R.M. Macías, M. García, R. Martínez, F. Ferreira, F. Caravaca, J. Benítez, J.A. Carrillo, G. Gervasini, J.J. Cubero. Polimorfismos genéticos en los genes *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1* modifican la farmacocinética y farmacodinámica del tacrolimus en pacientes con trasplante renal. XLI Congreso de la Sociedad Española de Nefrología. Sevilla, 15-18 Octubre, 2011
  
- García M, Macías RM, Caravaca F, Benitez J, Cubero J, Carrillo JA, Gervasini G. ABCB1 single nucleotide polymorphisms influence the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclosporine in kidney transplant recipients. 10th Congress of the European Association of Clinical Therapeutics (Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology, 2011, 109, Suppl 1 pag. 25). Budapest, Hungría, 26-29 Junio 2011
  
- García M, Macías RM, Caravaca F, Benitez J, Cubero J, Carrillo JA, Gervasini G. Polymorphisms in the *CYP3A4*, *CYP3A5* and *ABCB1* genes modify tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in renal transplant recipients. 10th Congress of the European Association of Clinical Therapeutics (Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology, 2011, 109, Suppl 1 pag. 64). Budapest, Hungría, 26-29 Junio 2011

## AGRADECIMIENTOS

*Un duro y largo camino he recorrido para llegar hasta aquí; tanto es así, que aún me parece mentira estar escribiendo estas líneas. Ha dado tiempo a que sucedan muchos acontecimientos, profesionales y personales, que han influido en el devenir de este proyecto, dificultando la labor y alargándola en el tiempo. A todas esas personas de mi entorno, obligadas a convivir también con este trabajo, les he de agradecer su gran apoyo y, sobre todo, su inmensa paciencia.*

*A Marcos, que ha vivido en primera persona todo el proceso, gracias por tu cariño y comprensión, por tu apoyo en los momentos de “bajona”, o aguantar mis cambios de humor fruto del estrés al que estuve sometida. Y, sobre todo, por esa maravilla de niña que es toda nuestra vida.*

*A mis padres. ¡Benditos padres! Que supisteis inculcarme el valor del esfuerzo y la perseverancia para lograr un fin, que me habéis brindado todo vuestro amor en momentos muy duros. Y a ti, mamá, gracias por ser la abuela 10. Siempre os estaré agradecida.*

*A mi tesoro, Nerea, que el querer estar más tiempo a su lado disfrutando de esos primeros añitos, me ha dado fuerzas para continuar y concluir el proyecto.*

*A mis hermanos, Lupe, César y Esther, que han llenado de alegría todos estos años con sus locas ocurrencias, haciendo que me relajara y cogiera fuerzas para seguir.*

*A mis cuñados y suegros, por estar ahí cuando los necesité y por brindarme su cariño.*

*A mis amigos, por su insistencia en que no cesara en mi empeño y porque siempre han confiado en mi capacidad para terminarlo.*

*Al departamento de Nefrología, en especial al Dr. Cubero y a la Dra. Rosa M. Macías, por permitirme el acceso a sus bases de datos e historias de pacientes y por su inestimable ayuda tanto para recopilar los datos clínicos como para apoyar con sus conocimientos sobre el tema.*

*A Mercedes, porque sin tu encomiable labor en el laboratorio, este trabajo no hubiera concluido aún, y por recibirme siempre con una sonrisa. Fue un placer compartir laboratorio contigo.*

*A mis directores de tesis, D. Julio Benítez por darme la oportunidad de conocer el apasionante mundo de la farmacocinética y por aportar sus conocimientos, y en especial, Guillermo, por su inmensa paciencia, su comprensión, su buena disposición, siempre colaborador, haciendo que lo difícil parezca fácil y por su gran apoyo en todas las fases del proyecto. Gracias por creer en mí.*

*Este proyecto es un poquito de todos vosotros. Mil gracias.*

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Absorbancia
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>ABCB1</b>	Gen de la glicoproteína P (del inglés " <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i> ")
<b>ACr</b>	Aclaramiento de creatinina
<b>AUC</b>	Área bajo la curva de concentraciones sanguíneas (del inglés " <i>area under the curve</i> ")
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Calcio
<b>C<sub>0</sub></b>	Concentraciones valle, mínimas o predosis del fármaco
<b>C<sub>2</sub></b>	Concentraciones del fármaco a las 2 horas postdosis
<b>C<sub>0</sub>/D</b>	Concentraciones valle corregidas por la dosis ajustada al peso.
<b>Cr</b>	Creatinina
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CYP2C8</b>	Gen del Citocromo P450, familia 2, subfamilia C, polipéptido 8
<b>CYP2J2</b>	Gen del Citocromo P450, familia 2, subfamilia J, polipéptido 2
<b>CYP3A</b>	Gen del Citocromo P450 familia 3, subfamilia A
<b>CYP3A4</b>	Gen del Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 4
<b>CYP3A5</b>	Gen del Citocromo P450, familia 3, subfamilia A, polipéptido 5

<b>D</b>	Dosis corregida por el peso
<b>DM</b>	Diabetes mellitus
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EETs</b>	Ácidos epoxieicosatrienoicos
<b>EFNA</b>	Excreción fraccional de sodio
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica
<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio
<b>FKBP12</b>	Proteína 12 de unión al tacrolimus (del inglés " <i>FK506 binding protein-12</i> ")
<b>Fw</b>	Cebador directo (del inglés " <i>forward</i> ")
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (del inglés " <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> ")
<b>G6PDH</b>	Enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>HG</b>	Hiperplasia gingival
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos ( <i>del inglés "Human leukocyte antigen"</i> ) o Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>IAM</b>	Infarto Agudo de miocardio



<b>IC</b>	Isquemia cardiaca
<b>ICN</b>	Inmunosupresores anticalcineurínicos
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MAF</b>	Frecuencia del alelo menor o variante (del inglés “ <i>Minor Allele Frequency</i> ”)
<b>MMF</b>	Micofenolato-mofetil
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
<b>NCI</b>	Nefropatía Crónica del Injerto
<b>NF-AT</b>	Factor nuclear de las células T (del inglés “ <i>nuclear factor of activated T-cells</i> ”)
<b>NTA</b>	Necrosis Tubular Aguda
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”)
<b>P-gp</b>	Glicoproteína P
<b>pmp</b>	Por millón de población
<b>RA</b>	Rechazo Agudo
<b>RFLP</b>	Estudio de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (del inglés “ <i>Restriction fragment length polymorphism</i> ”)

<b>RFR</b>	Retraso de la Función Renal
<b>PRA</b>	Panel de anticuerpos citotóxicos anti-HLA reactivos
<b>Rv</b>	Cebador inverso (del inglés “ <i>reverse</i> ”)
<b>SNP</b>	Polimorfismos de nucleótido único (del inglés “ <i>single nucleotide polymorphisms</i> ”)
<b>TDM</b>	Monitorización terapéutica de fármacos (del inglés “ <i>therapeutic drug monitoring</i> ”)
<b>TFG</b>	Tasa de Filtración Glomerular
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento tumoral β (del inglés “ <i>Transforming growth factor beta</i> ”)
<b>TNFα</b>	Factor necrótico tumoral α (del inglés “ <i>Tumor necrosis factor alpha</i> ”)

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	1
Summary.....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1. EL TRASPLANTE RENAL.....	5
1.1.1. Breve historia del trasplante renal .....	5
1.1.2. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante renal .....	6
1.1.3. Complicaciones del Trasplante Renal.....	8
1.1.3.1. Disfunción precoz del injerto.....	9
1.1.3.2. Disfunción crónica del injerto .....	10
1.2. INMUNOSUPRESORES ANTICALCINEURÍNICOS.....	11
1.2.1. Mecanismo de acción de los ICN .....	12
1.2.2. Efectos farmacológicos y adversos .....	14
1.2.2.1. Nefrotoxicidad Aguda .....	15
1.2.2.2. Nefrotoxicidad crónica .....	16
1.2.2.3. Neurotoxicidad .....	16
1.2.2.4 Hiperplasia gingival .....	19
1.2.3. Farmacocinética .....	19
1.2.3.1. Absorción .....	19
1.2.3.2. Distribución.....	21
1.2.3.3. Metabolismo y eliminación.....	21
1.2.4. Interacciones farmacológicas .....	22
1.2.5. Monitorización de niveles plasmáticos.....	24
1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN <i>CYP3A</i> Y <i>ABCB1</i> .....	27
1.3.1. Polimorfismos genéticos en <i>CYP3A4</i> .....	27
1.3.2. Polimorfismos genéticos en <i>CYP3A5</i> .....	28
1.3.3. Polimorfismos genéticos en <i>ABCB1</i> .....	29

1.3.4. Desequilibrios de ligamiento.....	29
1.3.5. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacocinética de la ciclosporina .....	30
1.3.5.1. <i>CYP3A4*1B</i> .....	30
1.3.5.2. <i>CYP3A5*3</i> .....	31
1.3.5.3. <i>ABCB1 3435C&gt;T, 1236C&gt;T y 2677G&gt;T/A</i> .....	33
1.3.6. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacocinética del tacrolimus ...	36
1.3.6.1. <i>CYP3A4*1B</i> .....	36
1.3.6.2 <i>CYP3A5*3</i> .....	38
1.3.6.3. <i>ABCB1 3435C&gt;T, 1236C&gt;T y 2677G&gt;T/A</i> .....	42
1.3.7. Influencia de polimorfismos genéticos en <i>CYP3A</i> y <i>ABCB1</i> sobre la farmacodinamia de la ciclosporina. ....	46
1.3.7.1. <i>CYP3A4*1B</i> .....	46
1.3.7.2 <i>CYP3A5*3</i> .....	47
1.3.7.3. <i>ABCB1 3435C&gt;T, 1236C&gt;T y 2677G&gt;T/A</i> .....	48
1.3.8. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacodinamia del tacrolimus...	50
1.3.8.1. <i>CYP3A4*1B</i> .....	50
1.3.8.2. <i>CYP3A5*3</i> .....	50
1.3.8.3 <i>ABCB1 3435C&gt;T, 1236C&gt;T y 2677G&gt;T/A</i> .....	53
1.4. RELEVANCIA DE LAS RUTAS METABÓLICAS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN EL TRASPLANTE RENAL .....	55
1.4.1. La biotransformación del ácido araquidónico.....	55
1.4.2. Funciones de los ácidos epoxieicosatrienoicos .....	56
1.4.3. Enzimas CYP450 productoras de EETs .....	57
1.4.3.1. CYP2C8: expresión, sustratos y polimorfismos importantes del gen .....	58
1.4.3.2. CYP2J2: expresión, sustratos y polimorfismos importantes del gen .....	58
1.4.4. Implicaciones clínicas de <i>CYP2C8*3</i> y <i>CYP2J2*7</i> .....	59
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	61

<b>3. PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	63
3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES EN EL ESTUDIO.....	64
3.2. MATERIALES Y REACTIVOS.....	65
3.2.1. Materiales.....	65
3.2.3. Reactivos .....	66
3.3. MÉTODOS DE GENOTIPACIÓN.....	67
3.3.1. Purificación del ADN genómico a partir de sangre total periférica.....	68
3.3.2. Estimación de la cantidad y calidad del ADN.....	69
3.3.3. Amplificación de los fragmentos seleccionados de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	70
3.3.4. Electroforesis de verificación de los productos de PCR.....	73
3.3.4.1. Preparación del gel de agarosa al 2%.....	73
3.3.4.2. Preparación de las muestras .....	74
3.3.4.3. Condiciones de separación electroforética .....	74
3.3.4.4. Visualización del gel.....	75
3.3.5. Purificación y precipitación de los productos de PCR.....	75
3.3.5.1. Protocolo para precipitación de productos de PCR.....	76
3.3.6. Identificación de genotipos .....	77
3.3.6.1. Estudio de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) .....	77
3.3.6.2. Secuenciación de los productos de PCR.....	77
3.4. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE ICN POR MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS	79
3.4.1. Fundamento del inmunoensayo enzimático homogéneo .....	79
3.4.2. Protocolo para la determinación de los niveles de ICN.....	80
3.5. RECOPIACIÓN DE DATOS. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS .....	81
3.5.1. Parámetros farmacocinéticos .....	81
3.5.2. Parámetros farmacodinámicos .....	82

3.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	83
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>86</b>
4.1. ESTUDIO I: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES EN TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR CON TACROLIMUS.....	87
4.1.1. Características de la población de estudio .....	87
4.1.2. Distribución de genotipos en la población de estudio .....	89
4.1.3. Efecto de los genotipos <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> sobre la exposición del paciente al tacrolimus y sus requerimientos de dosis .....	90
4.1.4. Efecto de los genotipos <i>ABCB1</i> /haplotipos en la exposición del paciente al tacrolimus y requerimientos de dosis .....	92
4.1.5. Asociación de polimorfismos genéticos con parámetros farmacodinámicos .....	94
4.1.6. Resumen de resultados del estudio I .....	99
4.2. ESTUDIO II: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES EN TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR CON CICLOSPORINA.....	99
4.2.1. Características de la población de estudio .....	99
4.2.2. Distribución de genotipos en la población de estudio .....	99
4.2.3. Efecto de los genotipos <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en la exposición del paciente a la CsA y requerimientos de dosis .....	100
4.2.4. Efecto de los genotipos/haplotipos <i>ABCB1</i> en la exposición del paciente a CsA y sobre sus requerimientos de dosis .....	105
4.2.5. Asociación de polimorfismos con parámetros farmacodinámicos .....	105
4.2.6. Resumen de resultados del estudio II .....	109
4.3. ESTUDIO III: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA CON DISFUNCIÓN DEL INJERTO.....	110
4.3.1. Distribución de genotipos en la población de estudio.....	111

4.3.2. Estudio de asociación de polimorfismos con parámetros y eventos relacionados con la función del injerto.....	112
4.3.3. Asociación de polimorfismos con nefrotoxicidad inducida por inmunosupresores anticalcineurínicos.....	116
4.3.4. Asociación de polimorfismos con el riesgo de rechazo agudo .....	117
4.3.5. Identificación de un marcador de riesgo para eventos desfavorables tras el trasplante .....	119
4.3.6. Resumen de resultados del Estudio III .....	120
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>137</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>140</b>
<b>8. PUBLICACIONES.....</b>	<b>182</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Indicaciones y contraindicaciones del trasplante renal.....	página 7
<b>Tabla 2.</b>	Complicaciones frecuentes del trasplante renal.....	página 8
<b>Tabla 3.</b>	Causas de disfunción precoz del injerto.....	página 9
<b>Tabla 4.</b>	Efectos adversos de CsA y tacrolimus.....	página 14
<b>Tabla 5.</b>	Principales consecuencias fisiológicas de la nefrotoxicidad por ICN..... .....	página 15
<b>Tabla 6.</b>	Diagnóstico diferencial entre nefrotoxicidad por ICN y rechazo.....	página 17
<b>Tabla 7.</b>	Interacciones medicamentosas con los inmunosupresores anticalcineurínicos.....	página 23
<b>Tabla 8.</b>	Modos de empleo de la inmunosupresión en adultos trasplantados renales... .....	página 25
<b>Tabla 9.</b>	Estudios de la influencia del alelo <i>CYP3A4*1B</i> en la respuesta del paciente a la CsA.....	página 31
<b>Tabla 10.</b>	Estudios de la influencia del SNP <i>CYP3A5 6989A&gt;G</i> en la respuesta del paciente a la CsA.....	página 32
<b>Tabla 11.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs <i>ABCB1 3435C&gt;T</i> , <i>1236C&gt;T</i> y <i>2677G&gt;T/A</i> en la respuesta del paciente a la CsA.....	página 35
<b>Tabla 12.</b>	Estudios de la influencia del SNP <i>CYP3A4*1B</i> en la respuesta del paciente al tacrolimus.....	página 37
<b>Tabla 13.</b>	Estudios de la influencia del SNP <i>CYP3A5 6989C&gt;T</i> en la respuesta del paciente al tacrolimus.....	página 39
<b>Tabla 14.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs <i>ABCB1 3435C&gt;T</i> , <i>1236C&gt;T</i> y <i>2677G&gt;T/A</i> en la respuesta del paciente al tacrolimus.....	página 43



<b>Tabla 15.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs del <i>CYP3A</i> en la farmacodinamia de la CsA.....	página 47
<b>Tabla 16.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs del <i>ABCB1</i> en la farmacodinamia de la CsA.....	página 49
<b>Tabla 17.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs del <i>CYP3A</i> en la farmacodinamia del tacrolimus.....	página 52
<b>Tabla 18.</b>	Estudios de la influencia de los SNPs del <i>ABCB1</i> en la farmacodinamia del tacrolimus.....	página 54
<b>Tabla 19.</b>	Implicaciones clínicas de los SNPs en genes responsables de la formación de EETs más ampliamente estudiados ( <i>CYP2C8*3</i> y <i>CYP2J2*7</i> )....	página 60
<b>Tabla 20.</b>	Concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción de la PCR.....	página 70
<b>Tabla 21.</b>	Resumen de los oligonucleótidos utilizados en los análisis genéticos de este estudio.....	página 71
<b>Tabla 22.</b>	Características clínicas y parámetros farmacocinéticos de los pacientes trasplantados de riñón tratados con tacrolimus (n = 103).....	página 88
<b>Tabla 23.</b>	Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en 103 trasplantados renales.....	página 89
<b>Tabla 24.</b>	Efecto de los genotipos <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en las concentraciones valle corregidas por dosis del tacrolimus (ng/ml por mg/día por kg de peso) a los cuatro tiempos considerados.....	página 91
<b>Tabla 25.</b>	Efecto de los genotipos <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en los requerimientos de dosis del tacrolimus (mg/kg/día) en los cuatro tiempos considerados.....	página 92
<b>Tabla 26.</b>	Proporción (%) de pacientes en el rango de concentraciones diana de tacrolimus según su genotipo de <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en distintos momentos postrasplante del estudio.....	página 93

<b>Tabla 27.</b>	Efecto del número de alelos variantes <i>ABCB1</i> en niveles valle ajustados por dosis y requerimientos de dosis en pacientes que no expresan <i>CYP3A5</i> (n = 93).....	página 94
<b>Tabla 28.</b>	Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en función de los genotipos o combinaciones <i>CYP3A4/CYP3A5</i> .....	página 95
<b>Tabla 29.</b>	Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en función de los genotipos o haplotipos del <i>ABCB1</i> (C3435T-G2677T/A-C1236T) en 103 pacientes trasplantados renales tratados con tacrolimus.....	página 96
<b>Tabla 30.</b>	Efectos de los polimorfismos y haplotipos de <i>CYP450</i> y <i>ABCB1</i> (3435-2677-1236) en las consecuencias clínicas del trasplante renal.....	página 97
<b>Tabla 31.</b>	Características clínicas y parámetros farmacocinéticos de los pacientes trasplantados de riñón tratados con CsA (n=68).....	página 101
<b>Tabla 32.</b>	Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en 68 trasplantados de riñón tratados con CsA.....	página 102
<b>Tabla 33.</b>	Efecto de los genotipos y las combinaciones de <i>CYP3A4/CYP3A5</i> en los niveles de CsA corregidos por dosis (ng/ml por mg/día por Kg de peso corporal) a lo largo del estudio.....	página 102
<b>Tabla 34.</b>	Efecto de los genotipos <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en los requerimientos de dosis de CsA (mg/kg/día) en los cuatro puntos de tiempo considerados.....	página 103
<b>Tabla 35.</b>	Proporción (%) de pacientes en el rango de concentraciones valle ( $C_0$ ) diana de CsA según su genotipo de <i>CYP3A4</i> y <i>CYP3A5</i> en distintos momentos postrasplante del estudio.....	página 104
<b>Tabla 36.</b>	Efecto de genotipos <i>ABCB1</i> sobre concentraciones valle de CsA ajustadas por dosis en pacientes que no expresan <i>CYP3A5</i> (n = 58).....	página 106
<b>Tabla 37.</b>	Valores de Aclaramiento de creatinina en función de los genotipos o combinaciones del <i>CYP3A4/CYP3A5</i> en 68 pacientes trasplantados renales tratados con CsA.....	página 106

<b>Tabla 38.</b>	Valores de aclaramiento de creatinina en función de los genotipos o haplotipos del <i>ABCB1</i> (C1236T-G2177T/A-C3435T) en 68 pacientes trasplantados renales tratados con CsA.....	página 107
<b>Tabla 39.</b>	Efecto de los distintos genotipos y combinaciones de alelos variantes <i>ABCB1</i> en la incidencia de nefrotoxicidad e hiperplasia gingival inducida por CsA (Sí/No).....	página 108
<b>Tabla 40.</b>	Características de los pacientes y parámetros relacionados con el trasplante en 166 pacientes.....	página 110
<b>Tabla 41.</b>	Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs estudiados en 166 pacientes trasplantados renales.....	página 111
<b>Tabla 42.</b>	Asociaciones de los polimorfismos del <i>CYP450</i> con el aclaramiento de creatinina (ml/min) en los cuatro puntos temporales considerados tras el trasplante.....	página 114
<b>Tabla 43.</b>	Efecto de los genotipos <i>ABCB1</i> en la incidencia de Nefrotoxicidad inducida por Inhibidores de la calcineurina.....	página 118
<b>Tabla 44.</b>	Asociación de los eventos clínicos desfavorables con el riesgo conferido por la edad del donante mayor de 48 años y la presencia del alelo <i>CYP2C8*3</i> ....	página 121

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular de Ciclosporina y Tacrolimus.....	página 12
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción de ciclosporina y tacrolimus.....	página 13
<b>Figura 3.</b> Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad de ICN.....	página 18
<b>Figura 4.</b> Combinación de las funciones del CYP3A y la familia de transportadores ABC .....	página 20
<b>Figura 5.</b> Localización de los genes <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> y <i>ABCB1</i> en el cromosoma 7..... .....	página 30
<b>Figura 6.</b> Vías epoxigenasa e hidrolasa del metabolismo del ácido araquidónico..... .....	página 56
<b>Figura 7.</b> Localización de <i>CYP2C8</i> en el cromosoma 10 y <i>CYP2J2</i> en el cromosoma 1... .....	página 59
<b>Figura 8.</b> Condiciones aplicadas en la PCR para la amplificación de los SNPs estudiados .....	página 72
<b>Figura 9.</b> Genotipación de los SNPs del <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>CYP2C8</i> y <i>CYP2J2</i> mediante RFLP .....	página 78
<b>Figura 10.</b> Fundamento del inmunoensayo enzimático.....	página 80
<b>Figura 11.</b> Correlación de la edad del donante con el aclaramiento de creatinina..... .....	página 115
<b>Figura 12.</b> Correlación de la edad del receptor con el aclaramiento de creatinina..... .....	página 115
<b>Figura 13.</b> Efecto del estatus de alto riesgo en el aclaramiento de creatinina un año postrasplante.....	página 119

**RESUMEN**

El trasplante renal es el principal tratamiento frente a la enfermedad renal crónica terminal. Los inmunosupresores anticalcineurínicos (ICN) como el tacrolimus y la ciclosporina A (CsA) son necesarios para evitar un rechazo agudo (RA), sobre todo en los primeros días postrasplante. Estos fármacos, sin embargo, presentan un estrecho margen terapéutico, lo que implica una cuidadosa monitorización. Uno de los factores que influye en las dosis y niveles de los ICN son las variaciones en genes implicados en su metabolismo y transporte. Por otro lado, el procedimiento quirúrgico puede producir una lesión por isquemia-reperfusión que puede incrementar el riesgo de disfunción del injerto. Se ha visto que los ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs) endógenos juegan un papel protector contra estos procesos dañinos en el riñón.

El objetivo de este trabajo fue determinar si variantes en genes metabolizadores (*CYP3A4/5*) y transportadores (*ABCB1*) de ICN, así como polimorfismos en las enzimas que sintetizan EETs (*CYP2C8*, *CYP2J2*) podrían estar relacionados con parámetros farmacocinéticos y/o farmacodinámicos en 171 trasplantados renales tratados con CsA (n=68) o tacrolimus (n=103).

Nuestros resultados mostraron una asociación entre la presencia del alelo *CYP3A5\*1* funcional y una menor exposición al tacrolimus, con mayores requerimientos de dosis. Este efecto se veía potenciado si, además, los pacientes eran portadores de la variante *CYP3A4\*1B*, de modo que ninguno de los pacientes con la combinación *CYP3A4\*1B-CYP3A5\*1* alcanzó el rango terapéutico de ICN en la primera semana postrasplante. Sin embargo, estas variantes genéticas no tuvieron un efecto reseñable sobre la respuesta clínica del paciente. Sólo en los pacientes tratados con CsA, hayamos una asociación entre la incidencia de nefrotoxicidad y la aparición de hiperplasia gingival con la presencia de 4 o más variantes alélicas en el gen *ABCB1*. En el total de la población de trasplantados, portar el alelo *CYP2C8\*3* y recibir un injerto de

un donante mayor de 48 años se relacionó con un riesgo alto de retraso de la función renal y con un peor aclaramiento de creatinina al año postrasplante

Nuestros resultados indican que diversas variantes en genes implicados en la biodisponibilidad de los ICN o de los EETs pueden tener una repercusión tanto en la farmacocinética de estos inmunosupresores como en la respuesta clínica del paciente trasplantado. Por tanto, el conocer su presencia a priori, en combinación con otros datos clínicos y demográficos, puede ayudar a mejorar la individualización de la terapia inmunosupresora.

*Palabras claves:* trasplante renal, ciclosporina, tacrolimus, polimorfismos genéticos, *CYP3A*, *ABCB1*, *CYP2C8*, *CYP2J2*

## Summary

Kidney transplantation is the main treatment against chronic kidney disease. The immunosuppressive calcineurin inhibitors (CNI), such as tacrolimus and cyclosporine A (CsA), are required to prevent acute rejection (AR), especially in the first days after transplantation. These drugs, however, have a narrow therapeutic window, which implicates careful monitoring. One factor that influences CNI doses and concentrations are the alterations in genes involved in their metabolism and transport. Furthermore, the surgical procedure may result in ischemia-reperfusion injury, which in turn, can increase the risk of graft dysfunction. It has been demonstrated that endogenous epoxyeicosatrienoic acids (EETs) play a protective role against these damaging processes in the kidney.

The aim of this study was to determine if variations in genes that metabolize (*CYP3A4/5*) or transport (*ABCB1*) CNI, as well as polymorphisms in the enzymes that synthesize EETs (*CYP2C8*, *CYP2J2*), may be related to pharmacokinetic and/or

pharmacodynamic parameters in 171 kidney transplant recipients who were treated with CsA (n=68) or tacrolimus (n=103).

Our results revealed an association between the presence of the functional *CYP3A5\*1* allele and less exposure to tacrolimus, with higher dose requirements. This effect was enhanced if, in addition, patients were carriers of the *CYP3A4\*1B* variant. Indeed, none of the patients with the combination *CYP3A4\*1B-CYP3A5\*1* reached ICN therapeutic levels in the first week after transplant. However, these genetic variants did not exert a significant effect on the occurrence of undesirable clinical events. Only in patients treated with CsA, we observed an association between the incidence of nephrotoxicity and gingival hyperplasia in patients with 4 or more *ABCB1* allelic variants. In the total population of patients, those who carried the *CYP2C8\*3* allele and received a graft from a donor older than 48 years of age displayed an increased risk of delayed graft function and poorer creatinine clearance one year after transplant.

Our findings indicate that several variants in genes involved in the bioavailability of CNI or EETs can have an impact both on the pharmacokinetics of these immunosuppressants and in the patient's clinical response. Therefore, the identification of these polymorphisms, in combination with other clinical and demographic data can help improve the individualization of immunosuppressive therapy in renal transplantation.

*Keywords:* renal transplant, cyclosporine, tacrolimus, genetic polymorphisms, *CYP3A*, *ABCB1*, *CYP2C8*, *CYP2J2*

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1.1. EL TRASPLANTE RENAL

### 1.1.1. Breve historia del trasplante renal

En 1933, el ucraniano Voronoy realizó el primer trasplante de riñón entre humanos, sin embargo el injerto nunca funcionó y la paciente falleció a los 4 días de la operación. Posteriormente, en 1946, Hume y cols. realizaron un trasplante renal bajo anestesia local a una joven con insuficiencia renal postparto. El breve periodo de tiempo que funcionó el injerto fue suficiente para recuperarse de su fallo renal y sobrevivir (Hume y cols. 1955). En la década de los 50 se realizó el primer trasplante renal con éxito entre gemelos univitelinos y se empezaron a investigar los mecanismos del rechazo en el trasplante entre personas no idénticas.

Con el descubrimiento de los antígenos ABO y de histocompatibilidad HLA se sentaron las bases inmunológicas fundamentales para entender el fenómeno del rechazo y la búsqueda de una terapia inmunosupresora (Maganto 2000). En 1962 se introdujo la azatioprina como inmunosupresor, lo que permitió el desarrollo del trasplante de donante cadavérico. En la década de los 60 se disparan también los acontecimientos con mejoras en diálisis, conservación de órganos y perfusión, la tipificación del tejido para la selección de los donantes y receptores o la prueba cruzada entre el suero del receptor y células del donante para predecir el rechazo hiperagudo (Hamilton 1984). Se introduce, además, el concepto de muerte cerebral regulándose jurídicamente las leyes que permitan las donaciones.

La década de los 70 es el período de consolidación de la diálisis y el trasplante renal como tratamiento sustitutivo en pacientes con insuficiencia renal. Varias mejoras contribuyeron a incrementar la supervivencia funcional de los injertos, reduciéndose la mortalidad a un 25%. Probablemente el hito más importante en la historia del trasplante fue el descubrimiento de la Ciclosporina A (CsA) en 1976 por Borel (Borel y cols. 1976), que conllevó respuestas espectaculares de supervivencia del injerto. En los 80 se utilizan por primera vez los anticuerpos monoclonales como tratamiento del rechazo

corticorresistente. La búsqueda de fármacos menos tóxicos y más potentes llevó a la aparición del tacrolimus, el sirolimus (rapamicina) o la deoxispergualina. Desde entonces hasta nuestros días los esfuerzos van encaminados a solventar la falta de órganos para el trasplante por la escasez de donaciones.

En España, los dos primeros homotrasplantes con éxito se realizaron en 1965 (Maganto 2000). Desde entonces ha habido una gran evolución en el trasplante de riñón en nuestro país (de 39 intervenciones en 1975 a 2678 en 2014; datos de la Organización Nacional de Trasplantes; [www.ont.es](http://www.ont.es)) El Hospital Infanta Cristina de Badajoz, donde se ha realizado este trabajo, se incorpora a la red de coordinadores al servicio de los programas de trasplantes en 1988 (Pérez 2006). En trasplante renal de donante cadáver, España ocupó el segundo lugar a nivel mundial en 2013, con una tasa de 46,3 donantes por millón de población (pmp) (Datos del observatorio Global del Donación y Trasplante; [www.transplant-obervatory.org](http://www.transplant-obervatory.org)) Sin embargo, a nivel de las CCAA, Extremadura ha visto en los últimos años un notable descenso en la tasa de trasplante renal, aunque con las 44 intervenciones de 2014 se recuperan los números de 2011.

### **1.1.2. Indicaciones y contraindicaciones del trasplante renal**

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un problema de salud pública por su alta comorbilidad, sobre todo por eventos cardiovasculares, y por el alto coste económico que acarrea (Go y cols. 2004; van der Velde y cols. 2011). Se define como existencia de lesión renal (presencia de anormalidades estructurales o funcionales) con o sin aumento de la tasa de filtración glomerular (TFG) a menos de 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> (estadios 3-5 de la guía KDIGO) durante un período de  $\geq 3$  meses (Levin y Stevens 2014). La ERC es un proceso fisiopatológico multifactorial de carácter progresivo e irreversible que frecuentemente lleva a la Enfermedad Renal en estado Terminal (ERT), caracterizada por el síndrome urémico y una TFG < 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, en el que el paciente requiere

obligatoriamente de tratamiento sustitutivo renal (diálisis o trasplante). Cada año unas 6.000 personas con ERC en España progresan a ERT, con una incidencia y prevalencia crecientes en torno a 124 pmp y 1122 pmp, respectivamente (SENEFRO 2014). Las principales causas de ERT se describen en la Tabla 1. Además de una ERT, el posible receptor de trasplante renal no debe presentar complicaciones o enfermedades graves asociadas que comprometan su supervivencia y estar en perfectas facultades mentales como para entender y asumir el tratamiento. Hoy día son muy pocas las contraindicaciones absolutas al trasplante (Tabla 1). Las contraindicaciones relativas son aquellas que requieren una evaluación cuidadosa para llevar a cabo su corrección o tratamiento antes del trasplante y así reducir riesgos de morbilidad y mortalidad tras el proceso (García de Jalón Martínez y cols. 2003) (Tabla 1).

Indicaciones	Contraindicaciones absolutas	Contraindicaciones relativas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glomerulonefritis<sup>(1)</sup></li> <li>- Pielonefritis</li> <li>- Enf. Hereditarias<sup>(2)</sup></li> <li>- Metabolopatías<sup>(3)</sup></li> <li>- Uropatía obstructiva</li> <li>- Nefropatía vascular</li> <li>- Nefropatía tóxica<sup>(4)</sup></li> <li>- Enf. Sistémicas (LES)</li> <li>- Sd. Hemolítico-urémico</li> <li>- Tumores</li> <li>- Congénitas</li> <li>- Nefropatía aguda irreversible</li> <li>- Traumatismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cáncer reciente o metastásico</li> <li>- Infección activa</li> <li>- Drogadicción o alcoholismo</li> <li>- Expectativa de vida &lt; 2 años</li> <li>- Enfermedad psiquiátrica grave, crónica y no controlada</li> <li>- Arteriosclerosis generalizada</li> <li>- Incumplimiento terapéutico reiterado</li> <li>- Prueba cruzada positiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad &gt;75 años</li> <li>- Cáncer previo</li> <li>- Comorbilidad<sup>(5)</sup></li> <li>- Nefropatía activa clínica o serológica</li> <li>- Diabetes</li> <li>- Infecciones*</li> <li>- Etiología de la ERC (posible recurrencia)</li> <li>- Anomalías de la vía urinaria</li> <li>- Hiperinmunización</li> </ul>

<sup>(1)</sup> Glomerulonefritis post-infecciosa, membranosa, membrano-proliferativa, Nefropatía IgA, segmentaria y focal, Síndrome de Goodpasture, púrpura de Schönlein-Henoch.

<sup>(2)</sup> Poliquistosis renal, Sd. De Alport, Enf. Quística medular

<sup>(3)</sup> Diabetes mellitus, hiperoxaluria, cistinosis, Enf. de Fabri, amiloidosis, gota, etc.

<sup>(4)</sup> Nefropatía por analgésicos, por opiáceos, litio, AINEs, antineoplásicos, metales, ciclosporina A, etc.

<sup>(5)</sup> Enfermedad cardiovascular, hepática, pulmonar o cerebrovascular.

\* no está contraindicada en ausencia de replicación viral durante > 3 meses, presencia de linfocitos CD4 >200/mm<sup>3</sup> durante > 6 meses y ausencia de infecciones o neoplasias junto con infección estable controlada con antirretrovirales.

**Tabla 1.** Indicaciones y contraindicaciones del trasplante renal (modificado de (Martin y Errasti 2006))

### 1.1.3. Complicaciones del Trasplante Renal

Tras el trasplante se requiere un seguimiento cuidadoso para detectar y tratar a tiempo cualquier complicación, que pueda afectar a la supervivencia del injerto y del paciente tanto a corto, como a largo plazo. Éstas pueden ser médicas o quirúrgicas, precoces o tardías. Las resumimos en la Tabla 2 (Singer y cols. 2005).

El periodo precoz postrasplante renal incluye los primeros tres meses, donde pueden presentarse complicaciones que son causa frecuente de pérdida del injerto y muerte del paciente. En la primera semana postrasplante predominan las complicaciones quirúrgicas y de la 2ª semana al 3<sup>er</sup> mes prevalecen las médicas.

Precoces	Tardías
<p><b>Quirúrgicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parénquima: rotura injerto renal</li> <li>- Herida: dehiscencia herida, infección, etc.</li> <li>- Vascular: sangrado, trombosis arterial o venosa</li> <li>- Linfática: Linfocele</li> <li>- Urológica: obstrucción, fístula urinaria</li> </ul> <p><b>Médicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Rechazo: hiperagudo, acelerado, agudo</li> <li>- Necrosis tubular aguda</li> <li>- Nefrotoxicidad por fármacos</li> <li>- Infecciones</li> <li>- Cardio-vascular: IAM, IC, trombosis venosa, etc.</li> <li>- Digestivas: hemorragia, diverticulitis, colecistitis, pancreatitis aguda, hepatitis fulminante.</li> <li>- Hematológicas: anemia, leucopenia</li> </ul>	<p><b>Quirúrgicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estenosis de la arteria renal</li> </ul> <p><b>Médicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infecciones</li> <li>- Cardio-vascular: HTA, coronariopatía, etc.</li> <li>- Nefropatía crónica del injerto</li> <li>- Recurrencia de la nefropatía</li> <li>- Tumores</li> <li>- Enfermedad ósea</li> <li>- Gastrointestinales, pancreáticas y hepáticas</li> <li>- Cutáneas</li> <li>- Hematológicas</li> <li>- Oculares</li> <li>- Neurológicas</li> <li>- Metabólicas: DM, hiperuricemia, etc.</li> </ul>

**Tabla 2.** Complicaciones frecuentes del trasplante renal. IAM: infarto agudo de miocardio; IC: Insuficiencia cardíaca; HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus

La tasa de mortalidad global anual tras el trasplante de cadáver está entre 5-7% aumentando a 10% en los mayores de 65 años. De esta mortalidad, la mitad sucede en los primeros tres meses. Las principales causas de pérdida del injerto es por muerte del

receptor con riñón funcionando por patología cardiovascular, infecciosa o tumoral, como causas más frecuentes (Marcen 2009), seguidas de las pérdidas debidas por disfunción del injerto que pasamos a describir:

### 1.1.3.1. Disfunción precoz del injerto

Es la complicación más frecuente tras el trasplante renal y tiene implicaciones pronósticas sobre la supervivencia del injerto. Sus causas (Tabla 3) y diagnóstico diferencial varían según el momento en que aparezca (González-Posada y cols. 2012).

Periodo	Causas
Postrasplante inmediato (0-7 días) (retraso de la función renal)	Necrosis tubular aguda (NTA)** Rechazo hiperagudo <sup>(1)</sup> Rechazo agudo mediado por células T o por anticuerpos <sup>(1)*</sup> Obstrucción del tracto urinario* Fuga urinaria Trombosis vasculares* Ateroembolismo <sup>(1)</sup> Hipovolemia* Toxicidad por fármacos* Toxicidad por contrastes yodados Síndrome hemolítico-urémico <sup>(1)</sup> Injerto no viable <sup>(1)</sup>
Postrasplante temprano (1-12 semanas)	Rechazo agudo (RA) <sup>a</sup> Toxicidad por ciclosporina/tacrolimus <sup>a</sup> Toxicidad por otros fármacos Infecciones: por virus BK, CMV, otras Obstrucción del tracto urinario <sup>c</sup> Disminución de la perfusión renal <sup>c</sup> Recurrencia de la enfermedad de base Nefritis intersticial por fármacos

\*Causas relativamente frecuentes. \*\*Causas más frecuentes. <sup>(1)</sup>Causas de ausencia de función primaria

**Tabla 3.** Causas de disfunción precoz del injerto

En el **postrasplante inmediato (0-7 días)** pueden aparecer:

- *Función renal inmediata*, con buena diuresis sin necesidad de diálisis y descenso rápido de los productos nitrogenados.
- *Retraso de la función renal (RFR)*, definida por la necesidad de diálisis, oligoanuria o descenso lento de la creatinina plasmática (aclaramiento de creatinina <10 ml/min durante los 3 primeros días postrasplante) (Perico y cols. 2004; Yarlagadda y cols. 2008; Siedlecki y cols. 2011).
- *No función primaria* o injertos no funcionantes.

En el **postrasplante temprano** (1-12 semanas), tras presentar una función renal inicial excelente ésta empeora repentinamente.

El RFR ocurre en el 20-50% de los pacientes trasplantados de donante cadáver (Ounissi y cols. 2013). Implica una peor supervivencia del injerto por una mayor frecuencia de rechazo agudo (RA), peor función renal a corto y medio plazo y mayor riesgo de disfunción crónica del injerto (Perico y cols. 2004; Yarlagadda y cols. 2009; Siedlecki y cols. 2011). Sus principales causas son: (i) la necrosis tubular aguda (NTA), factor tan frecuente que a menudo se considera el mismo proceso que el RFR; (ii) el rechazo, fenómeno inmunológico con una incidencia del 15-25% y que puede ser hiperagudo, agudo mediado por células T o agudo mediado por anticuerpos y (iii) la nefrotoxicidad mediada por inmunosupresores anticalcineurínicos (ICN), que veremos en detalle más adelante.

#### 1.1.3.2. *Disfunción crónica del injerto*

También llamada *Nefropatía crónica del injerto (NCI)*, *Rechazo crónico* o *Glomerulopatía del trasplante*. Caracterizada clínicamente por hipertensión arterial, proteinuria y deterioro progresivo de la función renal por lesiones mantenidas en el tiempo causadas por múltiples factores, tanto inmunológicos como no inmunológicos (González-Molina 2005).

## 1.2. INMUNOSUPRESORES ANTICALCINEURÍNICOS

La inmunosupresión es necesaria para evitar el rechazo, especialmente durante el postrasplante inicial donde la incidencia de rechazo agudo es mayor.

Los dos inhibidores de la calcineurina utilizados en la serie de pacientes que nos ocupa, tacrolimus (conocido inicialmente como FK-506) y CsA, han desempeñado un papel fundamental en la mayoría de los protocolos inmunosupresores (Masuda y Inui 2006). Tras la introducción de la CsA en la década de 1980 para el tratamiento de pacientes trasplantados renales y hepáticos, la supervivencia del injerto mejoró notablemente de alrededor del 60% a más del 80% en comparación con los protocolos con azatioprina o esteroides (Starzl y cols. 1982; Gordon y cols. 1986; Otte 2002). Su gran efectividad está, sin embargo, limitada por su inherente nefrotoxicidad. Posteriormente, a mediados de la década de 1990, se desarrolló como alternativa a la CsA el tacrolimus, más seguro y eficaz (McMaster 1994; McDiarmid y cols. 1995; Busuttill y Holt 1997). Con este fármaco disminuyó la incidencia de RA al año, y aumentó la supervivencia tanto del paciente como del injerto (Pirsch y cols. 1997).

Con estas cifras de eficacia, los protocolos actuales suelen ir orientados a disminuir los efectos secundarios de estos fármacos. Como no se dispone aún de un fármaco ideal, la norma asistencial actual para la mayoría de los receptores de trasplantes de todo el mundo consiste en iniciar un régimen multifarmacológico o inmunización primaria cuyo objetivo es prevenir el RA. La pauta más utilizada en Europa es la triple terapia que consta de altas dosis de: corticoides, ICN (CsA o tacrolimus), y un fármaco anti-proliferativo [Azatioprina, Micofenolato-mofetil (MMF) o Rapamicina]. Cuando el paciente es de alto riesgo inmunológico o su injerto proviene de un donante subóptimo, se puede inducir previamente la inmunosupresión con el uso de anticuerpos mono- o policlonales.

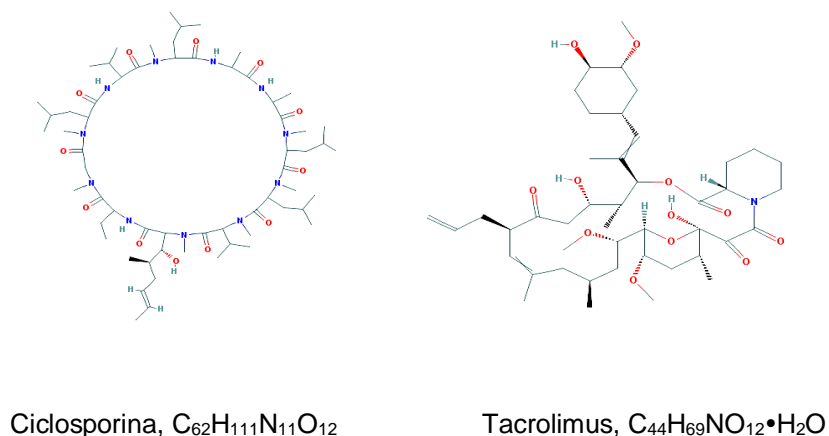
A la inmunización primaria le sigue la *terapia de mantenimiento*, cuyos objetivos son conseguir el buen funcionamiento del injerto a largo plazo con la máxima

supervivencia y calidad de vida del receptor. Los problemas que se afrontan en esta fase serán el RA, la nefropatía crónica del injerto, la morbi-mortalidad cardiovascular y el desarrollo de infecciones y tumores. Se realiza una individualización del tratamiento en función de las características clínicas, demográficas e inmunológicas del donante y receptor. En general hay que intentar ir reduciendo o suprimiendo progresivamente los inmunosupresores (Knoll 2008).

La monitorización de las drogas terapéuticas, conocida como TDM (del inglés “*therapeutic drug monitoring*”) ha contribuido a reducir la toxicidad de estos medicamentos y el rechazo celular agudo evolucionando a la *terapia orientada a la concentración* en lugar de la *terapia orientada a la dosis* (Masuda y Inui 2006).

### 1.2.1. Mecanismo de acción de los ICN

Aunque las estructuras químicas de la CsA y el tacrolimus difieren significativamente (Figura 1) ambos comparten el mismo mecanismo de acción.

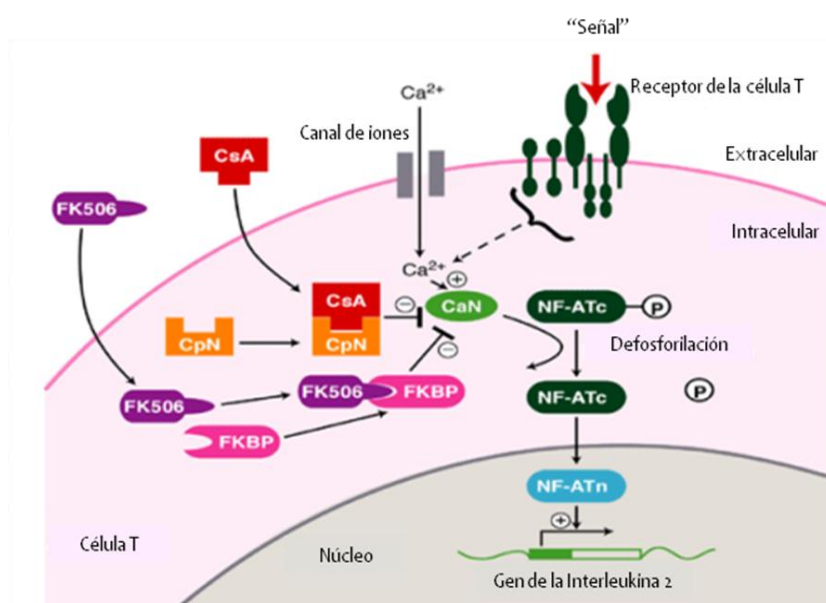


**Figura 1.** Estructura molecular de Ciclosporina y Tacrolimus

Los dos actúan principalmente sobre la enzima calcineurina, una fosfatasa dependiente de la calcio-calmodulina, inhibiendo así la activación y proliferación de los linfocitos T, responsables del rechazo del aloinjerto. Para ejercer su acción deben unirse



previamente a inmunofilinas intracelulares, la ciclofilina en el caso de la CsA y FKBP12 (FKBP1A, proteína 12 de unión al tacrolimus – FK506) para el tacrolimus (Wiederrecht y cols. 1993; Masuda y Inui 2006; Staatz y cols. 2010). Estas proteínas inducen un cambio conformacional de los inmunosupresores, favoreciendo así la unión de estos con la calcineurina. Como consecuencia se bloquea la desfosforilación del factor nuclear de las células T (NF-AT) y su traslocación al núcleo celular del linfocito T. Con esto disminuye la expresión de los genes de las citoquinas, principalmente la interleucina (IL)-2, que es un factor de proliferación y diferenciación de linfocitos T, pero también de IL-3, IL-4, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Todo ello en conjunto lleva a una inhibición de la respuesta inmune e inflamatoria de los linfocitos B y T (Allison 2000; Kapturczak y cols. 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de ciclosporina y tacrolimus. CsA, Ciclosporina; FK506, Tacrolimus; CpN, ciclofilina; FKBP, proteína de unión al tacrolimus; CaN, calcineurina; NF-ATc, componente citoplasmático del factor nuclear de las células T activadas; NF-ATn, componente nuclear del factor nuclear de las células T activadas. Modificado de (Stepkowski 2000).

### 1.2.2. Efectos farmacológicos y adversos

El tacrolimus posee mayor potencia inmunosupresora que la CsA pues exhibe efectos similares pero a una concentración 100 veces menor (Kino y cols. 1987). A pesar de ello, ambos muestran excelentes porcentajes de supervivencia del injerto. (Maes y Vanrenterghem 2004). Sin embargo, el tacrolimus está asociado con una menor incidencia de RA tras el primer año (12-20% vs. 40% con la CsA) (Mayer y cols. 1997; Kramer y cols. 2005; Silva y cols. 2007).

Ambos tienen similares efectos adversos, la mayoría dosis dependientes. En general, la CsA tiene mayor efecto nefrotóxico que el tacrolimus y un perfil tóxico extrarrenal diferente en la frecuencia de dichos efectos. Por ejemplo, el tacrolimus se ha asociado con más diabetes y reacciones neurotóxicas, aunque con menos hipertensión, dislipidemia, hirsutismo e hiperplasia gingival (HG) que la CsA (Danovitch 2009).

Las principales reacciones adversas del tratamiento con CsA y tacrolimus se resumen en la Tabla 4.

<b>Renales</b>	Nefrotoxicidad aguda y crónica, hipertensión, síndrome hemolítico urémico, hiperpotasemia <sup>‡</sup> , hipomagnesemia <sup>‡</sup> , acidosis metabólica.
<b>Digestivas</b>	Hepatotoxicidad, colestasis, ictericia, pancreatitis, colelitiasis, diarrea <sup>‡</sup> , vómitos <sup>‡</sup> , náuseas, dispepsias <sup>‡</sup> , estreñimiento <sup>°</sup>
<b>Neurológicas<sup>‡</sup></b>	Temblor <sup>‡</sup> , parestesias, convulsiones, mareos, cefaleas, encefalopatías, disartria
<b>Metabólicas</b>	Hiperglucemia <sup>‡</sup> y diabetes <sup>‡</sup> , hiperuricemia <sup>*</sup> y gota <sup>*</sup> , hipercolesterolemia <sup>*</sup> , osteoporosis
<b>Dermatológicas<sup>°</sup></b>	Hipertricosis, hirsutismo, hiperplasia gingival
<b>Neoplasias</b>	Linfomas, carcinomas, sarcoma de Kaposi
<b>Infecciones</b>	Víricas (CMV, BK, JC), bacterianas, fúngicas, parasitarias
<b>Hematológicas</b>	Trombocitopenia
<b>Musculoesqueléticas</b>	Artralgias, distrofia refleja, rabdomiolisis

\* Más frecuente con CsA. <sup>‡</sup> Más frecuente con tacrolimus. <sup>°</sup> No efecto o escaso con tacrolimus.

**Tabla 4.** Efectos adversos de CsA y tacrolimus [modificado de (Webster y cols. 2005; Cruzado y cols. 2008)].

### 1.2.2.1. Nefrotoxicidad Aguda

En el campo del trasplante renal, el efecto adverso más relevante de estos fármacos es su nefrotoxicidad (Giessing y cols. 2007; Jevnikar y Mannon 2008). De hecho, su uso a largo plazo, y especialmente en altas dosis, es una causa importante de disfunción crónica del injerto.

La nefrotoxicidad por ICN se asocia con niveles de inmunosupresores elevados y es frecuente durante las primeras semanas del trasplante. Los ICN afectan fundamentalmente a los vasos y túbulos renales, ocasionando disfunción endotelial, con disminución en la producción de sustancias vasodilatadoras y aumento de factores vasoconstrictores. Esto provoca vasoconstricción de la arteriola renal aferente y disminución del flujo renal y del filtrado glomerular. En algunas ocasiones, la isquemia relativa asociada a esta vasoconstricción puede incluso ocasionar lesiones estructurales (Mihatsch y cols. 1986; Kim y Suh 1995) (Tabla 5).

Alteraciones funcionales		Alteraciones estructurales <sup>1</sup>	
Disfunción tubular	Disfunción vascular	Tubulopatía	Vasculopatía
↓ reabsorción Mg <sup>2+</sup>	↑ vasoconstricción	vacuolas isométricas	lesión endotelial
↓ secreción K <sup>+</sup>	↓ perfusión renal	mitocondrias gigantes	lesión músculo liso
↓ excreción de ácido úrico	↓ tasa de filtración	necrosis células aisladas	oclusión arteriolar
		microcalcificaciones	obliteración vasos
hipomagnesemia			esclerosis glomerular
hiperkalemia	↑ creatinina		isquemia localizada
hiperuricemia	↑ urea		atrofia muscular
			fibrosis intersticial

<sup>1</sup> Las lesiones histológicas no son específicas de toxicidad por anticalcineurínicos

**Tabla 5.** Principales consecuencias fisiológicas de la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos (adaptado de (Bernabeu 1990)).

Tanto los cambios funcionales en el sistema tubular y vascular como las tubulopatías son generalmente reversibles tras disminuir la dosis de ICN (Tabla 5).

Aún no se han encontrado los criterios de diagnóstico específicos que diferencien de forma fiable la nefrotoxicidad por ICN del rechazo renal; a menudo ni siquiera una biopsia es concluyente. Para complicar más la situación, hasta el 20% de los pacientes pueden presentar nefrotoxicidad y rechazo de forma simultánea. Una aproximación a un diagnóstico diferencial se expone en la Tabla 6.

#### *1.2.2.2. Nefrotoxicidad crónica*

La nefrotoxicidad crónica es más importante que la aguda y se debe a la exposición continuada de los efectos nefrotóxicos del fármaco. Se manifiesta por disminución progresiva e irreversible de la función renal, asociada a hipertensión y caracterizada por lesiones irreversibles en la arquitectura renal (Randhawa y cols. 1993; Mihatsch y cols. 1998; Morozumi y cols. 2004). Esas lesiones son debidas al mantenimiento de la vasoconstricción, isquemia, sobre-expresión de factor TGF- $\beta$

En la nefrotoxicidad crónica por ICN intervienen una combinación de cambios hemodinámicos inducidos por el fármaco con efectos tóxicos directos en células epiteliales tubulares (puede verse un resumen en la Tabla 5).

#### *1.2.2.3. Neurotoxicidad*

La neurotoxicidad asociada con ICN es un efecto adverso menos frecuente que la nefrotoxicidad, con una incidencia de aproximadamente el 5% en trasplantados renales (Wijdicks 2001). Sin embargo, puede dar lugar a complicaciones graves en algunos pacientes.

El espectro de los trastornos neurológicos causados por los ICN va desde síntomas leves (temblor, dolor de cabeza, insomnio, alteración del estado mental, parestesia, etc.) (Eidelman y cols. 1991; Pirsch y cols. 1997; Bechstein 2000) , hasta cambios severos que pueden ser incluso fatales (convulsiones, encefalopatía, alteración

del nivel de la conciencia, parálisis y coma) (Eidelman y cols. 1991; Bechstein 2000; Singh y cols. 2000).

	Nefrotoxicidad por ICN	Rechazo
Relativas al donante	- Uso concomitante de fármacos nefrotóxicos	- Incompatibilidad HLA o ABO - Hipersensibilizado - Retrasplante
Datos clínicos postrasplante	- NTA - Frecuentemente después de la sexta semanas postrasplante - Diuresis y peso estables	- Superimpuesto en la NTA - Asintomático o con fiebre/dolor y aumento de tamaño del injerto - Frecuentemente en el primer mes - Aumento de peso y disminución de la diuresis
Datos de laboratorio	- EFNA* < 1% en plena NTA o antes de la recuperación de la función renal - Niveles elevados de ICN - Aumento gradual y moderado de Cr < 25% de la Cr basal	- EFNA* > 1% cuando superimpuesto en la NTA o antes de la recuperación de la función renal - niveles bajos de ICN o en intervalo terapéutico - Rápido aumento de la Cr > 25% de la basal
Datos histológicos	- Atrofia tubular, vacuolización isométrica, calcificaciones aisladas, - Mínimo edema - Mínimos infiltrados focales - Fibrosis difusa intersticial, a menudo en forma parcheada - Arteriopatía	- Tubulitis con cilindros hemáticos y leucocitarios, alguna vacuolización irregular Edema intersticial y hemorragias - Infiltrados intersticiales difusos de moderados a graves - Glomerulonefritis (células mononucleares) - Endovasculitis - Depósitos Cd4
Citología aspirativa**	- Depósitos de CsA en las células tubulares y endoteliales. - Vacuolización isométrica de las células tubulares	- Infiltrado inflamatorio con linfocitos mononucleares, macrófagos, células linfoblastoides y linfocitos T activados
Ultrasonografía	Normal	Aumento del tamaño del injerto, pérdida de la diferenciación corticomedular y pirámides prominentes
Tratamiento	Mejoría de la función renal al disminuir la dosis de ICN o al suspender el tratamiento	Choques de esteroides, anticuerpos monoclonales, globulinas anti-timocito, Inmunoglobulinas o Bortezomib

\* En los enfermos con tacrolimus el efecto es menos evidente. \*\* En enfermos con CsA.

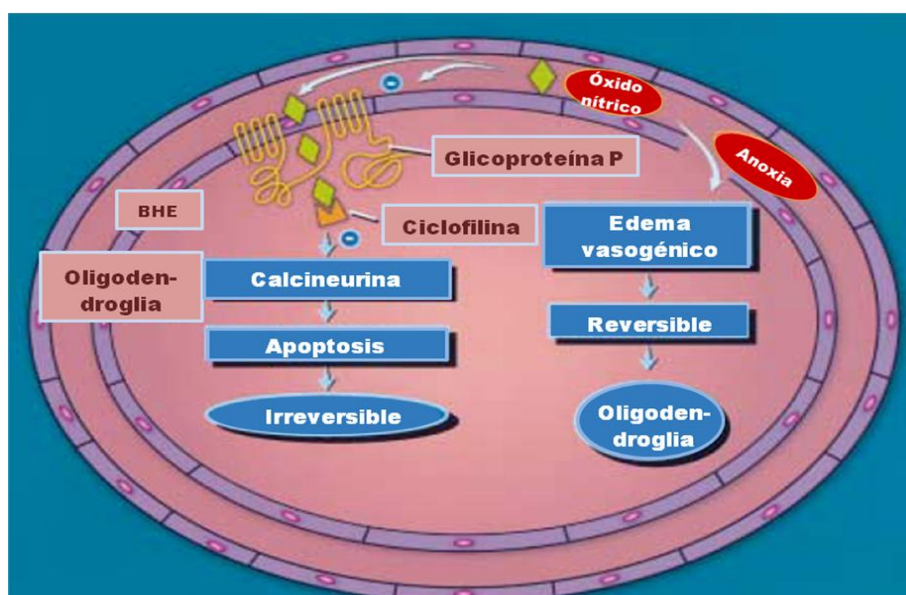
NTA, Necrosis tubular aguda. EFNA, Excreción fraccional de sodio. ICN, inmunosupresores anticalcineurínicos

**Tabla 6.** Diagnóstico diferencial entre nefrotoxicidad por ICN y rechazo. Modificado de (Morales y Andrés 2008).

Estos síntomas se han descrito más en los pacientes tratados con tacrolimus que en los tratados con CsA, siendo el más frecuente el temblor que responde bien a la

disminución de la dosis (Mueller y cols. 1994; Pirsch y cols. 1997). Todos estos síntomas clínicos están comúnmente asociados con los niveles de ICN, con un pico de incidencia en el período postoperatorio temprano con la exposición inicial al fármaco y un aumento progresivo de la incidencia en el tiempo con la exposición acumulativa. En estos casos, los síntomas revierten al disminuir o retirar el inmunosupresor. De todas maneras, posiblemente existen otros factores aparte de los farmacocinéticos que pueden contribuir a la neurotoxicidad.

Debido a la similitud en los efectos neurotóxicos de los ICN, es probable que éstos se produzcan por medio de un mecanismo común; a través de la inhibición de la calcineurina que se encuentra en abundancia en el sistema nervioso central y periférico (Lyson y cols. 1993; Dawson y cols. 1994) o por cambios en el transporte del ICN a través de la barrera hematoencefálica (BHE) (Wijdicks 2001). La Figura 3 muestra un resumen de estos y otros posibles mecanismos.



**Figura 3.** Mecanismos propuestos para la neurotoxicidad de ICN. Alteraciones en la barrera hematoencefálica (BHE) pueden conducir a edema vasogénico pero una exposición prolongada puede desencadenar la apoptosis. El óxido nítrico y la posible lesión anóxica pueden facilitar la entrada a través de la BHE. Adaptado de (Wijdicks 2001).

#### 1.2.2.4 Hiperplasia gingival

La hiperplasia gingival (HG) severa es uno de los efectos adversos más frecuentes en los pacientes con trasplante renal asociado, especialmente en tratamientos con CsA, con una incidencia que oscila ampliamente entre el 7% y el 70% (Seymour y cols. 1996).

La HG se manifiesta tras 3 meses o más de tratamiento (Wysocki y cols. 1983; Seymour y cols. 1987) en forma de un aumento exagerado del volumen del tejido conectivo y epitelial de las encías con componentes fibrosos. Puede interferir con las funciones orales normales y también puede causar problemas estéticos, dificultad en la erupción de dientes, hemorragia gingival, dificultad para hablar y dificultad en mantener una óptima higiene bucal (Hassell y Hefti 1991).

La CsA es capaz de alterar el metabolismo de los fibroblastos gingivales humanos y los componentes extracelulares de la lámina propia y favorece la síntesis de colágeno y de glicosaminoglicanos (componentes de la matriz extracelular) (Williamson y cols. 1994; Myrillas y cols. 1999). Esto se traduciría en una mayor cantidad evidente de sustancia esencial y podría explicar el aumento de volumen de tejido conectivo (Ciavarella y cols. 2007).

La patogénesis de la HG asociada a CsA es probablemente multifactorial y aún incierta pero no parece que las concentraciones plasmáticas de fármaco estén relacionadas (Hassell y Hefti 1991; Montebugnoli y cols. 2000). La clínica suele mejorar al reducir la dosis de CsA o cambiar el tratamiento a tacrolimus, sirolimus o azatioprina.

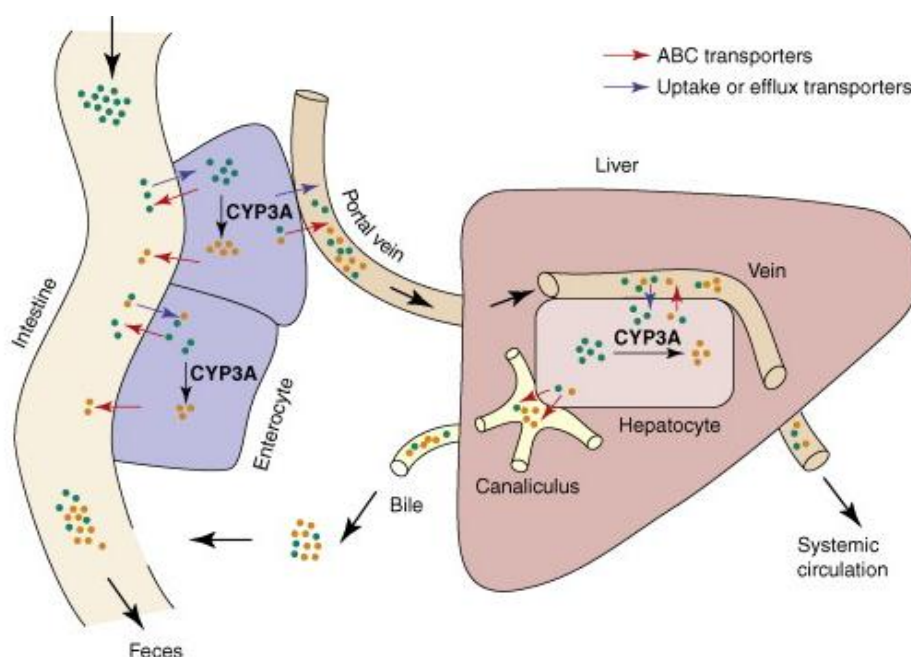
### 1.2.3. Farmacocinética

#### 1.2.3.1. Absorción

Los ICN son fármacos lipófilos, con escasa solubilidad en agua. Su administración puede ser por vía intravenosa u oral. La absorción por vía oral en el

tracto gastrointestinal es incompleta y muy variable; con una biodisponibilidad en torno al 30% y 25% para la CsA y el tacrolimus respectivamente, aunque con un rango muy amplio de variabilidad (5-89%) (Ptachcinski y cols. 1986; Venkataramanan y cols. 1995).

Hoy día se sabe que la glicoproteína P (P-gp, codificada por el gen *ABCB1*) y las isoenzimas del citocromo P450 3A4 y 5 (CYP3A4/5) de localización intestinal juegan un papel importante en la variabilidad farmacocinética de estos fármacos (Hebert 1997; Lown y cols. 1997; Kaplan y cols. 1999; Fromm 2000; Lin y Yamazaki 2003). Debido a la coincidencia de localización y de sustratos, la P-gp intestinal (un transportador que expulsa xenobióticos a la luz del tubo digestivo) y CYP3A4/5 (que metabolizan los ICN localmente en los enterocitos) actúan conjuntamente como una barrera para la absorción oral de tacrolimus y CsA (Watkins 1997; Zhang y Benet 2001; Kivisto y cols. 2004). La Figura 4 muestra un esquema de este sistema protector.



**Figura 4.** Combinación de las funciones del CYP3A y la familia de transportadores ABC (de los que la P-gp es uno de sus miembros principales) para reducir la absorción sistémica de xenobióticos. Adaptado de (van Herwaarden y cols. 2009).



### 1.2.3.2. Distribución

La CsA se distribuye rápida y ampliamente unida a células sanguíneas en fluidos corporales, órganos vascularizados y tejidos, sobre todo, el adiposo donde se acumula (Formea y Karlix 2011). Por su parte, el tacrolimus también se encuentra unido mayoritariamente a hematíes (Jusko 1995). Ambos fármacos atraviesan la placenta y se detectan en la leche materna (Flechner y cols. 1985; Nyberg y cols. 1998; Hebert y cols. 2013).

Como en el intestino, la P-gp puede facilitar o limitar el acceso de los ICN a otros órganos y compartimientos corporales, tales como la BHE, testículos, placenta, el corazón, el hígado y los riñones (Fromm 2003; Christians y cols. 2006).

### 1.2.3.3. Metabolismo y eliminación

Tanto tacrolimus como CsA se metabolizan por CYP3A4 y CYP3A5 (mencionados a menudo de forma combinada como CYP3A4/5 (Karanam y cols. 1994; Li y cols. 1995). Ambas enzimas metabolizan CsA y tacrolimus a más de 20 metabolitos (Fahr 1993; Iwasaki y cols. 1993; Iwasaki y cols. 1995; Noble y Markham 1995) que se eliminan en más de un 95% por la vía biliar (Moller y cols. 1999). Menos del 5% de la dosis administrada se excreta por la orina de la cual sólo el 0,1% lo hace como fármaco inalterado (Maurer y Lemaire 1986; Venkataramanan y cols. 1995).

Tanto CYP3A4 como CYP3A5 se expresan en riñón, donde debe existir, por tanto, un metabolismo local de estos fármacos (Haehner y cols. 1996). A este respecto, todos los metabolitos de la CsA y el tacrolimus identificados hasta la fecha tienen una menor actividad inmunosupresora que los fármacos originales (aproximadamente <10%) y aunque se ha publicado que producen mayor nefrotoxicidad (Copeland y cols. 1990; Sattler y cols. 1992) se necesitan más estudios al respecto.

El CYP3A4 parece jugar un papel más dominante que CYP3A5 en el metabolismo de la CsA (Dai y cols. 2004), mientras que CYP3A5 parece el principal responsable de la biotransformación de tacrolimus (Kamdem y cols. 2005; Dai y cols. 2006).

#### **1.2.4. Interacciones farmacológicas**

El tacrolimus y la CsA, como sustratos de las enzimas CYP3A y del transportador P-gp pueden interactuar con numerosos fármacos usados en la clínica del trasplante que son inductores o inhibidores de estas proteínas (Christians y cols. 2002). Medicamentos como la rifampicina, fenitoína, fenobarbital y carbamazepina pueden inducir el metabolismo de CYP3A4/5 y/o el transporte mediado por P-gp, causando disminución de las concentraciones de ICN a niveles subterapéuticos (Schuetz y cols. 1996), y por tanto, aumentando el riesgo de rechazo del injerto. Por el contrario, eritromicina, ketoconazol, los bloqueadores de los canales de calcio, y las hormonas sexuales pueden inhibir a CYP3A4/5 y/o a la P-gp, aumentando las concentraciones de ICN hasta niveles tóxicos (Baciewicz y Baciewicz 1989; Siegsmund y cols. 1994). Además, la toxicidad renal se potencia al asociar otros fármacos nefrotóxicos, por ejemplo aminoglucósidos, anfotericina B o trimetoprim. No deben administrarse conjuntamente la CsA y el tacrolimus por riesgo añadido para la infección y la nefro- y neurotoxicidad.

Los ICN también pueden influir en los niveles plasmáticos de otros fármacos, por ejemplo, la exposición al MMF, otro fármaco usado en la terapia inmunosupresora del trasplante, es mayor cuando se coadministra con tacrolimus que con CsA (Hubner y cols. 1999), ya que ésta interrumpe la recirculación enterohepática del MMF mientras que el tacrolimus no, incrementando así el riesgo de toxicidad del MMF (van Gelder y cols. 2001).

Se conocen 788 medicamentos y productos naturales que interfieren con la CsA (Drugs.com 2015a) y 850 con el tacrolimus (Drugs.com 2015b). Los más importantes se muestran en la Tabla 7.

<b>Disminuyen la concentración de los ICN (riesgo fallo terapéutico)</b>	<b>Antibióticos</b>	Rifampicina, Rifabutina, Nafcilina
	<b>Anticonvulsivos</b>	Fenitoína, Carbamazepina, Oxcarbazepina, Fenobarbital
	<b>Otras sustancias</b>	Hierba de San Juan, Efavirenz, Octreotide, Ticlopidina, Bosentan, Orlistat, Sulfipirazona, Terbinafina
<b>Aumentan la concentración de los ICN (toxicidad)</b>	<b>Bloqueadores de los canales de calcio</b>	Diltiazem, Verapamilo, Nicardipina, Nifedipina
	<b>Antifúngicos</b> (Azoles)	Ketoconazol, Itraconazol, Fluconazol, Clotrimazol
	<b>Antibióticos</b>	Eritromicina, Claritromicina, Azitromicina, Cloranfenicol, Estreptograminas, Metronidazol
	<b>Antidepresivos</b>	Nefazodona, Fluvoxamina
	<b>Agentes gastrointestinales</b>	Omeprazol, Cimetidina
<b>Potencian la nefrotoxicidad</b>	<b>Otras sustancias</b>	Progestágenos, estrógenos, Inhibidores de la proteasa, Metilprednisolona, Alopurinol, Amiodarona, Bromocriptina, Colchicina, Danazol, Imatinib, Teofilina, Tacrolimus/CsA, Zumo de pomelo
	<b>Antibióticos</b>	Aminoglicósidos, Ciprofloxacino, Gentamicina, Tobramicina, Vancomicina, Trimetoprim-sulfametoxazol
	<b>Antineoplásicos</b>	Melfalán
	<b>Antifúngicos</b>	Anfotericina B, Ketoconazol
	<b>Antiinflamatorios</b>	Azapropazona, Colchicina, Diclofenaco
	<b>Agentes gastrointestinales</b>	Ranitidina, Cimetidina
<b>Otras sustancias</b>	Tacrolimus/CsA, Derivados del ácido fólico (ej., bezafibrato, fenofibrato, metotrexato), Aciclovir	

**Tabla 7.** Interacciones medicamentosas con los inmunosupresores anticalcineurínicos.

### 1.2.5. Monitorización de niveles plasmáticos

El estrecho margen terapéutico de tacrolimus y CsA, su gran variabilidad intra- e interindividual tanto de la farmacocinética como de la farmacodinamia, y las interacciones medicamentosas, hacen necesario una estrecha monitorización de sus concentraciones para ajustar las dosis hasta alcanzar una concentración óptima.

El TDM de los ICN se realiza de forma rutinaria, con la dosis del fármaco ajustado de acuerdo con las concentraciones de drogas en sangre total y la respuesta clínica del paciente (Staatz y cols. 2010). El mejor parámetro para monitorizar estos fármacos es el área bajo la curva (AUC, en inglés "*area under the curve*") de concentraciones sanguíneas a lo largo del tiempo, puesto que representa la exposición total al fármaco y se relaciona con la evolución de los pacientes, tanto en la prevención del rechazo como en la aparición de efectos adversos. (Lindholm y Kahan 1993; Schroeder y cols. 1994; Mahalati y cols. 1999; Undre y cols. 1999; Kuypers y cols. 2004b). Sin embargo, al ser el cálculo del AUC poco factible en la práctica clínica diaria, se recurre a estrategias que requieran menos números de extracciones sanguíneas. La mayoría de los centros utilizan las concentraciones valle o predosis ( $C_0$ ) para estimar la exposición sistémica total al fármaco. Las concentraciones  $C_0$  de tacrolimus se consideran en general que son una buena indicación de la exposición total del fármaco sistémico (Ihara y cols. 1995; Jusko 1995; Staatz y cols. 2001; Jorgensen y cols. 2002), aunque no faltan opiniones contrarias (Winkler y cols. 1991; Jusko 1995; Kershner y Fitzsimmons 1996; Bottiger y cols. 1999; Mahalati y cols. 2001; Staatz y cols. 2001). Sin embargo, la  $C_0$  de la CsA presenta una pobre correlación tanto con la exposición al fármaco como con su eficacia en prevenir el rechazo o los efectos adversos (Mahalati y cols. 1999). La monitorización utilizando otros puntos de muestreo como la medida de la concentración a las 2 horas ( $C_2$ ) o a las 4 horas ( $C_4$ ) mostró mejores correlaciones con el  $AUC_{0-12}$  que los puntos aislados tanto para la CsA (Cantarovich y cols. 1998; David-Neto y cols. 2000; Levy 2001; Keown 2002; Pescovitz y Barbeito 2002; Jaksch y cols.

2005) como para el tacrolimus (Jorgensen y cols. 2002; Balbontin y cols. 2003). Las mejores estimaciones del  $AUC_{0-12}$  se obtuvieron con estrategias que consistían en dos (por ejemplo  $C_2$  y  $C_4$ ) o tres puntos (por ejemplo  $C_0$ ,  $C_2$  y  $C_4$ ) de muestreo dentro de un intervalo de 4 h después de la dosis (Wong y cols. 2000; Mahalati y cols. 2001; Armendariz y cols. 2005; Scholten y cols. 2005; Mathew y cols. 2008).

A pesar de todo esto, las concentraciones  $C_0$  o  $C_2$  siguen siendo las más utilizadas en la práctica diaria por su simplicidad de obtención. En la tabla 8 se especifican las dosis recomendadas y los rangos terapéuticos de CsA y tacrolimus.

La monitorización debe ser más frecuente en las primeras semanas postrasplante (3 a 7 veces por semana), y posteriormente se va espaciando el tiempo de monitoreo, sobre todo, a partir del tercer mes que es cuando las concentraciones sanguíneas suelen alcanzar los niveles diana (Scholten y cols. 2005). Circunstancias especiales, tales como los cambios en la función hepática, la presencia de infecciones y diarreas o el uso de fármacos que pueden alterar la cinética de los ICN pueden justificar un monitoreo más frecuente (Press y cols. 2010).

Inmunosupresor		Dosis inicial recomendada*	Niveles diana iniciales	Niveles de mantenimiento
Ciclosporina	Sandimmun®	10-14 mg/Kg/d, en 2 tomas		
	Neoral®	6-12 mg/Kg/d, en 2 tomas	150-250 ng/mL	75-150 ng/mL
	Intravenosa	3 mg/Kg/d		
Tacrolimus	Prograf® en combinación con azatioprina	0,2 mg/Kg/d, en 2 tomas	7-20 ng/mL	5-15 ng/mL
	Prograf® en combinación con MMF/antagonista del receptor de IL-2	0,1 mg/Kg/d, en 2 tomas	4-11 ng/mL	4-11 ng/mL
	Advagraf®	0,2-0,3 mg/Kg/d en 1 toma	10-20 ng/mL	5-15 ng/mL

\* Debe iniciarse el tratamiento de 4-12 h previas al trasplante

**Tabla 8.** Modos de empleo de la inmunosupresión en adultos trasplantados renales.

Aunque el TDM es, sin duda, una herramienta útil para la adaptación de la terapia inmunosupresora, tiene algunas limitaciones. Primero, sólo puede realizarse después de administrarse el fármaco tras un trasplante y no es útil para determinar la dosis óptima de partida del ICN. Segundo, el alcanzar el rango diana recomendado no garantiza la ausencia de toxicidad de los medicamentos o la eficacia inmunosupresora total, porque cada individuo trasplantado responde de manera diferente a similares medidas de concentraciones de inmunosupresores. Tercero, el TDM se ve obstaculizado por el hecho de que la estrategia óptima de monitorización de fármacos (coste-efectividad, factibilidad, relevancia clínica) aún tiene que ser determinada (Kuypers 2005). Por último, no puede influir en la exposición al fármaco durante los primeros 2 o 3 días después del trasplante, dentro del crítico período del postrasplante temprano (Undre y cols. 1999; Clase y cols. 2002).

Por lo tanto, para optimizar aún más la terapia con ICN; es necesario conocer las fuentes de la variabilidad en la exposición de ICN, sobre todo, en la fase de absorción. Se ha demostrado que la variabilidad observada en la PK de los ICN se origina a partir de factores biológicos y relacionados con el estilo de vida incluyendo, función renal y hepática, presencia de Hepatitis C, diarrea, el tiempo transcurrido tras el trasplante o el tiempo de isquemia fría, la edad, el tamaño corporal, el género, la ingesta de alimentos, la concentración de albúmina sérica, hematocrito, lipoproteínas (HDL, LDL), y la coadministración de medicamentos que interactúan (McMillan 1989; Hebert y cols. 1992; Ducharme y cols. 1995; Akhlaghi y Trull 2002; Anglicheau y cols. 2003a; Kuypers y cols. 2004a; Zahir y cols. 2004; Liu y cols. 2009; Seymen y cols. 2009). Sin embargo, aun cuando estos factores son tenidos en cuenta, una parte considerable de la variabilidad sigue sin explicarse. El intenso metabolismo presistémico de los ICN por las isoenzimas CYP3A, y la eliminación activa del fármaco absorbido por la P-gp a nivel intestinal parecen contribuir significativamente a esta gran variabilidad en la biodisponibilidad oral de estos fármacos (Zhang y Benet 2001). La expresión del CYP3A4 varía mucho entre

individuos, con más de 30 formas distintas de expresión en el intestino delgado (Wacher y cols. 1998). Además varía a lo largo del intestino siendo la parte superior del intestino su principal sitio de acción (Paine y cols. 1997). La P-gp también muestra gran variabilidad interindividual en su expresión, de 2 a 8 formas en el intestino delgado (Lown y cols. 1997). Por lo tanto, es más que probable que el estudio de los genes que codifican para estas proteínas pueda ayudarnos a mejorar el TDM para los ICN en el trasplante renal.

### **1.3. POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN CYP3A Y ABCB1**

La contribución genética puede explicar del 20 al 95% de la variabilidad en la disposición de los fármacos y sus efectos (Evans y McLeod 2003). A este respecto, la farmacogenética estudia los efectos de los genes en la respuesta de un fármaco y puede ser usada como estrategia complementaria a la TDM al predecir la dosis inicial óptima del fármaco con el objetivo de conseguir concentraciones sanguíneas dianas de forma rápida identificando a aquellos pacientes con un mayor riesgo para los efectos secundarios y la adaptación de la terapia de mantenimiento.

#### **1.3.1. Polimorfismos genéticos en CYP3A4**

En el *CYP3A4*, codificada en la banda citogenética 7q22.1 del cromosoma 7 (Figura 5), se han identificados hasta la fecha 26 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs, del inglés “*single nucleotide polymorphisms*”) (Sim 2014). Algunos de estos SNPs se asocian a la variabilidad entre pacientes en la capacidad metabólica del *CYP3A4*. El SNP del *CYP3A4* más estudiado implica una transición de Adenina a Guanina en la posición -392 en la región promotora del gen *CYP3A4* (*CYP3A4*-392A>G, *CYP3A4\*1B* o rs2740574) (Rebeck y cols. 1998; Westlind y cols. 1999). La frecuencia del SNP varía dependiendo del origen étnico. El alelo variante *CYP3A4\*1B* está

presente aproximadamente en 2-9,6% de los caucásicos, del 35 al 67% de los africanos, 9-11% de los hispanos y no se presenta en asiáticos (Ball y cols. 1999). No está claro si *CYP3A4\*1B* afecta el metabolismo de sustratos del CYP3A4, aunque *in vitro* se ha observado que aumenta la transcripción de CYP3A4 (Sata y cols. 2000). Los estudios *in vivo*, sin embargo, no han logrado corroborar estos resultados (Ball y cols. 1999; Staatz y cols. 2010).

### 1.3.2. Polimorfismos genéticos en *CYP3A5*

En el *CYP3A5*, también localizado en la banda cromosómica 7q22.1 (Figura 5), se han identificados hasta la fecha 11 SNPs (Sim 2013). El SNP del *CYP3A5* más estudiado implica una transición de Adenina a Guanina en la posición 6986 en el intrón 3 del gen *CYP3A5* (*CYP3A5* A6986G, *CYP3A5\*3* o rs776746). Este SNP es inusual pues el alelo wild type (*CYP3A5\*1*), es decir, que no presenta la mutación, se observa en la población a una frecuencia mucho más baja que el alelo variante (*CYP3A5\*3*). Los portadores del alelo *CYP3A5\*1* expresan altos niveles de proteína CYP3A5 funcional, mientras que los homocigotos para el alelo mutante *CYP3A5\*3* no la producen debido a un defecto en el proceso de *splicing* (Hustert y cols. 2001; Kuehl y cols. 2001). Por tanto, los individuos que portan *CYP3A5\*1* deberían mostrar mayor aclaramiento de fármacos inactivados por CYP3A5 y, teóricamente, deberían ser más propensos a experimentar una falta de eficacia de una dosis estándar. Como en el caso del *CYP3A4\*1B*, la frecuencia del *CYP3A5\*3* es altamente dependiente del origen étnico. *CYP3A5\*1* está presente, por ejemplo, en aproximadamente el 5-15% de los caucásicos, del 45 al 73% de los afroamericanos, el 15-35% de los asiáticos o el 25% de los mexicanos (Lamba y cols. 2002).

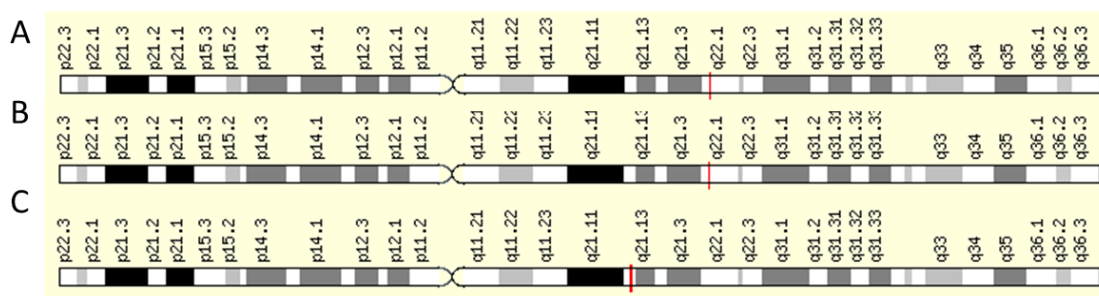


### 1.3.3. Polimorfismos genéticos en *ABCB1*

La P-gp está codificada por el gen de resistencia a múltiples fármacos, también conocido como el gen *ABCB1* (o *MDR1*) localizado en el cromosoma 7q21.1 (Figura 5), donde ocupa 210,39 kb y está compuesto de 29 exones (Vasiliou y cols. 2009). El *ABCB1* también tiene expresión polimórfica, con al menos 50 SNPs identificados hasta la fecha (Kimchi-Sarfaty y cols. 2007). Algunos de estos SNPs se han asociado con la variabilidad entre pacientes en la capacidad de transporte de la P-gp. Los SNPs del *ABCB1* más comunes y ampliamente estudiados son una transición de C>T en la posición 3435 del exón 26 (rs1045642), C>T en la posición 1236 del exón 12 (rs1128503) y G>T/A en la posición 2677 del exón 21 (rs2032582) (Kroetz y cols. 2003). En adelante nos referiremos a estos SNPs como *ABCB1* 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A, respectivamente. *ABCB1* 2677G>T/A es un SNP no sinónimo, que se traduce en un cambio de aminoácido (Ala893Ser/Thr), mientras que *ABCB1* 3435C>T y 1236C>T son sinónimos (no hay cambio de aminoácido). Aunque no existe cambio de aminoácido, se ha demostrado que el SNP *ABCB1* 3435C>T puede disminuir los niveles de ARNm y afectar a la migración de la P-gp en la membrana (Wang y cols. 2005; Kimchi-Sarfaty y cols. 2007). De todas maneras, la importancia funcional in vivo de este SNP es controvertida. Varios estudios han asociado este genotipo con baja expresión o actividad de la P-gp intestinal in vivo (Hoffmeyer y cols. 2000; Hitzl y cols. 2001; Tanabe y cols. 2001; Fellay y cols. 2002; Hitzl y cols. 2004), mientras que otros han demostrado la asociación contraria (Kim y cols. 2001; Sakaeda y cols. 2001; Nakamura y cols. 2002) o incluso ninguna asociación (Drescher y cols. 2002; Goto y cols. 2002; Siegmund y cols. 2002).

### 1.3.4. Desequilibrios de ligamiento

Los SNPs individuales pueden interactuar con otros muchos SNPs para causar su efecto fisiológico al heredarse de forma conjunta.



**Figura 5.** Localización (línea roja) de los genes *CYP3A4* (A), *CYP3A5* (B) y *ABCB1* (C) en el cromosoma 7 ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))

Los términos "vinculación" o "desequilibrio de ligamiento" se utilizan en este trabajo para indicar una interacción entre dos o más SNPs individuales. Por ejemplo, los genes que codifican *CYP3A4* y *CYP3A5* están adyacentes en la banda cromosómica 7q21 y se ha demostrado la vinculación entre *CYP3A4\*1B* y el *CYP3A5\*1* (Kuehl y cols. 2001; Hesselink y cols. 2003; Kuypers y cols. 2007; Op den Buijsch y cols. 2007) en el 67% de sujetos de raza caucásica y en el 100% de personas de raza negra (Hesselink y cols. 2004). Igualmente, las variantes alélicas *ABCB1* ocurren por lo general al mismo tiempo, lo que sugiere que están genéticamente relacionadas (Kim y cols. 2001; Tanabe y cols. 2001; Anglicheau y cols. 2003b; Kroetz y cols. 2003; Anglicheau y cols. 2004). Por ejemplo, el haplotipo mutante del *ABCB1* 1236T-2677T-3435T (llamado también TTT), que se ha relacionado con menor actividad transportadora (Salama y cols. 2006) está presente en aproximadamente el 32% de los caucásicos (Kroetz y cols. 2003).

### 1.3.5. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacocinética de la ciclosporina

#### 1.3.5.1. *CYP3A4\*1B*

La mayoría de publicaciones califica la influencia del SNP *CYP3A4\*1B* en la farmacocinética de la CsA como limitada o incluso despreciable (von Ahsen y cols. 2001; Hesselink y cols. 2003; Bouamar y cols. 2011) (Tabla 9). Sin embargo, algunos

grupos de investigación sí que han reportado resultados que apuntan a un mayor aclaramiento del fármaco y/o requerimiento de dosis en portadores de la variante \*1B (Min y Ellingrod 2003; Hesselink y cols. 2004; Crettol y cols. 2008; Zochowska y cols. 2012). Estos resultados son consistentes con la teoría de que el alelo \*1B puede aumentar el ritmo de transcripción del gen (Amirimani y cols. 2003).

Número sujetos	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
124	Ca	C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	NS	(von Ahsen y cols. 2001)
110	72 Ca, 20 N, 18 A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Hesselink y cols. 2003)
171	Ho	D, C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	NS	(Bouamar y cols. 2011)
14 (voluntarios sanos)	11 AA, 3 Ca	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> , t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> , AUC <sub>12</sub> /D, CL/F	AUC <sub>12</sub> /D : *1/*1 > *1B/*1B *1/*1B > *1B/*1B CL/F : *1/*1 < *1B/*1B *1/*1B < *1B/*1B	(Min y Ellingrod 2003)
151	126 B, 13 A, 12 N	CL/F	CL/F: *1/*1 < *1/*1B+ *1B/*1B	(Hesselink y cols. 2004)
73	B	D, C <sub>0</sub>	D (1,3, 12 meses): *1/*1 < *1/*1B	(Crettol y cols. 2008)
100	NI	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1B > *1/*1 C <sub>0</sub> /D: *1/1B < *1/*1	(Zochowska y cols. 2012)

\*1= alelo salvaje "A"; \*1B= alelo mutante "G"; A= Asiáticos; AA= Afroamericano; B= Blancos; Ca= Caucásicos; Ho= Holandeses; N= Negros; AUC<sub>12</sub>/D= concentración sanguínea lo largo del tiempo dosis ajustada en base al área bajo la curva de 0 a 12 horas; C<sub>0</sub>= concentración sanguínea mínima; C<sub>0</sub>/D= C<sub>0</sub> dosis ajustada; C<sub>2</sub>= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; C<sub>2</sub>/D= C<sub>2</sub> ajustada por dosis; CL/F= aclaramiento oral aparente; C<sub>max</sub>= concentración sanguínea máxima; D= dosis ajustada por peso; NI= No informado; NS= no significativo; t<sub>1/2</sub>= vida media de eliminación; t<sub>max</sub>= tiempo hasta alcanzar la C<sub>max</sub>.

**Tabla 9.** Estudios de la influencia del alelo *CYP3A4\*1B* en la respuesta del paciente a la CsA.

### 1.3.5.2. *CYP3A5\*3*

Igual que con el *CYP3A4*, existen resultados dispares (Staatz y cols. 2010; Barbarino y cols. 2013). Varios estudios en trasplantados renales de diferentes razas no

encontraron ninguna asociación entre el alelo *CYP3A5*\*3 y la farmacocinética de la CsA (ver Tabla 10 para una relación completa de estos trabajos). Sin embargo, cuando la muestra de pacientes incluye únicamente sujetos caucásicos sí parece que los portadores homocigotos de la variante \*3 presentan mayores niveles ajustados por dosis ( $C_0/D$ ) (Hesselink y cols. 2003; Haufroid y cols. 2004; Crettol y cols. 2008).

Aun teniendo presente estas inconsistencias, un metaanálisis que incluyó 18 de estos estudios con trasplantados de riñón concluyó que los pacientes que portan el genotipo *CYP3A5*\*3/\*3 requieren menos dosis de CsA para alcanzar las concentraciones dianas (Zhu y cols. 2011), supuestamente por presentar niveles de fármacos más altos.

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
151	126 B, 13 A, 12 N	CL/F	NS	(Hesselink y cols. 2004)
106	B	$C_0/D$ , $C_{max}/D$ , $AUC_4/D$ , $AUC_{12}/D$ , $t_{1/2}$ , MAT	NS	(Anglicheau y cols. 2004)
137	Ch	D, $C_0$ , $C_0/D$	NS	(Zhao y cols. 2005)
64	53 Ch, 10 My, 1 I	D, $C_0$ , $C_0/D$ , $C_2$	NS	(Loh y cols. 2008)
112	Ch	$C_0/D$	NS	(Wang y cols. 2009)
61	It	D, $C_2$ , $C_0/D$	NS	(Turolo y cols. 2010)
150	Br	$C_0/D$	NS	(Santoro y cols. 2011)
171	Ho	D, $C_0$ , $C_2$ , $C_0/D$ , $C_2/D$	NS	(Bouamar y cols. 2011)
101	Ch	$C_0/D$	NS	(Zhang y cols. 2013)
83	Ch	$C_2/D$ , $C_0+C_2/D$ , $C_0/D$ , $C_2/C_0$	NS	(Li y cols. 2013)
339	Ch	$C_0$	NS	(Xin y cols. 2014)

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
110	72 Ca, 20 N, 18 A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (12 meses): *1/*3 < *3/*3 (Ca)	(Hesselink y cols. 2003)
10	Ca/AA	CL/F, C <sub>max</sub> /D, AUC/D, t <sub>max</sub>	CL/F: *1/*1+*1/*3 < *3/*3 C <sub>max</sub> /D y AUC/D: *1/*1+*1/*3 > *3/*3	(Yates y cols. 2003)
50	Ca	LD, D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /LD, C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /LD: *1/*3 < *3/*3	(Haufroid y cols. 2004)
147	Ch	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>0</sub> /D de metabolitos	C <sub>0</sub> /D: *1/*1 > *1/*3+*3/*3	(Chu y cols. 2006)
106	Ch	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: *1/*1 < *1/*3 < *3/*3	(Hu y cols. 2006)
115	Ch	C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (1 mes): *1/*1 < *1/*3 < *3/*3	(Chen y cols. 2009)
73	B	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D (1,3, 6, 12 meses): *3/*3 < *1/*3 C <sub>0</sub> /D(1,3, 6, 12 meses): *1/*3 < *3/*3	(Crettol y cols. 2008)
103	Ch	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (8-30 días): *1/*1+*1/*3 < *3/*3	(Qiu y cols. 2008)
126	Ch	C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D: Alelo *1 < *3/*3	(Meng y cols. 2012)
100	NI	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*3 > *3/*3	(Zochowska y cols. 2012)

\*1= alelo salvaje "A"; \*3= alelo mutante "G"; A= Asiáticos; AA= Afroamericano; B= Blancos; Br= Brasileños; Ca= Caucásicos; Ch= Chinos; Ho= Holandeses; I= Indios; It= Italianos; My= Malayos; N= Negros; AUC= concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva; AUC/D= AUC dosis ajustada; AUC<sub>x</sub>/D= AUC/D de 0 a x horas; C<sub>0</sub>= concentración sanguínea mínima; C<sub>0</sub>/D= C<sub>0</sub> dosis ajustada; C<sub>0</sub>/LD= C<sub>0</sub> ajustada a LD; C<sub>2</sub>= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; C<sub>2</sub>/D= C<sub>2</sub> dosis ajustada; CL/F= aclaramiento oral aparente; C<sub>max</sub>= concentración sanguínea máxima; C<sub>max</sub>/D= C<sub>max</sub> dosis ajustada; D= dosis ajustada por peso; LD= última dosis; MAT= tiempo medio de absorción; C<sub>0</sub>/D metabolitos= C<sub>0</sub> de los metabolitos de la CsA dosis ajustada; NI= No informado; NS= no significativo; t<sub>1/2</sub>= vida media de eliminación; t<sub>max</sub>= tiempo hasta alcanzar la C<sub>max</sub>.

**Tabla 10.** Estudios de la influencia del SNP CYP3A5 6989A>G en la respuesta del paciente a la CsA.

### 1.3.5.3. ABCB1 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A

El papel de estos SNPs del gen ABCB1 en la farmacocinética de la CsA sigue siendo incierto (ver resumen de resultados de los estudios publicados en la tabla 11). La mayoría de los estudios se centraron en el primer SNP relevante del gen, 3435C>T, y no

lograron encontrar una asociación. Además, aquellos estudios que sí demostraron una influencia sobre el fármaco tienen resultados contradictorios. La mayoría de ellos observaron que la presencia del alelo T y, sobre todo, del genotipo mutante TT, estaba asociado a mayor exposición a la CsA a una dosis determinada (Azarpira y cols. 2006; Hu y cols. 2006; Singh y cols. 2011; Zhang y cols. 2013) Por el contrario, un estudio en 75 receptores de trasplante renal caucásicos demostró que cada adición de un alelo variante T se asociaba con una disminución aproximada del 15 % en el AUC ajustada por dosis de 0 a 4 horas (AUC<sub>4</sub>/Dosis) (Foote y cols. 2006). Un resultado similar obtuvo otro estudio pequeño realizado en 10 trasplantados renales caucásicos y afroamericanos (Yates y cols. 2003). Un reciente metaanálisis (Jiang y cols. 2008) que incluía a 1036 personas de 14 estudios separados intentó resolver esta disparidad. Este trabajo concluye que este SNP no tiene una influencia significativa en la mayoría de los parámetros farmacocinéticos de la CsA en trasplantados renales. Pero también apunta que puede haber diferencias étnicas que contribuyan a la confusión de resultados actuales.

En cuanto a los otros dos SNPs, 1236C>T y 2677G>T/A, la mayoría de los estudios no han podido encontrar tampoco una asociación relevante con la farmacocinética de la CsA (ver Tabla 11 para relación completa de trabajos). Entre los estudios que sí han encontrado diferencias atribuibles a estos polimorfismos, varios reportaron mayor biodisponibilidad de CsA en los pacientes con las variantes T (Anglicheau y cols. 2004; Wang y cols. 2009; Singh y cols. 2011; Zhang y cols. 2013), lo que sugeriría una posible menor actividad funcional de la P-gp en pacientes con el genotipo mutante, mientras que otros no encuentran dicha asociación (Qiu y cols. 2008).

Una complicación añadida que puede estar detrás de esta disparidad de resultados es que la CsA en sí misma, puede ser un inhibidor de la P-gp (Herweijer y cols. 1990; Lemahieu y cols. 2004). Las diferencias en el grado de inhibición de la P-gp

entre estudios debido a las diferencias en las concentraciones sanguíneas de CsA podrían, por tanto, limitar o enmascarar la dirección de los efectos.

Receptores renales	Etnia	SNPs del ABCB1	Parámetros farmacocinéticas	Resultados	Referencia
50	Ca	C3435T, C1236T, G2677T/A	LD, D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /LD, C <sub>0</sub> /D	NS	(Hauroid y cols. 2004)
97	J	C3435T, C1236T, G2677T/A	AUC <sub>2</sub> /D	NS	(Kuzuya y cols. 2003)
126	Ch	C3435T, C1236T, G2677T/A	C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Meng y cols. 2012)
171	Ho	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	NS	(Bouamar y cols. 2011)
150	Br	C3435T, C1236T, G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	NS	(Santoro y cols. 2011)
98	Ca	C3435T, G2677T/A	C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , AUC <sub>12</sub>	NS	(Mai y cols. 2003)
110	72 Ca, 20 N, 18 A	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Hesslink y cols. 2003)
64	53 Ch, 10 My, 1 I	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub>	NS	(Loh y cols. 2008)
124	Ca	C3435T	D, C <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> /D	NS	(von Ahnen y cols. 2001)
73	B	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Crettol y cols. 2008)
106	B	C3435T, G2677T/A C1236T	C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> /D, AUC <sub>4</sub> /D, AUC <sub>12</sub> /D, t <sub>1/2</sub> , MAT	NS C <sub>max</sub> /D y AUC <sub>4</sub> /D: CC < CT+TT	(Anglicheau y cols. 2004)
103	Ch	C3435T C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	NS C <sub>0</sub> /D (8-30 días): CC > CT+TT C <sub>0</sub> /D (1-30 días): GG < GT < TT	(Qiu y cols. 2008)
112	Ch	C3435T, C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	NS C <sub>0</sub> /D (7 días): TT > GG+GT	(Wang y cols. 2009)
106	Ch	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: CC < CT	(Hu y cols. 2006)
88	OM	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (1 día): CT < TT	(Azarpira y cols. 2006)

Receptores renales	Etnia	SNPs del ABCB1	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
75	Ca	C3435T  G2677T/A	C <sub>0</sub> , C <sub>2</sub> , AUC <sub>4</sub> /D	AUC <sub>4</sub> /D: ↓ ~ 15% x cada alelo T asociado C <sub>2</sub> : ↓ ~ 324 ng/mL x cada alelo T asociado NS	(Foote y cols. 2006)
225	I, M	C3435T  C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D o C <sub>2</sub> /D	C/D (1,3 y 6 meses): CC < TT NS GG < TT	(Singh y cols. 2011)
10	Ca, AA	C3435T	CL/F, C <sub>max</sub> /D, AUC/D, t <sub>max</sub>	CL/F: CC < CT+TT C <sub>max</sub> /D y AUC/D: CC > CT+TT	(Yates y cols. 2003)
101	Ch	C3435T  C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: TT > CC+CT NS C <sub>0</sub> /D: TT > GG+GT	(Zhang y cols. 2013)

**A**= Asiáticos; **AA**= Afroamericano; **B**= Blancos; **Br**= Brasileños; **Ca**= Caucásicos; **Ch**= Chinos; **Ho**= Holandeses; **I**= Indios; **J**= Japoneses; **M**= Mezcla; **My**= Malayos; **N**= Negros; **OM**= Oriente Medio; **AUC**= concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva; **AUC/D**= AUC dosis ajustada; **AUC<sub>x</sub>**= AUC desde 0 a x horas, **AUC<sub>x</sub>/D**= AUC/D de 0 a x horas; **C<sub>0</sub>**= concentración sanguínea mínima; **C<sub>0</sub>/D**= C<sub>0</sub> dosis ajustada; **C<sub>0</sub>/LD**= C<sub>0</sub> ajustada a LD; **C<sub>2</sub>**= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; **C<sub>2</sub>/D**= C<sub>2</sub> dosis ajustada; **CL**= aclaramiento corporal total aparente; **CL/F**= aclaramiento oral aparente; **C<sub>max</sub>**= concentración sanguínea máxima; **C<sub>max</sub>/D**= C<sub>max</sub> dosis ajustada; **D**= dosis ajustada por peso; **LD**= última dosis; **MAT**= tiempo medio de absorción; **NS**= no significativo; **t<sub>1/2</sub>**= vida media de eliminación; **t<sub>max</sub>**= tiempo hasta alcanzar la C<sub>max</sub>.

**Tabla 11.** Estudios de la influencia de los SNPs *ABCB1* 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A en la respuesta del paciente a la CsA.

### 1.3.6. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacocinética del tacrolimus

#### 1.3.6.1. *CYP3A4\*1B*

Los resultados actuales sugieren que puede haber una asociación entre la variante *CYP3A4\*1B* y la farmacocinética del tacrolimus (Tabla 12). Un número significativo de estudios en pacientes de distintas razas han observado que los valores C<sub>0</sub>/D del tacrolimus después del trasplante son menores en los portadores del alelo



*CYP3A4\*1B* (Hesselink y cols. 2003; Chitnis y cols. 2013). En la misma línea, otros autores demuestran mayor requerimiento de dosis (supuestamente por niveles bajos) en los portadores *\*1B* (Op den Buijsch y cols. 2007; Turolo y cols. 2010; Tavira y cols. 2013). Tales hallazgos son consistentes con la potencialmente mayor capacidad metabólica del *CYP3A4* en pacientes con el alelo mutante. Sin embargo, también hay estudios que no encuentran asociación (Roy y cols. 2006; Singh y cols. 2009; Cho y cols. 2012) (ver relación completa en Tabla 12).

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
44	38 Ca, 6 de otra etnia	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, tiempo hasta C <sub>0</sub> diana	NS	(Roy y cols. 2006)
70	Cor	D, C <sub>0</sub> /D	NS	(Cho y cols. 2012)
73	I	D, C <sub>0</sub> /D	NS	(Singh y cols. 2009)
64	37 Ca, 9 N, 18 A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D (3 y 6 meses): <i>*1/*1</i> < <i>*1/*1B+*1B/*1B</i> C <sub>0</sub> /D: <i>*1/*1</i> > <i>*1/*1B+*1B/*1B</i>	(Hesselink y cols. 2003)
48	35 Ca, 5 AA, 8 H	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D: <i>*1/*1</i> > <i>*1/*1B+*1B/*1B</i>	(Chitnis y cols. 2013)
26	Ca	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D (1 mes): <i>*1/*1B</i> > <i>*1/*1</i>	(Turolo y cols. 2010)
63	Ca	D, C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> /D, AUC <sub>12</sub> /D,	D (3-74 días) : <i>*1/*1</i> < <i>*1/*1B</i>	(Op den Buijsch y cols. 2007)
206	Ca	D, C <sub>0</sub> /D	D: <i>*1/*1B+*1B/*1B</i> > <i>*1/*1</i>	(Tavira y cols. 2013)
136	120 Ca, 8 A, 7 N y 1 de otra etnia	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS cuando se tuvieron en cuenta los SNPs de <i>CYP3A5</i> y <i>ABCB1</i> . Asociado con D y C <sub>0</sub> /D cuando sólo se tuvo en cuenta al <i>CYP3A4</i>	(Hesselink y cols. 2008)

*\*1*= alelo salvaje "A"; *\*1B*= alelo mutante "G"; **A**= Asiáticos; **AA**= Afroamericano; **Ca**= Caucásicos; **Cor**= Coreanos; **H**= Hispanos; **I**= Indios; **N**= Negros; **AUC<sub>12</sub>/D**= concentración sanguínea lo largo del tiempo dosis ajustada en base al área bajo la curva de 0 a 12 horas; **C<sub>0</sub>**= concentración sanguínea mínima; **C<sub>0</sub>/D**= C<sub>0</sub> dosis ajustada; **C<sub>2</sub>**= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; **C<sub>2</sub>/D**= C<sub>2</sub> ajustada por dosis; **C<sub>max</sub>/D**= concentración sanguínea máxima ajustada a la dosis; **D**= dosis ajustadas por peso; **NS**= no significativo

**Tabla 12.** Estudios de la influencia del SNP *CYP3A4\*1B* en la respuesta del paciente al tacrolimus.

Es necesario determinar si el efecto inductor del metabolismo CYP3A4 conferido por este SNP es real o es un artefacto producido por la distribución de la población étnica, o bien por la influencia del ligamiento genético relacionado con *CYP3A5\*3*.

#### 1.3.6.2 *CYP3A5\*3*

En contraste con la CsA, se ha demostrado más que sobradamente, una fuerte relación entre el SNP *CYP3A5\*3* y la farmacocinética del tacrolimus en trasplantados de riñón (Tabla 13). Como hemos comentado, este caso es particular, ya que el alelo minoritario es la variante salvaje, mientras que el *CYP3A5\*3*, que no expresa proteína funcional, es portado en homocigosis por el 80-90% de los caucásicos (Gervasini y cols. 2005).

La gran mayoría de los estudios han obtenido una menor exposición al tacrolimus (aproximadamente el 50%) tras ajuste por dosis administrada y consecuentemente un mayor requerimiento de dosis (hasta el doble) en los individuos con al menos un alelo *CYP3A5\*1* (aquellos que expresan proteína 3A5 funcional) (Macphee y cols. 2005; Zhang y cols. 2005; Ferrareso y cols. 2007; Op den Buijsch y cols. 2007; Hesselink y cols. 2008; Loh y cols. 2008; Press y cols. 2009; Spierings y cols. 2013). Una descripción de estos y otros trabajos se puede consultar en la Tabla 13. En algunos casos, observan incluso diferencias con el portador del genotipo heterocigoto de tal modo que la dosis requerida es mayor a medida que el portador tiene más alelos *CYP3A5\*1* (Jacobson y cols. 2011; Cho y cols. 2012; Spierings y cols. 2013; Vannaprasaht y cols. 2013).

El efecto del *CYP3A5\*1* en el metabolismo del tacrolimus parece estar bien establecido. Por ejemplo, un estudio en 70 trasplantados renales concluyó que la presencia de  $\geq 1$  alelo *CYP3A5\*3* era una variable independiente significativa que influye en la concentración dosis dependiente de tacrolimus (Cho y cols. 2012).

Asimismo, un metaanálisis que incluyó 18 estudios con 1443 individuos trasplantados renales, concluye que los pacientes con proteína CYP3A5 requieren mayores dosis diarias de tacrolimus que los que no expresan la enzima (Tang y cols. 2011).

Es también muy relevante el hecho de que los pacientes con CYP3A5 tardan más tiempo (hasta 2 semanas) en alcanzar las concentraciones diana de tacrolimus, requiriendo mucho más ajuste de dosis y una monitorización más exhaustiva (MacPhee y cols. 2004; Macphee y cols. 2005; Zhang y cols. 2005; Roy y cols. 2006; Hesselink y cols. 2008; Tavira y cols. 2011; Shilbayeh 2014). Por ejemplo, un estudio en 178 trasplantados renales mostró que a pesar del TDM, aproximadamente el 40 % de los receptores de trasplante renal que expresan CYP3A5 tuvieron una  $C_0$  del tacrolimus por debajo de su concentración diana en la primera semana después del trasplante en comparación con menos del 10% en el grupo de receptores que no expresan CYP3A5 (genotipo CYP3A5\*3/\*3) (MacPhee y cols. 2004). Resultados similares se observan en otros estudios (Tavira y cols. 2011; Shilbayeh 2014).

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
136	120 Ca, 8 A, 7 N y 1 de otra	D, $C_0$ , $C_0/D$	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 $C_0$ (3 días), $C_0/D$ : *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Hesselink y cols. 2008)
63	Ca	D, $C_0/D$ , $C_{max}/D$ , $AUC_{12}/D$	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 $C_0/D$ , $C_{max}/D$ , $AUC_{12}/D$ : *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Op den Buijsch y cols. 2007)
26	Ca	D, $C_0$ , $C_0/D$ , $D/C_0$	D (3-12 meses): *1/*3> *3/*3 $C_0$ (1-3 meses), $C_0/D$ (1-12 meses) *1/*3< *3/*3 $D/C_0$ (1-12 meses): *3/*3< *1/*3	(Tirelli y cols. 2008)
35	Ca	$C_0/D$	$C_0/D$ (1-12 meses): *1/*3< *3/*3	(Lopez-Montenegro Soria y cols. 2010)
118	Ch	D, $C_0$ , $C_0/D$	D (1 y 3 meses): *1/*1+*1/*3> *3/*3 $C_0$ (7 días): *1/*1 o *1/*3 46%< 5ng/mL; *3/*3 20%> 20 ng/mL $C_0/D$ (7 días, 1 y 3 meses): *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Zhang y cols. 2005)

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
18	14 Ch, 3 My, 1 I	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub>	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1 o *1/*3< *3/*3	(Loh y cols. 2008)
180	B, N, SA, OM	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, tiempo hasta C <sub>0</sub> diana	C <sub>0</sub> (1, 2 semanas): *1/*1+*1/*3< *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3 tiempo hasta C <sub>0</sub> diana: *3/*3 lo logró en 2 semanas, *1/*1+ *1/*3 se retrasó	(Macphee y cols. 2005)
134	Ca	D, C <sub>0</sub> , D/C <sub>0</sub> subconjunto de 16 pacientes: AUC <sub>12</sub> , D/AUC <sub>12</sub> , C <sub>max</sub> , t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> , CL/F	D, D/ C <sub>0</sub> , CL/F: *1/*1+*1/*3> *3/*3 D/AUC <sub>12</sub> : *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Renders y cols. 2007)
30	It	D, C <sub>0</sub> , V <sub>d</sub> /F	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> : *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Ferraresso y cols. 2007)
50	J	AUC <sub>12</sub> /D, CL/F, C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> /D	CL/F: *1/*1 decrece más que el *3/*3 AUC <sub>12</sub> /D, C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Satoh y cols. 2008)
63	Ch	D, AUC <sub>12</sub> /D, CL/F	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 AUC <sub>12</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Rong y cols. 2010)
200	Ca	D, tiempo hasta C <sub>0</sub> diana	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 tiempo hasta C <sub>0</sub> diana (7 días): El 26% "expresadores" alcanzan la C <sub>0</sub> diana en comparación con el 41% de *3/*3	(Tavira y cols. 2011)
44	38 Ca, 6 M	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, tiempo hasta C <sub>0</sub> diana	C <sub>0</sub> /D (3-7 días, 3 meses): *1/*1+*1/*3< *3/*3 tiempo hasta C <sub>0</sub> diana: *1/*1+*1/*3> *3/*3	(Roy y cols. 2006)
38	OM	tiempo hasta C <sub>0</sub> diana	tiempo hasta C <sub>0</sub> diana: *1/*1+*1/*3> *3/*3	(Shilbayeh 2014)
59	57 Ca, 2 Af	D, C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Mourad y cols. 2006)
206	B, N, SA, OM	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Fredericks y cols. 2006)
30	Ch	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1 + *1/*3< *3/*3	(Zhao y cols. 2005)
39	J	D, AUC/D, CL <sub>ss</sub> /F, V <sub>ss</sub> /F, C <sub>max</sub> , t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub>	D, CL <sub>ss</sub> /F, V <sub>ss</sub> /F: *1/*1+*1/*3> *3/*3 AUC/D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Tada y cols. 2005)
24	mayoría Ca	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Mourad y cols. 2005)

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
64	37 Ca, 18 A, 9 N	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D (3, 12 meses): *1/*3< *3/*3	(Hesselink y cols. 2003)
103	Ch	D, AUC <sub>12</sub> /D	D: *1/*1> *3/*3 AUC <sub>12</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Cheung y cols. 2006)
50	Ca	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1< *1/*3< *3/*3	(Haufroid y cols. 2004)
67	Ch	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: *1/*1< *1/*3< *3/*3	(Chen y cols. 2009)
291	Ca, N, SA	D	*1/*1>*1/*3> *3/*3	(Garcia-Roca y cols. 2012)
68	NI	D	*1/*1>*1/*3> *3/*3	(Vannaprasaht y cols. 2013)
118	M	D	*1/*1>*1/*3> *3/*3	(Spierings y cols. 2013)
695	144 AA, 551 M	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1>*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Jacobson y cols. 2011)
40	NI	C <sub>0</sub> /D, V <sub>d</sub> /F	C <sub>0</sub> /D (3, 6, 12, 36 m): *1/*1+*1/*3< *3/*3 V <sub>d</sub> /F: *1/*1>*1/*3> *3/*3	(Katsakiori y cols. 2010)
70	Cor	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1>*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> (6m), C <sub>0</sub> /D (12 m): *1/*1< *3/*3+*1/*3	(Cho y cols. 2012)
30	J	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> , C <sub>max</sub> /D, AUC <sub>12</sub> , AUC <sub>12</sub> /D, t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub> , CL/F, V <sub>d</sub> /F	D, C <sub>0</sub> , CL/F: *1/*1+*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D, AUC <sub>12</sub> /D, C <sub>max</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Tsuchiya y cols. 2004)
31	NI	CL/F	*1/*3> *3/*3	(Press y cols. 2009)
75	NI	C <sub>max</sub> , AUC <sub>12</sub> /D	C <sub>max</sub> , AUC <sub>12</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Miura y cols. 2011)
80	72 Ca, 7 AA, 1 I	D, C <sub>0</sub> /D	D: *1/*1>*1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Thervet y cols. 2003)
73	M	D, C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (1, 3 meses): *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Singh y cols. 2009)
41	J	C <sub>0</sub>	C <sub>0</sub> (0-3 semanas): *1/*1+*1/*3< *3/*3	Satoh y cols., 2011
38	OM	D, C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D (1-3 meses): *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Sy y cols. 2013)
73	Ca	C <sub>0</sub> /D	NS	(Mai y cols. 2004)
38	OM	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Shilbayeh y cols. 2013)
62	Ch	C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> (1, 5 días): *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Min y cols. 2010)
136		D	D (1,3,6 meses): *1/*1> *3/*3	(Quteineh y cols. 2008)
151	Br	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Santoro y cols. 2011)

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacocinéticos	Resultados	Referencia
26	It	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D (1 mes): *1/*3> *3/*3 C <sub>0</sub> /D: *1/*3< *3/*3	(Turolo y cols. 2010)
63	Ch	C <sub>0</sub> /D	*1/*1+*1/*3< *3/*3	(Wu y cols. 2011)
227	Ch	C <sub>0</sub> /D	*1/*1+*1/*3< *3/*3	(Zhu y cols. 2012)
48	35 Ca, 5 AA, 8 H	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D	C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> /D: *1/*1+*1/*3< *3/*3	(Chitnis y cols. 2013)
NI	Ch	C <sub>0</sub> /D	*1/*1+*1/*3< *3/*3	(Li y cols. 2013)
78	A	C <sub>0</sub> /D	*1/*1+*1/*3< *3/*3	(Hamzah y cols. 2014)

\*1= alelo salvaje "A"; \*3= alelo mutante "G"; A= Asiáticos; AA= Afroamericano; Af= Africanos; B= Blancos; Br= Brasileños; Ca= Caucásicos; Ch= Chinos; Cor= Coreanos; H= Hispanos; I= Indios; It= Italianos; J= Japoneses; M= Mezcla; My= Malayos; N= Negros; OM= Oriente Medio; SA= Sur-Asiáticos; AUC= concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva; AUC/D= AUC dosis ajustada; AUC<sub>12</sub>= concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva desde 0 a 12 horas; AUC<sub>12</sub>/D= AUC/D de 0 a 12 horas; C<sub>0</sub>= concentración sanguínea mínima; C<sub>0</sub>/D= C<sub>0</sub> dosis ajustada; C<sub>2</sub>= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; C<sub>2</sub>/D= C<sub>2</sub> dosis ajustada; CL/F= aclaramiento oral aparente; CL<sub>ss</sub>/F= CL/F en el estado estacionario; C<sub>max</sub>= concentración sanguínea máxima; C<sub>max</sub>/D= C<sub>max</sub> dosis ajustada; D= dosis ajustadas por peso; D/AUC<sub>12</sub>= ratio de D/AUC<sub>12</sub>; D/C<sub>0</sub>= ratio de la dosis/concentración mínima; NI= No informado; NS= no significativo; t<sub>1/2</sub>= vida media de eliminación; t<sub>max</sub>= tiempo para alcanzar la C<sub>max</sub>; V<sub>d</sub>/F= Volumen de distribución; V<sub>ss</sub>/F= V<sub>d</sub>/F en el estado estacionario.

**Tabla 13.** Estudios de la influencia del SNP CYP3A5 6989C>T en la respuesta del paciente al tacrolimus.

### 1.3.6.3. ABCB1 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A

Al contrario que el caso del CYP3A5, los estudios de la asociación entre la farmacocinética del tacrolimus y los SNPs del ABCB1 ofrecen resultados inconsistentes (ver Tabla 14). La mayoría de los trabajos no han podido encontrar una asociación entre 3435C>T y los niveles de tacrolimus, aunque existen también numerosos estudios que reportan C<sub>0</sub>/D superiores y/o requerimiento de dosis más bajos para pacientes con la variante 3435T (Macphee y cols. 2002; Fredericks y cols. 2006; Hesselink y cols. 2008; Lopez-Montenegro Soria y cols. 2010; Singh y cols. 2011; Shilbayeh y cols. 2013), lo que sería consistente con la posible baja actividad funcional de la P-gp en el genotipo mutante, es decir, existiría un déficit en la capacidad del transportador de expulsar fármaco a la luz intestinal. Menos estudios hay que sugieran lo contrario, menor C<sub>0</sub>/D y/o mayor requerimiento de dosis (Cheung y cols. 2006; Loh y cols. 2008; Wu y cols. 2011; Sy y cols. 2013).

Los metaanálisis realizados en los últimos años tampoco aclaran esta cuestión. Mientras que una reciente revisión del año 2012 encontró apenas un modesto efecto al mes postrasplante en las  $C_0/D$  (Terrazzino y cols. 2012), en un metaanálisis del mismo año que incluyó 13 estudios con 1327 pacientes trasplantados de riñón, se concluyó que los portadores del genotipo *ABCB1* 3435CC estaban asociados con menores  $C_0/D$  y que requerían mayores dosis para alcanzar las concentraciones diana (Li y cols. 2012b).

Igualmente, no se observa en general un impacto significativo en farmacocinética del tacrolimus del 1236C>T o del 2677G>T/A (ver Tabla 14). Igual que ocurría con el 3435C>T no faltan tampoco resultados a favor de una asociación con  $C_0/D$  más altas (Anglicheau y cols. 2003b; Singh y cols. 2011) o más bajas (Turolo y cols. 2010).

Receptores renales	Etnia	SNPs <i>ABCB1</i>	Parámetros	Resultados	Referencia
63	Ca	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, $C_0/D$ , $C_{max}/D$ , $AUC_{12}/D$	NS	(Op den Buijsch y cols. 2007)
24	Ca	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, $C_0$ , $C_0/D$	NS	(Mourad y cols. 2005)
50	Ca	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, LD, $C_0$ , $C_0/D$ , $C_0/LD$	NS	(Haufroid y cols. 2004)
19 pre-trasplante	M	C3435T, C1236T, G2677T/A	$C_0$ , AUC, $V_d/F$ , CL/F	NS	(Haufroid y cols. 2006)
59	57 Ca, 2 Af	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, $C_0/D$	NS	(Mourad y cols. 2006)
151	Br	C3435T, C1236T, G2677T/A	$C_0/D$	NS	(Santoro y cols. 2011)
70	Cor	C3435T, C1236T, G2677T	$C_0/D$	NS	(Cho y cols. 2012)
132	Cor	C3435T, C1236T, G2677T/A	D, $C_0$ , $C_0/D$	NS	(Kim y cols. 2012)
78	A	C3435T, C1236T, G2677T/A	$C_0/D$	NS	(Hamzah y cols. 2014)
95	Ca	C3435T, G2677T/A	$C_0/D$ , $AUC_{12}/D$	NS	(Kuypers y cols. 2007)

Receptores renales	Etnia	SNPs ABCB1	Parámetros	Resultados	Referencia
44	38 B, 6 M	C3435T, G2677T/A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, tiempo hasta C <sub>0</sub>	NS	(Roy y cols. 2006)
134	Ca	C3435T, G2677T/A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Renders y cols. 2007)
30	J	C3435T, G2677T/A	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>max</sub> , C <sub>max</sub> /D, AUC <sub>12</sub> , AUC <sub>12</sub> /D, V <sub>d</sub> /F, CL/F, t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub>	NS	(Tsuchiya y cols. 2004)
73	Ca	C3435T, G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	NS	(Mai y cols. 2004)
136		C3435T, G2677T/A	D	NS	(Quteineh y cols. 2008)
118	Ch	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Zhang y cols. 2005)
39	J	C3435T	D, AUC/D, C <sub>max</sub> , V <sub>ss</sub> /F, CL <sub>ss</sub> /F, t <sub>max</sub> , t <sub>1/2</sub>	NS	(Tada y cols. 2005)
64	37 Ca, 9 N, 18 A	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(Hesselink y cols. 2003)
178	118 B, 26 SA, 23 N, 11 OM	C3435T	C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS	(MacPhee y cols. 2004)
38	OM	C3435T	C <sub>0</sub> , tiempo hasta C <sub>0</sub>	NS	(Shilbayeh 2014)
68		C3435T	D	NS	(Vannaprasaht y cols. 2013)
48	35 Ca, 5 AA, 8 H	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> /D	NS	(Ciftci y cols. 2013)
26	Ca	C3435T, G2677T/A C1236T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	NS C <sub>0</sub> (6 días): TT < CT C <sub>0</sub> /D (6 días): TT < CC+CT	(Turolo y cols. 2010)
81	73 B, 7 N, 1 I	C3435T C1236T G2677T/A	D, C <sub>0</sub> /D	NS C <sub>0</sub> /D: CC < CT+TT D: GG > GT+TT C <sub>0</sub> /D: GG < GT+TT	(Anglicheau y cols. 2003b)
63	Ch	C3435T C1236T, G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: TT < CT NS	(Wu y cols. 2011)



Receptores renales	Etnia	SNPs <i>ABCB1</i>	Parámetros	Resultados	Referencia
35	Ca	C3435T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: CC< CT o TT (40% menor) NS	(Lopez-Montenegro Soria y cols. 2010)
180	164 B, 26 SA, 23 N, 12 OM	C3435T	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: CC< CT+TT	(Macphee y cols. 2002)
136	120 Ca, 8 A, 7 N, 1 otro	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D	D: CC> TT (19% menor) CT> TT (15% menor) C <sub>0</sub> /D: CC< TT (20% mayor) CT< TT (23% mayor)	(Hesselink y cols. 2008)
18	14 Ch, 3 My, 1 I	C3435T	D, C <sub>0</sub> , C <sub>0</sub> /D, C <sub>2</sub>	D: CC+CT< TT C <sub>0</sub> /D: CC> CT> TT	(Loh y cols. 2008)
38	OM	C3435T	D, C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: TT< CC o CT	(Sy y cols. 2013)
38	OM	C3435T	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: TT> CC+CT	(Shilbayeh y cols. 2013)
206	141 B, 25 N, 28 SA, 12 OM	C3435T C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: CC< TT NS C <sub>0</sub> /D: GG< TT C <sub>0</sub> /D en el subgrupo CYP3A5*3/*3: GG< TT	(Fredericks y cols. 2006)
75	M	C3435T C1236T G2677T/A	C <sub>0</sub> /D	C <sub>0</sub> /D: CC< CT+TT NS C <sub>0</sub> /D: GG< GT+TT	(Singh y cols. 2011)
103	Ch	C3435T G2677T/A	D, AUC <sub>12</sub> /D	D: CC< TT D: GG< TT	(Cheung y cols. 2006)

A= Asiáticos; AA= Afroamericano; Af= Africanos; B= Blancos; Br= Brasileños; Ca= Caucásicos; Ch= Chinos; Cor= Coreanos; H= Hispanos; I= Indios; J= Japoneses; M= Mezcla; My= Malayos; N= Negros; OM= Oriente Medio; SA= Sur-Asiáticos;; AUC= concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva; AUC/D= AUC dosis ajustada; AUC<sub>12</sub> = concentración sanguínea a lo largo del tiempo en base al área bajo la curva desde 0 a 12 horas; AUC<sub>12</sub>/D= AUC/D de 0 a 12 horas; C<sub>0</sub>= concentración sanguínea mínima; C<sub>0</sub>/D= C<sub>0</sub> dosis ajustada; C<sub>0</sub>/LD= C<sub>0</sub> ajustada a LD; C<sub>2</sub>= concentración sanguínea a las 2 horas posdosis; C<sub>2</sub>/D= C<sub>2</sub> dosis ajustada; CL= aclaramiento corporal total aparente; CL/F= aclaramiento oral aparente; CL<sub>ss</sub>/F= CL/F en el estado estacionario; C<sub>max</sub>= concentración sanguínea máxima; C<sub>max</sub>/D= C<sub>max</sub> dosis ajustada; D= dosis; LD= última dosis; m= meses; NS= no significativo; t<sub>1/2</sub>= vida media de eliminación; t<sub>max</sub> = tiempo para alcanzar la C<sub>max</sub>; V<sub>d</sub>/F= Volumen de distribución; V<sub>ss</sub>/F= V<sub>d</sub>/F en el estado estacionario.

**Tabla 14.** Estudios de la influencia de los SNPs *ABCB1* 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A en la respuesta del paciente al tacrolimus.

### **1.3.7. Influencia de polimorfismos genéticos en CYP3A y ABCB1 sobre la farmacodinamia de la ciclosporina.**

#### *1.3.7.1. CYP3A4\*1B*

El número de estudios enfocados al análisis del papel del *CYP3A4\*1B* sobre la farmacodinamia de la CsA es mucho menor que el de los estudios farmacocinéticos, pero los pocos datos que hay (Tabla 15) sugieren que no existe asociación en trasplantados renales con la función renal y/o la incidencia de rechazo agudo (von Ahsen y cols. 2001; Grinyo y cols. 2008; Singh y cols. 2009; Bouamar y cols. 2011) o con la supervivencia del injerto (Woillard y cols. 2010; Moore y cols. 2012).

#### *1.3.7.2 CYP3A5\*3*

Nueve estudios han analizado hasta ahora el impacto del alelo *CYP3A5\*3* en la farmacodinamia de la CsA en pacientes trasplantados renales (Tabla 15). En cinco estudios no pudieron encontrar ninguna relación entre este SNP y la incidencia de RA (Eng y cols. 2006; Grinyo y cols. 2008; Singh y cols. 2009; Bouamar y cols. 2011; Wang y cols. 2012), lo que también concluye el metaanálisis de Tang y cols. en trasplantados renales (Tang y cols. 2011). Igualmente, varios estudios no hallaron asociación con la función renal (medida por la creatinina sérica, la TFG o el aclaramiento de creatinina) ni con la nefrotoxicidad relacionada con CsA (Hauser y cols. 2005; Eng y cols. 2006; Bouamar y cols. 2011) ni con la supervivencia del injerto (Woillard y cols. 2010; Moore y cols. 2012).

En un estudio alemán con 399 trasplantados renales, con una duración media de seguimiento de  $8,6 \pm 3,7$  años, los pacientes que poseían al menos un alelo *CYP3A5\*1* tenían una tasa de supervivencia mayor que los sujetos homocigotos *CYP3A5\*3* (Kreutz y cols. 2008). Los autores sugirieron que la expresión del *CYP3A5* puede tener un efecto protector, debido a que el patrón de concentración de los metabolitos puede influir en la supervivencia del paciente y del injerto durante el tratamiento crónico.

Receptores renales	Etnia	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
<b>CYP3A4*1B</b>				
124	Ca	RA, Cr <sub>s</sub>	NS	(von Ahsen y cols. 2001)
237	Ca	Rechazo agudo	NS	(Grinyo y cols. 2008)
224	M	Rechazo agudo	NS	(Singh y cols. 2009)
171	M	RA, Cr <sub>s</sub> , ACr, RFR	NS	(Bouamar y cols. 2011)
259	F	Pérdida del injerto	NS	(Woillard y cols. 2010)
811	Mayoría Ca, N, SA, otros	Supervivencia del injerto	NS	(Moore y cols. 2012)
<b>CYP3A5*3</b>				
237	Ca	Rechazo agudo	NS	(Grinyo y cols. 2008)
67	My, Ch, I, M	RA, Cr <sub>s</sub> , HTA	NS	(Eng y cols. 2006)
97	Al	Nefrotoxicidad	NS	Hauser y cols., 2005
224	M	Rechazo agudo	NS	(Singh y cols. 2009)
208	Ch	RA, RC, Nftx, DM, Neumonía	NS	(Wang y cols. 2012)
259	F	Pérdida del injerto	NS	(Woillard y cols. 2010)
811	Mayoría C, N, SA, otros	Supervivencia del injerto	NS	(Moore y cols. 2012)
171	M	RA, Cr <sub>s</sub> , ACr, RFR	NS	(Bouamar y cols. 2011)
399	Al	Supervivencia del paciente	*3/*3< *1/*1+*1/*3 [77% vs. 90%]	(Kreutz y cols. 2008)

\*1= alelo salvaje "A"; \*1B= alelo mutante "G"; \*3= alelo salvaje "G"; **Al**= Alemanes; **Ca**= Caucásicos; **Ch**= Chinos; **F**= Franceses; **I**= Indios; **M**= Mezcla; **My**= Malayos; **N**= Negros; **SA**= Surasiáticos. **ACr** = Aclaramiento de creatinina; **Cr<sub>s</sub>**= Creatinina en suero; **DM**= Diabetes Mellitus; **HTA**= hipertensión arterial; **Nftx**= Nefrotoxicidad; **NS**= no significativo; **RA**= Rechazo agudo; **RC**= Rechazo crónico; **RFR**= Retraso de la función renal.

**Tabla 15.** Estudios de la influencia de los SNPs del *CYP3A* en la farmacodinamia de la CsA.

### 1.3.7.3. *ABCB1* 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A

Las publicaciones que han analizado el impacto de uno o más de estos tres SNPs en la farmacodinamia de la CsA se describen en la Tabla 16. Reflejando la inconsistencia ya comentada de los resultados en los estudios farmacocinéticos, la mayoría de trabajos no encuentran ninguna asociación entre estos SNPs y la incidencia del RA confirmado con la biopsia (von Ahsen y cols. 2001; Cattaneo y cols. 2009; Taegtmeyer y cols. 2010; Bouamar y cols. 2011; Elens y cols. 2012; Wang y cols. 2012).

En cuanto a resultados positivos, un estudio reportó un aumento de esta complicación en pacientes que expresaban el genotipo TT para los tres polimorfismos del *ABCB1* (Grinyo y cols. 2008) mientras que, por el contrario, en otro eran los portadores del genotipo homocigoto wild type para *ABCB1* 1236C>T y 2677G>T/A los que tardaban menos tiempo en tener un evento de rechazo (Singh y cols. 2011).

Ocho estudios han examinado la relación entre el genotipo *ABCB1* y la función renal del paciente (Tabla 16). Dos trabajos, con un total de casi 400 pacientes en uno de ellos, no encontraron ninguna asociación con la susceptibilidad a la insuficiencia renal en los receptores (Klauke y cols. 2008; Taegtmeyer y cols. 2010).

Cuando se estudia el riesgo de desarrollar RFR, los resultados son contradictorios, con resultados negativos (Bouamar y cols. 2011), atribuyendo mayor riesgo a los pacientes con genotipo wild type (Elens y cols. 2012) o a aquellos con alelos variantes T (Cattaneo y cols. 2009). Por otra parte, los resultados de asociación entre estos genes y la supervivencia del paciente o del injerto también son negativos (Woillard y cols. 2010; Moore y cols. 2012). En cuanto a la incidencia de nefrotoxicidad, ni Hauser y cols., ni, más recientemente, Wang y cols. (Hauser y cols. 2005; Wang y cols. 2012) han encontrado que los polimorfismos *ABCB1* de forma individual tuvieran una influencia relevante.

Pacientes y trasplante	Etnia	SNPs <i>ABCB1</i>	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
237 Rc Renales	C	C3435T C1236T G2677T/A	Rechazo agudo	TT> CT o CC [38% vs. 30% vs. 16%] TT> CT o CC [44% vs. 27% vs. 21%] TT> GT o GA+TA ó GG [44% vs. 29% vs. 10% vs. 18%]	(Grinyo y cols. 2008)
225 Rc Renales	M	C3435T C1236T G2677T/A	Rechazo agudo	NS CC > riesgo de rechazo GG > riesgo de rechazo	(Singh y cols. 2011)
124 Rc Renales	C	C3435T	RA, Cr <sub>s</sub>	NS	(von Ahlsen y cols. 2001)
208 Rc Renales	Ch	C3435T C1236T G2677T/A	RA, RC, Nftx, DM, Neumo	NS	(Wang y cols. 2012)
171 Rc Renales	M	C3435T C1236T G2677T/A	RA, Cr <sub>s</sub> , ACr, RFR	NS	(Bouamar y cols. 2011)
172 Rc Renales	NI	C3435T	RA, Cr <sub>s</sub> , ACr, RFR	RFR: CC> CT o TT	(Elens y cols. 2012)
147 Rc Renales	NI	C3435T C1236T G2677T/A	RFR, TFG <sub>e</sub> , RA, t hasta aparición RA, proteinuria, DM, CMV y otras infecciones, neoplasias, eventos CV	RFR: 3435CC< CT+TT [11% vs. 28%] 2677GG< GT+TT [11% vs. 29%] TFG <sub>e</sub> : 3435CC> CT+TT 2677 GG> GT+TT Reactivación CMV: 3435CC< CT+TT [11% vs. 34%] 1236CC< CT+TT [11% vs. 34%] 2677GG< GT+TT [9% vs. 35%] DM: 3435CC< CT+TT [8% vs. 21%]	(Cattaneo y cols. 2009)
97 Rc Renales	AI	C3435T G2677T/A	Nefrotoxicidad	NS	(Hauser y cols. 2005)
337 Rc Cardiacos	B	C3435T C1236T G2677T/A	RA, IR	NS	(Taegtmeyer y cols. 2010)
106 Rc Cardiacos (53 con IR)	AI	G2677T/A	Cr <sub>s</sub> , TFG <sub>e</sub>	NS	(Klauke y cols. 2008)
259 Rc Renales	F	C3435T C1236T G2677T/A	Pérdida del injerto	NS	(Woillard y cols. 2010)
811 Rc Renales	670 B, N, SA, otros	C3435T C1236T G2677T/A	Supervivencia del injerto, Mortalidad	NS	(Moore y cols. 2012)
154 Rc Renales	T	C3435T	HG	NS con la frecuencia. CT asociado a gravedad de HG	(Kazancioglu y cols. 2013)

AI= Alemanes; B= Blancos; Ca= Caucásicos; Ch= Chinos; F= Franceses; M= Mezcla; N= Negros; SA= Sur-Asiáticos; T= Turcos; ACr = Aclaramiento de creatinina; Cr<sub>s</sub>= Creatinina en suero; CMV= Citomegalovirus; CV= cardiovasculares; DM= Diabetes Mellitus; HG= Hiperplasia gingival; IR= insuficiencia renal; Nftx= Nefrotoxicidad; NI= no informado; NS= no significativo; RA= Rechazo agudo; RC= Rechazo crónico; Rc= Receptor; RFR= Retraso de la función renal; TFG<sub>e</sub> = tasa de filtración glomerular estimada; t= tiempo

**Tabla 16.** Estudios de la influencia de los SNPs del *ABCB1* en la farmacodinamia de la CsA.

Hay pocos datos centrados para otros efectos adversos aparte de la nefrotoxicidad. Los estudios ya mencionados de Wang y cols. y Cattaneo y cols. también investigan la incidencia de desarrollar diabetes de novo según el genotipo de estos 3 SNPs en *ABCB1*. Solo Cattaneo y cols. han encontrado diferencias, con los portadores del alelo *ABCB1* 3435T presentando mayor incidencia de diabetes que los CC (21% vs. 8%) (Cattaneo y cols. 2009). Este último estudio también analizó la incidencia de infecciones, y se concluye que los portadores del alelo T en los 3 SNPs mostraban de 2 a 3 veces más reactivación de la infección por citomegalovirus que los portadores de genotipos wild type. No hubo asociación con incidencia en eventos cardiovasculares (Cattaneo y cols. 2009). En cuanto a hiperplasia gingival, Kazancioglu y cols. asocian el genotipo 3435CT a mayor gravedad de dicho efecto adverso (Kazancioglu y cols. 2013).

### **1.3.8. Influencia de polimorfismos genéticos sobre la farmacodinamia del tacrolimus**

#### **1.3.8.1. *CYP3A4\*1B***

Los pocos estudios que han analizado este aspecto han arrojado hasta ahora resultados exclusivamente negativos (Tabla 17).

#### **1.3.8.2. *CYP3A5\*3***

A pesar de la más que establecida asociación entre el alelo *CYP3A5\*1* y los bajos niveles sistémicos del tacrolimus, paradójicamente no hay evidencias consistentes que conecten este SNP con la incidencia del rechazo. Así, gran parte de los estudios no han podido encontrar ninguna relación entre *CYP3A5\*1* y RA comprobado por biopsia (ver Tabla 17). Otros autores sí hablan de un aumento en el riesgo de rechazo, al menos en las primeras semanas tras el trasplante (Ferraresso y cols. 2007; Quteineh y

cols. 2008; Chen y cols. 2009; Singh y cols. 2009) o al menos de un tiempo más corto hasta el primer episodio de rechazo (MacPhee y cols. 2004). Estos resultados controvertidos también se observan en los dos metaanálisis realizados al respecto. En uno que englobó 23 estudios y un total de 1779 trasplantados renales y hepáticos encontraron que los portadores de *CYP3A5\*1* tenían mayor incidencia de rechazo (Tang y cols. 2011), mientras que en la otra revisión más reciente la influencia del SNP en el riesgo de RA era mínima (Terrazzino y cols. 2012).

En cuanto a la función renal, cinco estudios (Roy y cols. 2006; Ferraresso y cols. 2007; Renders y cols. 2007; Hesselink y cols. 2008; Cho y cols. 2012) no encontraron asociación con el SNP, mientras que un estudio (aunque en pacientes pediátricos) sí habla de un mayor aclaramiento de creatinina para los sujetos *CYP3A5\*1/\*1* (Shilbayeh 2014). Un estudio prospectivo apunta a una filtración glomerular menor en los portadores del alelo *\*1* hasta el primer año postrasplante (Min y cols. 2010).

En varios estudios que analizaron la incidencia de nefrotoxicidad por tacrolimus en relación con este SNP, los resultados indican que este efecto adverso se desarrolló más frecuentemente en pacientes homocigotos para *CYP3A5\*3* que en portadores de *CYP3A5\*1* (Fukudo y cols. 2008; Chen y cols. 2009). Los autores sugieren que la expresión del *CYP3A5* en el riñón puede desempeñar un papel protector contra la nefrotoxicidad, posiblemente limitando la exposición de las células del riñón al tacrolimus. Sin embargo, Kuypers y cols. observaron mayor riesgo de desarrollar este evento adverso en los portadores de *CYP3A5\*1* (Kuypers y cols. 2010). En la misma línea, Glowacki y cols. mostraron en su estudio que la interrupción del tacrolimus debido a la nefrotoxicidad ocurrió con mayor frecuencia en pacientes con el alelo *CYP3A5\*1* (Glowacki y cols. 2011). No faltan, como en otros aspectos anteriores de este trabajo, datos negativos en cuanto a la asociación de este polimorfismo y nefrotoxicidad (Quteineh y cols. 2008; Cho y cols. 2012; Shilbayeh 2014). Se necesitan más estudios

que puedan medir concentraciones del tejido renal, así como perfiles de nefrotoxicidad del tacrolimus y sus metabolitos.

Dos trabajos han reportado valores más altos de presión arterial en los trasplantados renales que portaban *CYP3A5\*1* en comparación con los homocigotos *CYP3A5\*3* (Ferraresso y cols. 2007; Torio y cols. 2012).

Por último, los estudios analizados en esta tesis no han podido encontrar una asociación entre *CYP3A5* y la supervivencia o pérdida del injerto o la incidencia de diabetes mellitus *de novo* (Tabla 17).

Pacientes	Etnia	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
<b><i>CYP3A4*1B</i></b>				
136 Rc Renales	120 Ca, 8 A, 7 N, 1 otra	RA, Sv, PI, ACr	NS	(Hesselink y cols. 2008)
44 Rc Renales	38 Ca, 6 M	RA, ACr	NS	(Roy y cols. 2006)
304 Rc Renales	Ca	Nefrotoxicidad	NS	(Kuypers y cols. 2010)
73 Rc Renales	M	Rechazo agudo	NS	(Singh y cols. 2009)
<b><i>CYP3A5*3</i></b>				
136 Rc Renales	120 Ca, 8 A, 7 N, 1 otra	RA, Sv, PI, ACr, diarrea, función hepática (Alb <sub>s</sub> , ALT)	Alb <sub>s</sub> (3 meses): *3/*3> *1/*1+*1/*3 [43,3 vs. 41,1 g/L]	(Hesselink y cols. 2008)
44 Rc Renales	38 Ca, 6 M	RA, ACr	NS	(Roy y cols. 2006)
96 Rc Renales	Ch	RA, t hasta RA	NS	(Wang y cols. 2010)
209 Rc Renales	Ca, Af	RA, Nftx, RFR, Svi	NS	(Glowacki y cols. 2011)
70 Rc Renales	Cor	RA, TFG <sub>e</sub> , Nftx, Infecciones, Svi	NS	(Cho y cols. 2012)
30 Rc Renales	It	RA, PI, Sv, Cr <sub>s</sub> , RFR, HTA	RA: *3/*3< *1/*1+*1/*3 [22% vs. 63%] HTA: *3/*3< *1/*1+*1/*3	(Ferraresso y cols. 2007)
67 Rc Renales	Ch	RA, Nefrotoxicidad	RA (hasta 3 meses): *1/*1> *1/*3> *3/*3 Nftx: *3/*3> *1/*1+*1/*3	(Chen y cols. 2009)



Pacientes	Etnia	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
60 Rc Hígado	J	Cr <sub>s</sub> , Nefrotoxicidad	Nftx: *3/*3> *1/*1+*1/*3 [46% vs 17%]	(Fukudo y cols. 2008)
73 Rc Renales	M	Rechazo agudo	*1/*1+*1/*3> *3/*3	(Singh y cols. 2009)
51 Rc Renales	J	RAS, NRC	NRC: *1/*1+*1/*3> *3/*3	(Sato y cols. 2009)
62 Rc Renales	Ch	RA, TFG <sub>e</sub>	RA (Incidencia y severidad): *1/*1+*1/*3> *3/*3 TFG <sub>e</sub> (hasta el mes y 12 meses): *3/*3> *1/*1+*1/*3	(Min y cols. 2010)
38 Rc Renales	Jord	RA, RC, Nftx, DM, HTA, Sv, PI, Cr <sub>s</sub> , ACr, BUN, TFG <sub>e</sub> , Infecciones, CAcD, hiper/hipokalemia, anemia, leucopenia	ACr: *1/*1> *3/*3 [135 vs. 76 mg/dl]	(Shilbayeh 2014)
134 Rc Renales	Ca	Cr <sub>s</sub>	NS	(Renders y cols. 2007)
304 Rc Renales	237 B, 24 NA, 3 H, 2 Af, 2 A	RA, t hasta RA, RFR, DM, Sv, PI, Nftx	Nftx: † *1/*3 [32,4% vs. 15,2% controles]	(Kuypers y cols. 2010)
60 Rc Renales	NI	HTA	NS	(Torio y cols. 2012)
70 Rc Renales	J	DM	NS	(Numakura y cols. 2005)

\*1= alelo salvaje "A"; \*1B= alelo mutante "G"; \*3= alelo salvaje "G"; †= mayor; A= Asiáticos; AA= Afroamericanos; Af= Africanos; B= Blancos; Ca= Caucásicos; Ch= Chinos; Cor= Coreanos; H= Hispanos; J= Japoneses; Jord= Jordanos; M= Mezcla; N= Negros; NA= Norteafricanos; Alb<sub>s</sub>= Albúmina en suero; ALT= Alanina transaminasa; BUN= Nitrógeno urémico o urea; CAcD= Cetoacidosis diabética; ACr = Aclaramiento de creatinina; Cr<sub>s</sub>= Creatinina en suero; DM= Diabetes Mellitus; HTA= hipertensión arterial; Nftx= Nefrotoxicidad; NRC= Nefropatía renal crónica; NI= No informado; NS= no significativo; PI= pérdida de injerto; RA= Rechazo agudo; RAS= Rechazo agudo subclínico; RC= Rechazo crónico; Rc= Receptor; RFR= Retraso de la función renal; Sv= Supervivencia del paciente; Svi= Supervivencia del injerto; TFG<sub>e</sub>= Tasa de filtración glomerular estimada.

**Tabla 17.** Estudios de la influencia de los SNPs del *CYP3A* en la farmacodinamia del tacrolimus

### 1.3.8.3 ABCB1 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T/A

La mayoría de los trabajos publicados no han encontrado asociación entre estos SNPs y la incidencia de rechazo renal (ver Tabla 18). De la misma manera, otros estudios concluyeron que el SNP 3435C>T no influía sobre la nefrotoxicidad, el retraso

de la función renal o sobre la supervivencia del injerto (Hesselink y cols. 2008; Glowacki y cols. 2011; Cho y cols. 2012; Shilbayeh 2014).

En el estudio con el seguimiento a los pacientes más largo (5 años), Kuypers y cols. no encontraron relación entre los SNPs *ABCB1* 2677G>T/A o *ABCB1* 3435C>T y numerosos eventos clínicos (rechazo agudo probado por biopsia, nefrotoxicidad, diabetes, hiperlipidemia o hipertensión arterial) (Kuypers y cols. 2007).

Receptores renales	Etnia	SNPs <i>ABCB1</i>	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
136	120 C, 8 A, 7 N, 1 otro	C3435T	RA, Sv, pérdida del injerto, ACr	NS	(Hesselink y cols. 2008)
136	NI	C3435T G2677T/A	RA, Nftx	NS	(Quteineh y cols. 2008)
100	Turcos	C3435T	Rechazo agudo	NS	(Ciftci y cols. 2013)
209	Ca, Af	C3435T	RA, Nftx, RFR, Svi	NS	(Glowacki y cols. 2011)
70	Cor	C3435T C1236T G2677T/A	RA, TFG <sub>e</sub> , Nftx, Infecciones, Svi	NS	(Cho y cols. 2012)
95	Ca	C3435T G2677T/A	RA, Nftx, HTA, DM, HLD, Sv, pérdida injerto	NS	(Kuypers y cols. 2007).
44	38 Ca, 6 otros	C3435T G2677T/A	RA, ACr	NS	(Roy y cols. 2006)
38	Jord	C3435T	RA, RC, Nftx, DM, HTA, Sv, Pérdida injerto, Cr <sub>s</sub> , ACr, BUN, TFG <sub>e</sub> , Infecciones, CAcD, hiper/hipokalemia, anemia, leucopenia	RC: CT> TT [26% vs. 12,5%] Hipokalemia: CT> TT [33,3% vs. 6,7%]	(Shilbayeh 2014)
75	Mezcla	C3435T C1236T G2677T/A	Rechazo agudo	CC > CT+TT NS GG > GT+TT	(Singh y cols. 2011)

Receptores renales	Etnia	SNPs <i>ABCB1</i>	Parámetros farmacodinámicos	Resultados	Referencia
675	669 B	C3435T	Svi, Mortalidad (CsA y TAC)	NS	(Moore y cols. 2012)
2985	B	C3435T	Svi, Mortalidad (CsA y TAC)	NS	(Moore y cols. 2012)
70	J	C3435T G2677T/A	DM	NS	(Numakura y cols. 2005)

**A**= Asiáticos; **Af**= Africanos; **B**= Blancos; **Ca**= Caucásicos; **Cor**= Coreanos; **J**= Japoneses; **Jord**= Jordanos; **N**= Negros; **BUN**= Nitrógeno urémico o urea; **CAcD**= Cetoacidosis diabética; **ACr** = Aclaramiento de creatinina; **Cr<sub>s</sub>**= Creatinina en suero; **DM**= Diabetes Mellitus; **DRC**= Disfunción renal crónica; **HLD**= hiperlipidemia; **HTA**= hipertensión arterial; **NI**= no informado; **Nftx**= Nefrotoxicidad; **NS**= no significativo; **RA**= Rechazo agudo; **RC**= Rechazo crónico; **RFR**= Retraso de la función renal; **Sv**= Supervivencia del paciente; **Svi**= Supervivencia del injerto; **t**= tiempo; **TFG<sub>e</sub>**= Tasa de filtración glomerular estimada.

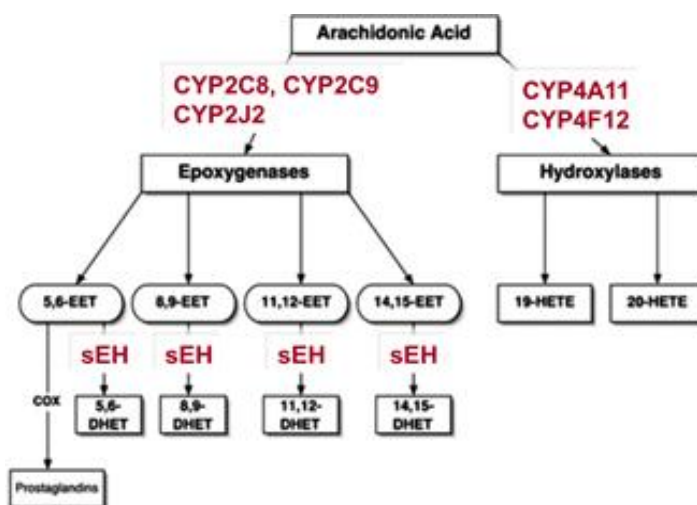
**Tabla 18.** Estudios de la influencia de los SNPs del *ABCB1* en la farmacodinamia del tacrolimus.

## 1.4. RELEVANCIA DE LAS RUTAS METABÓLICAS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN EL TRASPLANTE RENAL

### 1.4.1. La biotransformación del ácido araquidónico

La isquemia-reperfusión, que tiene lugar en cualquier proceso de trasplante, puede llegar a producir una lesión por alteraciones bioquímicas, morfológicas y fisiológicas (Venkatachalam y cols. 1981; Molitoris 1991; Kellerman y Bogusky 1992). La extensión de la lesión depende de la duración y severidad del periodo isquémico (Kellerman y cols. 1990). En momentos de hipoxia se producen las especies reactivas de oxígeno (ERO), y la activación de la xantina-oxidasa por el sistema retículo endotelial, las cuales provocan, por un lado, lesión celular por peroxidación de los lípidos de membranas celulares (Toyokuni 1999) y por otro, la activación de leucocitos y su quimiotaxis por activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esta enzima libera al ácido araquidónico (AA) que es metabolizado por ciclooxigenasas (COX), lipooxigenasas (LOX) y por el CYP450. Esta última vía da lugar a varios isómeros de ácidos

epoxieicosatrienoicos (5,6-, 8,9-, 11,12- y 14,15-EETs) y a los ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs) (Zeldin 2001) (Figura 6).



**Figura 6.** Vías epoxigenasa e hidrolasa del metabolismo del ácido araquidónico. Modificado de (McGiff y Quilley 1999) y (Gross y cols. 2005). sEH, soluble epoxihidrolasa

#### 1.4.2. Funciones de los ácidos epoxieicosatrienoicos

Hasta la fecha, la formación de EETs se ha demostrado en numerosos tejidos, incluyendo el renal, cardiovascular, pulmonar, cerebral y endotelial (Capdevila y cols. 2000; Jacobs y Zeldin 2001).

Los EETs actúan como factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHF) (Campbell y cols. 1996; Fisslthaler y cols. 1999) al activar los canales de K<sup>+</sup> dependientes de calcio de la célula muscular lisa, produciendo hiperpolarización y vasodilatación (Campbell y Harder 1999; Spector y cols. 2004). También regulan el transporte de otros canales iónicos (Capdevila y cols. 2000; Zeldin 2001; Spector y Norris 2007), inhiben la agregación plaquetaria (Krotz y cols. 2004) y tienen efectos anti-inflamatorios, dificultando la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular. Es especialmente interesante además, desde el punto de vista de su papel en el trasplante, que los EETs están involucrados en el control de la presión arterial a largo plazo (Lee y cols. 2010b) y que juegan un papel protector contra la lesión por isquemia-reperfusión

(Gross y cols. 2005; Zhang y cols. 2008b; Li y cols. 2012a), principalmente porque disminuyen la producción de radicales libres del oxígeno (Yang y cols. 2001).

En cuanto a los efectos locales en riñón, estos eicosanoides contribuyen a la función renal afectando directamente a procesos de transporte tubulares, el tono vascular local, la homeostasia, la proliferación celular y mediante la mediación de las acciones de hormonas renales (Makita y cols. 1996; Capdevila y cols. 2000; Roman y cols. 2000; McGiff y Quilley 2001). En el túbulo proximal, inhiben el transporte de  $\text{Na}^+$  y elevan la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  mediada por la angiotensina II (Madhun y cols. 1991; Romero y cols. 1991). En el túbulo colector inhiben el efecto hidrosmótico de la vasopresina, disminuyen la reabsorción neta de  $\text{Na}^+$  y la secreción de  $\text{K}^+$  e incrementan las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{+2}$  (Hirt y cols. 1989; Satoh y cols. 1993; Sakairi y cols. 1995).

La mayoría de los efectos de los EETs son estereoespecíficos (Fitzpatrick y cols. 1986; Zou y cols. 1996).

### **1.4.3. Enzimas CYP450 productoras de EETs**

Los EETs en humanos se forman por epoxigenasas de las subfamilias CYP1A, CYP2B, CYP2E y, sobre todo, CYP2C y CYP2J (Rifkind y cols. 1995; Wu y cols. 1996). Aunque la mayoría de estas enzimas se expresan principalmente en el hígado tienen también una significativa expresión extrahepática (Enayetallah y cols. 2004). En el riñón, CYP2C8 y CYP2J2 parecen ser los principales responsables en la biosíntesis de EETs (Zeldin y cols. 1995; Totah y Rettie 2005). En general, la formación de los isómeros de EETs son específicos de las isoformas. Así, el CYP2C8 produce 14,15-EET y 11,12-EET (Zeldin y cols. 1995) pero apenas produce 8,9-EET (Daikh y cols. 1994). El CYP2J2 en cambio forma los cuatro isómeros, un 76% del 14R,15S-EET y una mezcla racémica del resto (Wu y cols. 1996).

#### 1.4.3.1. *CYP2C8: expresión, sustratos y polimorfismos importantes del gen*

CYP2C8 constituye el 7% del total del contenido CYP en el hígado (Rendic y Di Carlo 1997). Se expresa además del hígado en el riñón, intestino, glándula adrenal, cerebro, mamas, ovario y corazón (Totah y Rettie 2005). La expresión renal del ARNm del CYP2C8 es mayor que la del CYP2C9 (Klose y cols. 1999). No se han encontrado evidencias de la existencia de la proteína en el corazón, pulmón, páncreas o útero (Enayetallah y cols. 2004). El CYP2C8 metaboliza fármacos anticancerosos como el paclitaxel, antiarrítmicos como la amiodarona, y lípidos endógenos como el ácido retinoico, linoleico y AA (Totah y Rettie 2005).

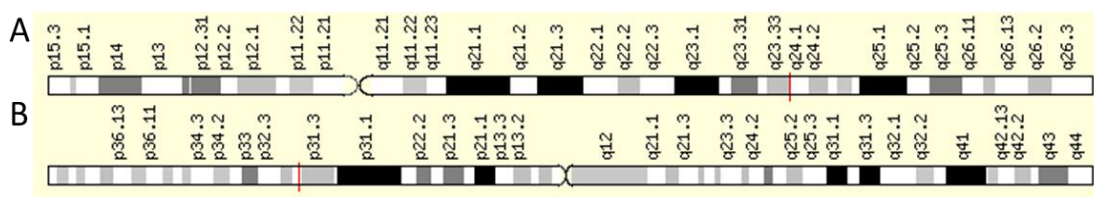
El gen, de 31 kb, está localizado en el cromosoma 10q24 (Figura 7) y consta de 9 exones (Klose y cols. 1999) con varios SNPs descritos en los exones 3, 5 y 8, en el promotor y en los intrones 1, 3, 7 y 8 (Soyama y cols. 2002; Totah y Rettie 2005). Más de 450 SNPs se han descrito hasta la fecha en este gen (Lai y cols. 2009). Los más comunes son el *CYP2C8\*2* y *CYP2C8\*3* pero sólo éste último mostró un efecto en el metabolismo del AA (Dai y cols. 2001). El *CYP2C8\*3* se expresa, sobre todo, en caucásicos (23%), es raro en negros (2%) y está ausente en japoneses (Totah y Rettie 2005). El polimorfismo está compuesto de 2 mutaciones, una es un cambio de G por A en posición 416 en el exón 3 (rs11572080) y la otra es un cambio de A por G en la posición 1196 del exón 8 (rs10509681) que provocan 2 cambios de aminoácidos (Arg139Lys y Lys399Arg, respectivamente) produciendo, según datos in vitro, una reducción de la transformación de AA en EETs (Dai y cols. 2001).

#### 1.4.3.2. *CYP2J2: expresión, sustratos y polimorfismos importantes del gen*

CYP2J2 se expresa fundamentalmente en tejidos extrahepáticos como el corazón, vasos, tracto gastrointestinal, riñón, páncreas y pulmón (Scarborough y cols. 1999). La proteína, de 502 aminoácidos metaboliza el ácido linoleico y el AA, así como

varios xenobióticos, incluyendo el diclofenaco, bufuralol, ebastina o la amiodarona (Wu y cols. 1996; Scarborough y cols. 1999; Gervasini y cols. 2006; Lee y cols. 2010a).

El gen, de 40 kb, se localiza en el brazo corto del cromosoma 1, p31.3-p31.2 (Figura 7) (Wu y cols. 1996; Ma y cols. 1998) y consta de 9 exones y 8 intrones. Al menos tiene 9 SNPs (Sim 2007) de los cuales, *CYP2J2*\*2, \*3 \*4, \*5 y \*6 resultan en una sustitución de aminoácidos en la secuencia proteica (King y cols. 2002). Todos ellos excepto el *CYP2J2*\*5 han mostrado una reducción del metabolismo de AA. El más estudiado de estos SNP es el *CYP2J2*\*7 (rs890293), localizado en la zona del promotor y presente en 8-16% de la población. Se trata de la sustitución de una G por una T en la posición 50 (G-50T) que interfiere en sitio de unión para el factor de transcripción Sp1 reduciendo así la expresión del ARNm al 50%, lo cual a su vez se ha visto que disminuye la producción de EETs in vitro (King y cols. 2002; Spiecker y cols. 2004).



**Figura 7.** Localización (línea roja) de *CYP2C8* en el cromosoma 10 (A) y de *CYP2J2* en el cromosoma 1 (B) ([www.genecards.org](http://www.genecards.org))

#### 1.4.4. Implicaciones clínicas de *CYP2C8*\*3 y *CYP2J2*\*7

Varios estudios han examinado las asociaciones entre *CYP2J2*\*7 y *CYP2C8*\*3 con diversas enfermedades cardio- y cerebrovasculares (ver resumen en Tabla 19). Sin embargo, debido a resultados contradictorios todavía no existe un consenso claro sobre los efectos in vivo de estos SNPs. En el campo del trasplante, sólo Smith y cols. (Smith y cols. 2008) han analizado la relación de estos SNP con la nefrotoxicidad inducida por ICN (en trasplantados hepáticos), concluyendo que el *CYP2C8*\*3 es un importante factor predictor del riesgo a desarrollar dicha toxicidad, especialmente, cuando los pacientes toman tacrolimus.

Pacientes (casos/CT)	Etnia	Parámetros	Resultados	Referencia
<b>CYP2C8*3</b>				
843 HT/1832 1172 IAM/1503	Ca	HT, IAM	NE en casos de HT Tendencia a mayor prevalencia del alelo *3 en casos de IAM	(Yasar y cols. 2003)
77/ 75 (AA) 124/ 16 (C)	C, AA	HT	NE	(King y cols. 2005)
108/ 107	AA	HT	NE	(Dreisbach y cols. 2005)
1052 EAC/615 1160 IAM/1667	Ca	EAC, IAM	NE	(Haschke-Becher y cols. 2010)
224/ 980 (AA) 773/577 (C)	AA, C	EC	NE	(Lee y cols. 2007)
64/99 (receptores hepáticos)	Ca	Nftx inducida por ICN	Mayor riesgo con el alelo *3 [OR= 2,38 (1,19-4,78)]	(Smith y cols. 2008)
<b>CYP2J2*7</b>				
102/94	AA	HT	NE	(Dreisbach y cols. 2005)
76/73 (AA) 123/116 (Ca)	Ca, AA	HT	NE en AA Alelo T: Protector en varones C (5,6% vs. 12,5% control)	(King y cols. 2005)
415/426	Ch	HT	NE	(Wu y cols. 2007)
295/281	Rusos	HT	Mayor riesgo con el alelo T [OR=4,78 (1,87-12,27)]	(Polonikov y cols. 2008)
3648 HT/1658 261 EVC/5478 185 ACV/5554	Ca	HT, EVC, ACV	NE	(Fava y cols. 2010)
1344/1267	Ch	EAC	NE	(Xu y cols. 2011)
224/309 (AA) 773/577 (Ca)	AA, Ca	EC	Menor riesgo con el alelo T en AA [OR= 0.58 (0.35-0,96)] Ningún efecto en C	(Lee y cols. 2007)
146/854	Ca	IAM	NE	(Borgel y cols. 2008)
200/350	Ch	ACV	NE	(Zhang y cols. 2008a)
289/255	Ca	EAC	Alelo T: Alta prevalencia en EAC (17,3% vs. 10,6%)	(Spiecker y cols. 2004)
200/200	Tw	IAM	Mayor riesgo con alelo T [OR=1,78 (1,1-6,4)]. 6,7 veces más frecuente en fumadores con IAM prematuro	(Liu y cols. 2007)
2547/697	Ca	EAC, IAM, Muerte	NE	(Hoffmann y cols. 2007)
1747/994	Ch	DM	Mayor riesgo de aparición de DM a más temprana edad	(Wang y cols. 2010)
64/99	Ca	Nftx inducida por ICN	NE	(Smith y cols. 2008)

**AA**= Afroamericanos; **ACV**= Accidente cerebrovascular; **Ca**= Caucásicos; **CT**= controles; **Ch**= Chinos; **DM**= Diabetes mellitus; **EAC**= Enfermedad arterial coronaria; **EC**=Enfermedad coronaria; **EVC**= Eventos vasculares coronarios; **HT**= Hipertensión; **IAM**: Infarto agudo de miocardio; **ICN**= Inhibidores de la calcineurina; **NE**= Ningún efecto. **Nftx** = Nefrotoxicidad; **Tw**= Taiwaneses.

**Tabla 19.** Implicaciones clínicas de los SNPs en genes responsables de la formación de EETs más ampliamente estudiados (*CYP2C8\*3* y *CYP2J2\*7*).



## **2. OBJETIVOS**

Con las premisas anteriores, que establecen la implicación de los EETs en procesos vasculares e inflamatorios y de las enzimas CYP3A y ABCB1 en la biodisponibilidad del fármaco inmunosupresor, planteamos las siguientes **hipótesis** de trabajo:

- a) La presencia de variantes en genes que codifican transportadores y enzimas metabolizadoras de los ICN puede jugar un papel relevante en (i) la exposición al fármaco inmunosupresor y (ii) el riesgo a sufrir RA por escasez de fármaco o a un evento tóxico por un exceso del mismo.
- b) La presencia de variantes en genes productores de EETs puede jugar un papel relevante en la capacidad del receptor del injerto en hacer frente a complicaciones postrasplante.

**Los objetivos específicos de esta tesis son:**

1. Purificación del ADN genómico de pacientes trasplantados renales tratados con CsA o tacrolimus.
2. Genotipación de las variantes implicadas en el metabolismo de los ICN (*CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3*), en su transporte (*ABCB1* C3435T, G2677T/A y C1236T) y en la biosíntesis de EETs (*CYP2C8\*3* y *CYP2J2\*7*).
3. Análisis del impacto de los polimorfismos identificados en *CYP3A* y *ABCB1* sobre los niveles plasmáticos y dosis de requerimiento de los ICN.
4. Análisis del impacto de los polimorfismos identificados en *CYP3A* y *ABCB1* sobre variables clínicas de función renal y eventos clínicos relativos al tratamiento inmunosupresor.
5. Análisis del impacto de las variantes *CYP2C8\*3* y *CYP2J2\*7* sobre parámetros analíticos y eventos clínicos postrasplante.
6. Establecer el efecto de la combinación de datos genéticos, clínicos y demográficos sobre la respuesta clínica del paciente.

### **3. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1. SELECCIÓN DE PACIENTES EN EL ESTUDIO**

Un total de 171 adultos trasplantados renales participaron en este estudio retrospectivo. Los pacientes eran de origen caucásico y recibieron un solo riñón a partir de donantes fallecidos en el Hospital Infanta Cristina (Badajoz, España). Todos ellos dieron el consentimiento informado para su participación en el estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Infanta Cristina y se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki y sus posteriores revisiones.

En total, se realizaron 3 estudios retrospectivos en las siguientes poblaciones:

- 1) 103 pacientes trasplantados renales que tomaban tacrolimus como terapia inmunosupresora.
- 2) 68 trasplantados renales que tomaban CsA como terapia inmunosupresora.
- 3) 166 trasplantados renales (103 tratados con tacrolimus y 63 con CsA).

En los dos primeros estudios se analizó la influencia de los SNPs de *CYP3A* y *ABCB1* en la farmacocinética y farmacodinamia de cada ICN; en el tercer estudio se analizó la influencia de SNPs de *CYP2C8* y *CYP2J2* en la disfunción renal.

Todos los pacientes recibieron terapia inmunosupresora triple con MMF (2 g/día), un programa de reducción de corticoides (500 mg de metilprednisolona intravenosa (IV) en el momento de la cirugía, 125 mg IV al día siguiente y luego, 20 mg de prednisona oral diaria que progresivamente va disminuyendo a 5 mg al día a los 2 meses después del trasplante) y un ICN (CsA o tacrolimus). 30 pacientes del grupo del tacrolimus (30,1%) y 10 del de la CsA (15%) recibieron anticuerpos frente al receptor de la IL-2. La CsA fue el inmunosupresor tradicional a utilizar en estos pacientes desde la implementación del programa de trasplante en nuestro hospital hasta que fue sustituido más tarde por tacrolimus. La dosis de tacrolimus de partida se fijó en 0,1 mg/kg administrada dos veces al día. La dosis inicial de CsA fue 4-10 mg/kg/día dividida en dos tomas. La primera dosis se administra por vía oral, poco antes del trasplante o IV en

el período perioperatorio cuando la condición del paciente no apoyaba la ruta enteral. La cantidad de fármaco administrado IV era un tercio de la dosis oral. Las dosis siguientes de ICN se ajustaron posteriormente en función de las concentraciones en sangre. Los niveles diana del tacrolimus fueron de 7-15 ng/ml hasta Septiembre del 2001 y, a partir de ahí, se adoptaron por protocolo niveles de 10-15 ng/ml (0-3 meses postrasplante) y 5-10 ng/ml (4-12 meses postrasplante). Los niveles diana de CsA se ajustaron a 150-400 ng/ml (0-2 meses postrasplante) y 100-200 ng/ml (3-12 meses postrasplante).

Los sujetos con un consumo crónico de sustancias que podían interferir con la disposición del tacrolimus o CsA (ej. carbamazepina, antibióticos macrólidos...) fueron excluidos del estudio.

## **3.2. MATERIALES Y REACTIVOS**

### **3.2.1. Materiales**

- Agitador a rotación Reax-2 (Heidolph).
- Agitadores orbitales: Reax-2000 (Heidolph) y vórtex (VWR).
- Autoclave Presoclave 75 (Selecta).
- Balanzas: 1000C-3000D (PRECISA) y H31AR (Mettler).
- Baño termostático Precistern (JP-Selecta).
- Campana de vacío.
- Centrífugas: Megafuge 1.0R (Heraeus instruments) y 5804 (Eppendorf).
- Congelador -80°C, Forma Scientific.
- Cubetas de electroforesis horizontal para geles de agarosa (Ecogen).
- Estufa Heraeus B5050 (Heraeus instruments).
- Fuentes de alimentación para cubetas de electroforesis: EPS301 (GE Healthcare Bio-Science AB) y PS 304 Minipac II (APELEX).
- Horno microondas.

- Máquina de hielo Savoid IS-ZBJ.
- Material de vidrio diverso (matraz Erlenmeyer, probetas, vasos de precipitado) (VWR).
- Microcentrífuga Galaxy 16DH (VWR).
- Microcentrífuga refrigerada Micromax RF (IEC).
- Micropipetas automáticas Eppendorf (0,5-10  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 20-200  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l)
- Pipeta automática de 5 ml (GILSON).
- Puntas de micropipetas (0,1-10  $\mu$ l QSP y Starlab, 1-100  $\mu$ l VWR, 100-1000  $\mu$ l Daslab).
- Punta de pipeta automática de 5 ml de QSP.
- pH-metro Basic 20+ (Crison).
- Sistema de purificación de agua Ecomatic y Ultramatic (Wasserlab) y Milli Q (Millipore).
- Tapones tubos eppendorf 0,2 ml (Ecogen).
- Termoagitador magnético Agimatic-E (Selecta).
- Termociclador de 96 pocillos con gradiente G-storm (Gene technologies).
- Termociclador MiniCycler ( MJ Research).
- Transiluminadores UV con sistemas de fotodocumentación de geles: Gel Doc System 1000 (Biorad) y Quantum ST4 (Biotech).
- Trituradora de hielo Princess 2986TE.
- Tubos Eppendorf de 0,2 ml y 1,5 ml (Daslab).
- Tubos de centrifuga Falcon™ de 15 ml (Becton Dickinson).
- Tubos Venojet con EDTA (Terumo Europe N.V. 3001 Leuven, Bélgica).

### **3.2.3. Reactivos**

- Ácido Bórico (Sigma Aldrich).
- Agarosa (Pronadisa).

- Agua PCR-grade: sistemas Ecomatic y Ultramatic (Wasserlab)
- Bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma Aldrich).
- Cloruro de Magnesio (Sigma Aldrich).
- dNTP master mix (Ecogen).
- Enzimas de restricción: Sspl (Fermentas), MbolI (Takara), XmnI (Promega) y Bfal (New England Biolabs).
- Etanol (Merck).
- Kit de extracción de ADN a partir de sangre entera: "QIAamp® DNA Blood Midi Kit" (Qiagen).
- Marcador de peso molecular 100 bp Ready-Load™ DNA Ladder (Invitrogen).
- Oligonucleótidos (Thermo Fisher).
- Proteinasa K (10 ng/ml) (Quiagen).
- Taq Polimerasa Ecotaq (Ecogen).
- Tampón de carga 1x: 0,25% Azul de Bromofenol; 0,25% Xileno cianol FF; 30% glicerol.
- Tampón de reacción 10x suministrado con la Tac polimerasa.
- Tampón TBE 0,5x: 45 mM Tris (Merck)- Ácido Bórico (Sigma Aldrich); 1 mM EDTA pH 8 (Sigma Aldrich).
- Tampón TE pH 8: 10 mM Tris (Merk); 1 mM EDTA (Sigma Aldrich).

### **3.3. MÉTODOS DE GENOTIPACIÓN**

Para el estudio genético se siguió el siguiente protocolo de trabajo de laboratorio:

1. Purificación del ADN genómico a partir de sangre total periférica.
2. Estimación de la cantidad y calidad del ADN.
3. Amplificación de los fragmentos seleccionados de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
4. Electroforesis de verificación de los productos de PCR.

5. Purificación y precipitación de los productos de PCR.
6. Identificación de genotipos:
  - a) Estudio de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP).
  - b) Secuenciación directa de productos de PCR.

### **3.3.1. Purificación del ADN genómico a partir de sangre total periférica**

Para el estudio de genotipación, se extrajeron 5 ml de sangre venosa de cada individuo en tubos de vidrio estériles con EDTA y se congelaron a -80°C hasta su utilización posterior. El ADN genómico se aisló de los leucocitos de la sangre extraída (Neitzel 1986) utilizando el kit “QIAamp® DNA Blood Midi Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) tal y como se describe a continuación:

1. Descongelar las muestras a temperatura ambiente.
2. Añadir 200 µl de Proteasa QIAGEN (Proteinasa K) en el fondo de un tubo de centrífuga de 15 ml.
3. Añadir 2 ml de sangre periférica y mezclar con cuidado durante 5 segundos.
4. Añadir 2,4 ml de Tampón AL (tampón de hemólisis). Mezclar en un vórtex al menos 3 veces, durante 5 segundos cada vez.
5. Incubar a 70°C durante 10 min.
6. Añadir 2 ml de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar en el vórtex durante 10 segundos.
7. Transferir con mucho cuidado, la mitad de la solución anterior (3,3 ml) a las columnas proporcionadas por el Kit (QIAamp Midi columnas), contenidas en los tubos de centrífuga de 15 ml evitando siempre tocar la pieza final del filtro de la columna con la sangre. Cerrar el tapón y centrifugar a 3000 r.p.m. / 3 min. / 22°C.



8. Retirar la columna QIAamp Midi, desechar el filtrado, colocar de nuevo la columna dentro del tubo de centrifugación de 15 ml y echar la solución restante procedente del paso 6 y se centrifuga de nuevo a 3000 r.p.m. / 3 min. / 22°C.
9. Retirar la columna, descartando el filtrado, e introducirla de nuevo en un tubo de centrífuga de 15 ml.
10. Añadir, cuidadosamente, 2 ml de Tampón AW1 (lavado) a la columna. Cerrar el tapón y centrifugar a 6000 r.p.m. / 1 min / 22°C. Descartar el eluido y volver a poner la columna en el tubo de 15 ml.
11. Añadir 2 ml de Tampón AW2 (lavado) a la columna. Cerrar el tapón y centrifugar a 6000 r.p.m. / 15 min / 22°C.
12. Desechar el tubo de centrifugación de 15 ml con el filtrado y poner las columnas en tubos nuevos.
13. Añadir 300 µl de Tampón AE (elución) o agua destilada.
14. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
15. Centrifugar a 6000 r.p.m. / 5 min / 22°C. Pipetear el filtrado directamente sobre la membrana de la columna cerrándose después y volver a centrifugar a 6000 r.p.m. / 5 min / 22°C.
16. Recoger el filtrado final (300 µl de ADN genómico purificado) en tubos eppendorf estériles. Conservar a 4°C.

### **3.3.2. Estimación de la cantidad y calidad del ADN**

La concentración de ADN y su pureza se determinó midiendo la absorbancia (A) en el espectrofotómetro según el siguiente procedimiento:

- Añadir 700 µl de tampón TE en una cubeta de cuarzo de 1 ml.
- Medir la absorbancia a 260 nm y a 280 nm.
- Añadir 5 µl de ADN y volver a medir la absorbancia a las longitudes de onda ya señaladas.

- Volver a añadir otros 5 µl de ADN a la cubeta y repetir las mediciones.
- Calcular la relación  $A_{260}/A_{280}$ . Un valor situado entre 1,82-2,0 indica que el ADN es puro. Si los valores quedan por debajo de este rango hay que volver a purificar de nuevo el ADN.

Como el factor de dilución que se empleó fue de 705/5 (=141) y 710/10 (=71), se multiplicó la densidad óptica (DO)  $A_{260}$  por 141 o 71 y el resultado se multiplicó por 50 (una DO  $A_{260}$  de 1000 equivale a 50 µg/ml de ADN genómico) para obtener la concentración de ADN en µg/ml.

### 3.3.3. Amplificación de los fragmentos seleccionados de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl y la mezcla de reacción, que se detalla en la Tabla 20, fue igual para todos los polimorfismos estudiados.

Reactivos (stock)	Volúmenes (µl)	Concentración/cantidad final
Cebador Fw (100 µM)	2	4 µM
Cebador Rv (100 µM)	2	4 µM
Mezcla de dNTPs (100 µM)	2,5	10 µM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,5	25 ó 35 mM*
Tampón (10x)	2,5	1x
Taq-polimerasa (5 U/µl)	0,25	1,25 U
ADN	1	200-400 ng
Agua estéril	Hasta completar 25	

\*Se usó MgCl<sub>2</sub> 35 mM en todas las mezclas de reacción excepto en las PCR de *CYP2J2*\*7 y *ABCB1* exón 21 G2677T/A donde usamos el de 25 mM. Fw, cebador directo; Rv, cebador inverso.

**Tabla 20.** Concentraciones y volúmenes de la mezcla de reacción de la PCR.

Los cebadores más adecuados para amplificar, mediante PCR, las regiones codificantes y secuencias flanqueantes a analizar en cada gen se obtuvieron de la

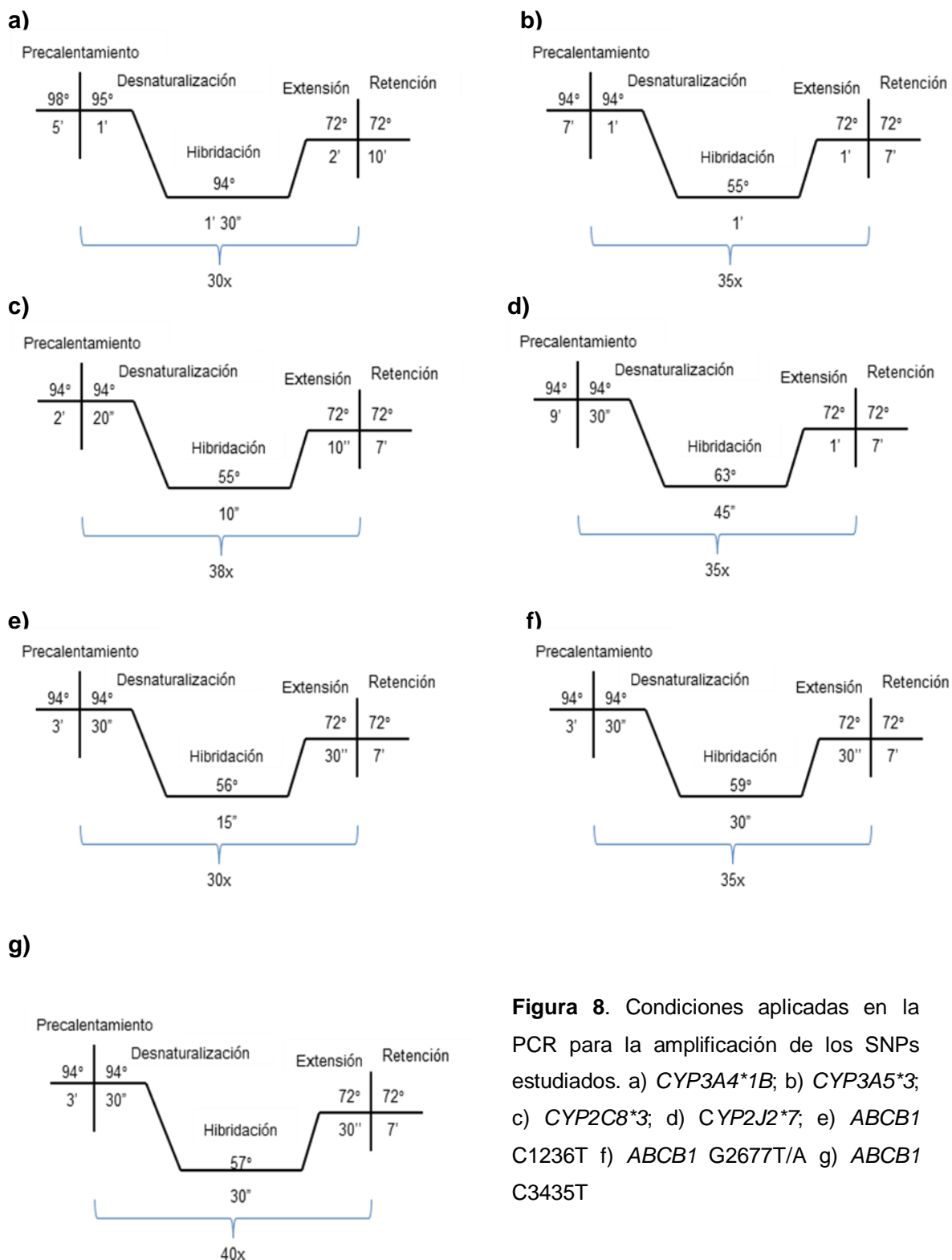
bibliografía. Los oligonucleótidos utilizados en todas las técnicas, el tamaño de banda resultante y la referencia de la que se obtiene la información se detallan en la Tabla 21.

Polimorfismo	Oligonucleótidos (5'→3')	Amplificación (pb)	Referencia
<b>CYP3A4*1B</b>	Fw-GGAATGAGGACAGCCATAGAGACAAGGGGA Rv-CCTTTCAGCTCTGTGTTGCTCTTTGCTG	368	{Cavalli, 2001 #640}
<b>CYP3A5*3</b>	Fw-CATCAGTTAGTAGACAGATGA Rv-GGTCCAAACAGGGAAGAAATA	293	{van Schaik, 2002 #1012}
<b>CYP2C8*3 exón 8</b>	Fw- CTTCCGTGCTACATGATGACG Rv-CTGCTGAGAAAGGCATGAAG	117	{Dai, 2001 #655}
<b>CYP2J2*7</b>	Fw-CAGGCACAGTTCCAATCATAG Rv-CACCTCTTCTGCCCTTCATC	618	{King, 2002 #786}
<b>ABCB1 exón 26 (C3435T)</b>	Fw-ATGTATGTTGGCCTCCTTTGCT Rv- AACAGCCGGGTGGTGCA	250	{Anglicheau, 2003 #603}
<b>ABCB1 exón 21 (G2677T/A)</b>	Fw-GCAGGCTATAGTTCCAGGCT Rv-TGAGGAATGGTTATAAACACAT	320	{Anglicheau, 2003 #603}
<b>ABCB1 exón 12 (C1236T)</b>	Fw-TCCTGTGTCTGTGAATTGCCTTG Rv-GCTGATCACCGCAGTCTAGCTCGC	225	{Anglicheau, 2003 #603}

**Tabla 21.** Resumen de los oligonucleótidos utilizados en los análisis genéticos de este estudio.

En todos los ensayos, se preparaba además una reacción de control negativa que no contenía ADN. Una vez incorporados al tubo de 0,2 ml todos los componentes de la reacción, se agitaron y se centrifugaron brevemente para depositar la mezcla en el fondo del tubo antes de introducirlos en el termociclador.

Las condiciones de las diferentes PCR, una vez se optimiza la amplificación utilizando gradientes de temperaturas, fueron las que quedan recogidas en la Figura 8.



**Figura 8.** Condiciones aplicadas en la PCR para la amplificación de los SNPs estudiados. a) *CYP3A4\*1B*; b) *CYP3A5\*3*; c) *CYP2C8\*3*; d) *CYP2J2\*7*; e) *ABCB1 C1236T* f) *ABCB1 G2677T/A* g) *ABCB1 C3435T*

Una vez finalizada la amplificación, los productos de PCR se conservaron a 4°C hasta la comprobación electroforética del resultado.

### **3.3.4. Electroforesis de verificación de los productos de PCR.**

Los productos de la amplificación por PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa para visualizar y estimar el tamaño de los fragmentos de ADN ya que es el tipo de gel más idóneo para separar fragmentos de ADN de entre 100 pb y 25 kb.

La agarosa es un polímero lineal cuya estructura básica es D-galactosa-3,6-anhidro L-galactosa, extraída de algas marinas. Permite separar las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y conformación del ADN, y la carga neta que poseen. Las moléculas de ADN (cargadas negativamente en condiciones de pH neutro por sus grupos fosfatos) migran a través del gel hacia el ánodo cuando se aplica una corriente alterna, siendo más rápida la migración de los fragmentos de menor tamaño. La resolución y velocidad de separación de fragmentos de ADN por electroforesis dependen del voltaje aplicado durante la electroforesis (a voltajes elevados más rápido corren las muestras) y de la concentración de agarosa en el gel. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. Así, los geles con 1,5-2% de agarosa permiten separar moléculas lineales de ADN de 500-1.500 pb mientras que con geles de 4-6% se separan pequeños segmentos de 100-500 pb.

#### *3.3.4.1. Preparación del gel de agarosa al 2%.*

1. Se disolvió 0,8 g de agarosa en 40 ml de tampón TBE 0,5x (gel pequeño) o 5 g en 250 ml (gel grande) calentándolo en un horno microondas sin llegar a ebullición y agitándolo cada 30 segundos.
2. Se mezcló bien usando un agitador magnético con calentador.
3. Se dejó en la estufa 10 minutos para eliminar las burbujas.
4. Se fue añadiendo 3,2 o 20  $\mu$ l de Bromuro de Etidio (EtBr) según el tamaño del gel (agente fluorescente y cancerígeno que se intercala entre las bases

nitrogenadas y es visible bajo luz UV) mientras se agitaba en el mismo agitador magnético para su completa homogenización. Se agitó durante 15'.

5. Se selló la bandeja de electroforesis con cinta adhesiva para crear un molde para el gel y se colocaron dos peines con 10 pocillos cada uno.
6. Se vertió la agarosa fundida en el molde de electroforesis, y se dejó enfriar hasta su completa polimerización.
7. Una vez solidificado, se retiraron cuidadosamente los peines y la cinta y se introdujo el gel en la cubeta de electroforesis a la que se añadió tampón de electroforesis TBE 0,5x hasta cubrir totalmente el gel y los electrodos, quedando así listo para cargar las muestras en los pocillos.

#### *3.3.4.2. Preparación de las muestras*

En el primer pocillo se añadió 3 µl del marcador de peso molecular (Ready-Load™ 100 bp DNA ladder) que consiste en 15 bandas correspondientes a fragmentos de ADN que difieren entre ellos en 100 pb, entre 100 y 1.500 pb, más un fragmento adicional de 2.072 pb. La intensidad de la banda de 600 pb es aproximadamente 2 ó 3 veces mayor que la del resto.

En el resto de pocillos se añadió 5-10 µl de producto de PCR junto a 1-2 µ de tampón de carga.

#### *3.3.4.3. Condiciones de separación electroforética*

1. Se programó el voltaje (80-175 V, 100 mA) en la fuente de alimentación.
2. Se conectaron los cables de la cámara de electroforesis a la fuente de alimentación. El cátodo (cable negro) debe estar más cerca de los pocillos que el ánodo (cable rojo).

3. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se encendió la fuente de alimentación verificando su correcto funcionamiento mediante la producción de burbujas.
4. Se realizó la electroforesis hasta que el colorante (de migración más rápida) alcanzó el extremo del gel, aproximadamente unos 20-35'.

#### *3.3.4.4. Visualización del gel*

Las bandas de ADN del gel se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se registraron con uno u otro sistema de fotodocumentación de geles, Gel Doc System 1.000 (BioRad) o Quantum ST4 (Biotech).

#### **3.3.5. Purificación y precipitación de los productos de PCR**

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación de amplicones, estos deben de estar previamente purificados, es decir, libres de restos de cebadores, dNTPs, enzimas y demás compuestos utilizados durante la PCR. . Se utilizó para este propósito el *High Pure PCR Product Purification kit* (Roche Applied Science) con el siguiente protocolo:

1. Ajustar el volumen total de cada tubo de PCR (componentes de reacción + productos de ADN) a 100  $\mu$ l con agua destilada.
2. Añadir 500  $\mu$ l del Tampón de unión (Binding Buffer) a cada tubo de PCR.
3. Mezclar en el vórtex 5 segundos cada uno.
4. Insertar un tubo con filtro (columna) en un tubo de recolección.
5. Transferir la mezcla a la columna utilizando una pipeta.
6. Centrifugar 1 minuto a 13.000 r.p.m. en una microcentrífuga a t<sup>a</sup> ambiente.
7. Desechar el filtrado. Volver a colocar la columna en el tubo de recolección.
8. Añadir 500  $\mu$ l de tampón de lavado al depósito superior.
9. Centrifugar 1 minuto a 13.000 r.p.m.
10. Desechar el filtrado. Volver a colocar la columna en el tubo de recolección.

11. Añadir 200 µl de tampón de lavado.
12. Centrifugar 1 min a 13.000 r.p.m.
13. Desechar el filtrado y el tubo de recolección.
14. Centrifugar 1 minuto a 13.000 r.p.m. sin añadir nada para eliminar los restos de etanol.
15. Cambiar la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril.
16. Añadir 50 µl de tampón de elución a cada tubo.
17. Centrifugar 1 min a 13.000 r.p.m.
18. Tirar las columnas. Los tubos de microcentrífuga contienen ahora el ADN purificado.

Utilizar el ADN eluido directamente en una electroforesis de comprobación (3 µl de buffer y 5 µl de muestra) o almacenarlo a 2-8°C o -15 a -25°C para su posterior análisis.

#### *3.3.5.1. Protocolo para precipitación de productos de PCR*

En algunas ocasiones tras purificar los productos de PCR pueden quedar restos de etanol de los tampones utilizados y han de eliminarse para que no interfieran con las enzimas de restricción utilizadas en las digestiones enzimáticas. Se realizó de la siguiente manera:

- Se añadieron a cada muestra de 20 µl de producto de PCR 60,46 µl de mezcla de precipitado (15,5 µl MgCl<sub>2</sub> 2 Mm + 44,96 µl etanol 100%).
- Se agitó brevemente en el vórtex.
- Se dejar 10 minutos en hielo para que precipitase.
- Se centrifugó 10 minutos a 13.000 r.p.m.
- Se aspiró el sobrenadante.
- Se dejó secar en campana de vacío durante 15-30 minutos.
- Se añadieron 5 µl de agua purificada.
- Se agitó 30 segundos en el vórtex.



### 3.3.6. Identificación de genotipos

#### 3.3.6.1. Estudio de los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

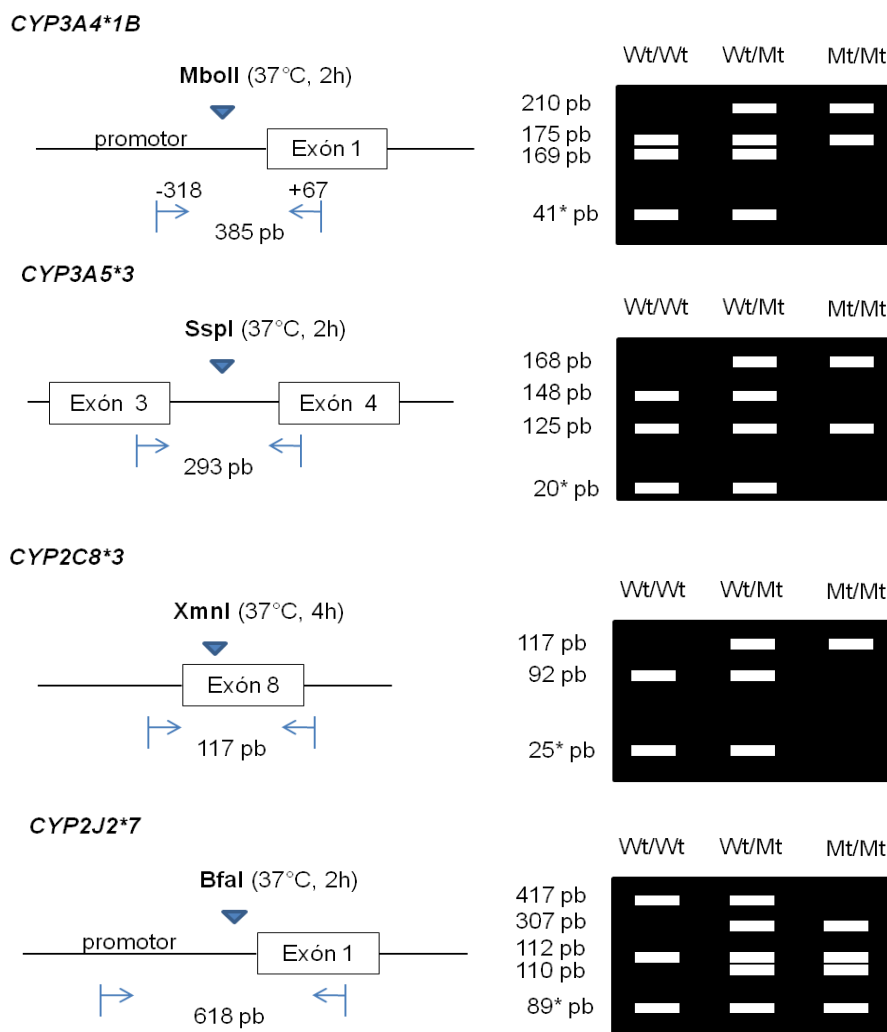
Tras el proceso de purificación de los productos de PCR, se llevó a cabo un análisis con enzimas de restricción en los casos en los que la mutación crea o destruye una diana de restricción.

Todas las digestiones se llevaron a cabo en volúmenes de 10 µl con 5 µl de ADN amplificado, 1 µl de la enzima de restricción correspondiente, 1 µl del tampón de digestión recomendado por el fabricante y 3 µl agua. Se incubaron a 37°C durante 2-4 h y los fragmentos resultantes se migraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%, con 3 µl de EtBr durante hora y media a 150V. El tamaño de los fragmentos se estimó por comparación con un marcador comercial de tamaño molecular. Las condiciones de las digestiones enzimáticas y el tamaño de los productos amplificados tanto para los alelos wild type como los mutados de los polimorfismos analizados por este método, quedan reflejados en Figura 9.

#### 3.3.6.2. Secuenciación de los productos de PCR

Los tres polimorfismos *ABCB1* evaluados por este método (*ABCB1* C3435T, G2177T/A y C1236T) fueron identificados por PCR seguida de secuenciación directa. Los oligonucleótidos y las condiciones de la amplificación utilizados fueron los previamente mencionados en el apartado 3.3.3.

La secuenciación se realizó con el kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Redy Reaction (Perkin-Elmer) en el secuenciador de DNA automático ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) en STABVIDA (Departamento de Ciencias de la Vida, Campus de la Universidad de Nova de Lisboa, Caparica (Portugal)). Los cebadores empleados fueron el Rv para el *ABCB1* C1236T y el Fw para el *ABCB1* C3435T y G2677T/A que ya se mencionó en el apartado 3.3.3.



**Figura 9.** Genotipación de los SNPs del *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C8* y *CYP2J2* mediante RFLP. Tamaño del amplicón, enzimas, temperatura y tiempo de incubación de la digestión, y los productos de restricción obtenidos tras la digestión enzimática. En cada caso, el alelo wild type se abrevia como Wt y el mutante como Mt. \*Fragmentos difícilmente observables en geles de agarosa

La secuenciación automática se realiza con un kit que consta de una mezcla que contiene tampón de la reacción, cloruro de magnesio, desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), la enzima ADN polimerasa y didesoxiterminadores marcados con cuatro dicloro-rodaminas (dR6G, dROX, dR 110, dTAMRA), cada una de ellas con una absorción máxima a una longitud de onda determinada. A esta pre-mezcla se añade el ADN y el cebador. La temperatura de hibridación del cebador con el ADN

diana de la reacción ha de ser 5°C inferior a la temperatura de hibridación del cebador, y la temperatura de elongación es de 60°C. Los productos de la reacción se visualizan en geles de poliacrilamida, en donde cada base se corresponde con una banda de color, y a su vez con un pico del cromatograma. La visualización de esa base cromatográfica de las muestras secuenciadas se realizó con el programa CodonCode Aligner.

### **3.4. MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE ICN POR MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS**

Las determinaciones de los niveles de ICN se llevaron a cabo en los laboratorios del Hospital Infanta Cristina de Badajoz en un sistema Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics) que emplea como método analítico el inmunoanálisis enzimático homogéneo.

#### **3.4.1. Fundamento del inmunoensayo enzimático homogéneo**

El análisis se basa en la competencia entre el fármaco presente en la muestra y el fármaco marcado con la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), por los sitios de unión del anticuerpo específico (Figura 10). La actividad de la enzima disminuye cuando ésta se une con el anticuerpo y en consecuencia, el fármaco presente en la muestra puede medirse en función de la actividad enzimática. Al añadir el sustrato, la enzima activa transforma a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en su forma reducida (NADH), lo cual ocasiona un cambio en la absorción que puede medirse espectrofotométricamente. La G6PDH sérica endógena no interfiere ya que la coenzima NAD funciona sólo con la enzima bacteriana de *Leuconostoc mesenteroides* que se emplea en el análisis.

### 3.4.2. Protocolo para la determinación de los niveles de ICN

Antes de realizar un inmunoensayo de este tipo para los ICN, las muestras de sangre completa, los calibradores y los controles deben pretratarse con metanol y el reactivo de pretratamiento suministrado por el fabricante. Este proceso produce la lisis celular, extrae el fármaco de la pared de los hematíes y precipita la mayoría de las proteínas sanguíneas. Se mezclan en un vórtex 100 µl de sangre total y 300 µl de precipitante, se deja reposar y, por último, se centrifuga 10 min a 10.900 r.p.m. para obtener el sobrenadante que es el que se emplea como muestra a analizar.

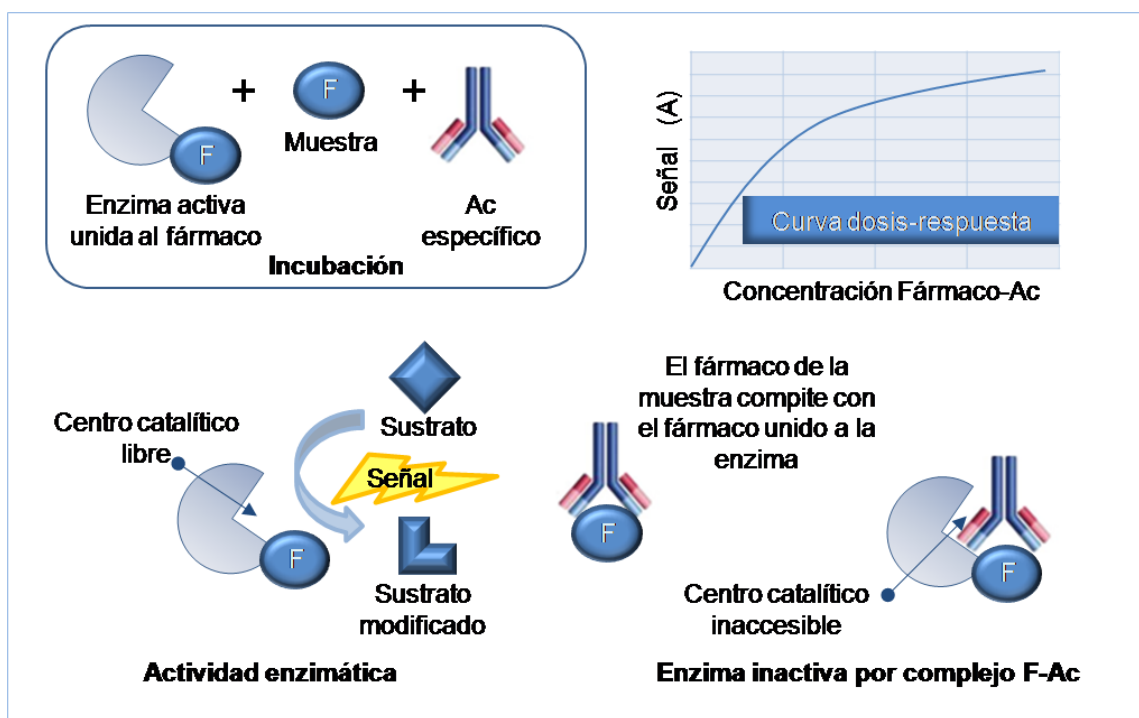


Figura 10. Fundamento del inmunoensayo enzimático

### 3.5. RECOPIACIÓN DE DATOS. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACODINÁMICOS

Todos los pacientes tenían revisiones clínicas y análisis de laboratorio periódicas. Los datos clínicos relevantes correspondientes a las revisiones de la primera semana y los meses uno, cinco y doce tras el trasplante, fueron recopiladas de las historias clínicas de los pacientes, tanto en papel como electrónicas.

#### 3.5.1. Parámetros farmacocinéticos

De los registros médicos, se recogió el peso (kg) y las dosis diarias (mg/día). A partir de estos datos se calculó la *dosis ajustada al peso* ( $D$ ; mg/kg/día).

De los datos de laboratorio se obtuvieron las concentraciones valle, mínimas ó predosis del ICN ( $C_0$ ; ng/ml) definidas como los niveles en sangre del fármaco previos a la siguiente administración. Los niveles sanguíneos del ICN se obtuvieron tras la extracción sanguínea por flebotomía de 10 ml de sangre entera en tubos con anticoagulante EDTA, usando la técnica del Inmunoensayo enzimático homogéneo en el analizador Cobas Mira Plus (Roche Diagnostics). La concentración medida fue ajustada a la dosis usando el ratio concentración/dosis ( $C_0/D$ ; *ng/ml por mg/día por kg de peso corporal*).

Los rangos terapéuticos considerados para el tacrolimus fueron de 7-15 ng/ml de Junio del 2000 a Septiembre de 2001, y entre Octubre de 2001 y Febrero de 2003 fueron de 10-15 ng/ml durante los tres primeros meses y de 5-10 ng/ml a partir del cuarto mes. Para la CsA eran de 150-400 ng/ml durante los dos primeros meses y 100-200 ng/ml en los sucesivos durante todo el periodo del estudio.

### 3.5.2. Parámetros farmacodinámicos

La *función renal* se evaluó mediante la determinación del aclaramiento de creatinina (ml/min; ACr) en orina de 24 horas. El *RFR* se definió de acuerdo con los criterios estándares: ACr <10 ml/min durante los 3 primeros días postrasplante y/o la necesidad de tratamiento de diálisis durante la primera semana postoperatoria (Geddes y cols. 2002). La *Nefrotoxicidad por ICN* fue clínicamente diagnosticada sobre la base de (I) la alteración de la función renal definida por los valores de Cr elevada (25% de aumento de las cifras basales) coincidiendo con niveles plasmáticos altos de ICN con la consiguiente disminución después de la reducción de la dosis y/o (II) la exclusión de insuficiencia renal como resultado de rechazo agudo demostrado por biopsia y/o juzgado por evaluación clínica (ver más abajo). Según la práctica en nuestro centro, en este estudio no se realizaron biopsias de protocolo en individuos con función estable del injerto. El *RA* fue establecido por hallazgos histológicos en biopsias renales según la clasificación de Banff y/o por evaluación clínica cuando los pacientes presentaban un rápido aumento  $\geq 0,30$  mg/dl en la Cr no coincidente con las concentraciones predosis del ICN supraterapéuticas, fiebre sin signos de infección, inflamación del injerto o sensibilidad, oliguria, aumento de índice de resistencia en la ecografía Doppler o la respuesta clínica al tratamiento con esteroides en consonancia con el rechazo. El diagnóstico fue confirmado por biopsia en todos los pacientes corticorresistentes.

Los síntomas que definen la *neurotoxicidad* incluyen el temblor, dolor de cabeza, insomnio, hiperestesia, picazón y convulsiones. Como parte del protocolo seguido en nuestro centro, los pacientes fueron interrogados específicamente sobre la presencia de estos síntomas neurológicos.

La HG, un crecimiento excesivo de las encías eritematosas con aspecto granular o lobulado, fue diagnosticada por un otorrinolaringólogo y clasificada como presente (de un ligero aumento en el tamaño de las encías con sangrado gingival al agrandamiento gingival severo) o ausente.

### **3.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS**

La potencia estadística del tamaño de la muestra fue evaluada con un modelo genético en el que se analizó la frecuencia de portadores de alelos mutantes con el tamaño del efecto establecido arbitrariamente a un promedio de 2,5 para los tres estudios descritos en este trabajo (pacientes con tacrolimus, pacientes con CsA y pacientes totales), con un error tipo I ajustado al 5% en todos los casos. Con el tamaño de la muestra disponible, el poder de las asociaciones unilaterales con los parámetros de eficacia y seguridad fueron del 0,831 0,822 y de 0,835, respectivamente para los tres estudios mencionados. Los cálculos del poder estadístico se realizaron con el programa G\*Power versión 3.1.3.

Para el análisis de variables farmacológicas continuas, el genotipo de los pacientes se usó como variable independiente categórica. Se realizó el contraste del supuesto de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) o del supuesto de igualdad de varianzas (prueba de Levene) para ver la distribución de estas variables. Para la comparación de las medias de las variables cuantitativas (dosis, concentraciones de ICN valle ajustadas a la dosis, valores de Cr, etc.) entre individuos con 2 grupos de genotipos distintos se utilizaron los test de t-Student o de Mann-Whitney según si la muestra se ajustaba o no a una distribución normal. Cuando más de dos grupos estaban presentes se utilizaron los test de ANOVA (resultados corregidos por el método Bonferroni) o Kruskal-Wallis según si la muestra se ajustaba o no a una distribución normal. La estadística descriptiva y todas estas pruebas se realizaron con el programa estadístico para las ciencias sociales (SPSS) versión 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Ill. USA). Para el análisis univariado de las asociaciones entre los datos categóricos (ej. incidencia de RA) en los diferentes grupos de genotipos, se utilizó el test exacto de Fisher o  $X^2$  de Pearson. El grado de asociación se estimó mediante los cálculos de los odds ratio con límites de confianza al 95% y significación estadística (p)

usando la plataforma para análisis genéticos SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>) (Sole y cols. 2006).

Las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP se evaluaron para la estimación del Equilibrio de Hardy-Weinberg usando el test exacto de Fisher del software SNPstats. También se utilizó este programa para estimar las frecuencias haplotípicas, calcular el desequilibrio de ligamiento (LD) y estimar el efecto de estos haplotipos en las variables cuantitativas mediante modelos de regresión lineal suponiendo un modo aditivo de la herencia.

Se realizaron análisis de regresión mediante la plataforma SNPstats para evaluar colectivamente el impacto de las variables categóricas y numéricas. Los genotipos identificados previamente como factores de riesgo se incluyeron en diferentes modelos junto con las covariables demográficas y clínicas (sexo, receptores y edad del donante, tiempo de isquemia fría, tiempo en diálisis, la nefrotoxicidad inducida por el ICN, RFR, son, desajustes del HLA total o panel de anticuerpos reactivos (PRA), niveles) con el potencial de afectar un resultado determinado. Las covariables clínicas incorporadas en cada modelo se eligieron en función de la variable dependiente (RFR, ACr, la nefrotoxicidad inducida por ICN y RA). La edad mediana de los donantes (48 años) fue utilizado como punto de corte para estratificar a los receptores de riñón de acuerdo con este parámetro.

La variable genotipo se convirtió de 3 categorías (homocigoto wild type, heterocigoto y homocigoto mutante) a 2 cuando no había suficientes individuos de un solo genotipo como para realizar test estadísticos de 3 categorías de forma fiable, o cuando el modelo de herencia sugerido por la plataforma SNPstats fue el dominante o el recesivo. Así, se agrupó el *CYP3A5\*3* en “expresadores” (AA+AG) o “no expresadores” (GG) de la proteína. Del mismo modo, los genotipos de SNPs *CYP3A4\*1B*, *CYP2C8\*3* y *CYP2J2\*7* se clasificaron en portadores del alelo mutante (heterocigoto + homocigoto mutante) o no portadores (wild type). Los haplotipos del gen *ABCB1* también se



agruparon, dependiendo del número de alelos variantes, en 2 grupos, 0-3 alelos variantes vs. 4-6. En el caso del polimorfismo *ABCB1* G2677T/A, los portadores de la variante A se agruparon con los de la variante T ya que no hay evidencias de que ambos alelos tengan efectos diferentes.

En todos los casos, se consideraron diferencias significativas cuando los valores del nivel de significación, *p* eran menores de 0,05.

## **4. RESULTADOS**

A continuación se exponen los resultados más relevantes que se obtuvieron en el presente trabajo y que vienen reflejados en las tres publicaciones anexas a esta tesis. Los resultados se agrupan en tres epígrafes, cada uno correspondiente a los tres estudios consecutivos que se realizaron.

#### **4.1. ESTUDIO I: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES EN TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR CON TACROLIMUS**

##### **4.1.1. Características de la población de estudio**

Se incluyeron en el estudio un total de 103 pacientes con un trasplante renal (41 mujeres) con una edad media de  $48,7 \pm 16,9$  años en el momento del trasplante y tratados con tacrolimus como inmunoterapia. Las enfermedades de base que llevaron a la insuficiencia renal se clasificaron como sigue: glomerulonefritis (33,0%), nefritis intersticial crónica (11,7%), enfermedad renal poliquística (9,7%), nefropatía diabética (7,8%) e incierta (28,2%). Otras causas (9,7%) fueron el síndrome de Alport, síndrome urémico hemolítico, nefroangiosclerosis, nefronoptosis y nefropatía isquémica. En la Tabla 22 se muestran las características clínicas adicionales de los pacientes en los cuatro puntos de tiempo considerados en el estudio.

Parámetro	1ª semana	1er mes	5º mes	1er año
Duración de la diálisis antes del trasplante (años)	3,7 ± 3,1			
Número de trasplantes (primero/segundo)	97/6			
Tiempo de isquemia fría (horas)	16,8 ± 5,4			
Incompatibilidad HLA-A	1,2 ± 0,7			
Incompatibilidad HLA-B	1,3 ± 0,6			
Incompatibilidad HLA-DR	0,6 ± 0,6			
% Actividad máxima de PRA	9,7 ± 17,9			
% Actividad máxima >50% de PRA	6 (5,8)			
Retraso de la función renal	26 (25,2)			
<sup>a</sup> C <sub>0</sub> (ng/ml)	12,1 ± 5,3	11,8 ± 3,9	9,8 ± 3,6	8,3 ± 3,3
Dosis (mg/kg)	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,06 ± 0,04
Peso (kg)	69,0 ± 14,2	68,9 ± 13,8	72,0 ± 13,9	72,6 ± 15,0
C <sub>0</sub> /dosis (ng/ml por mg/día por kg peso corporal)	107,2 ± 74,9	117,5 ± 59,8	155,6 ± 77,8	172,4 ± 107,3
Creatinina sérica (mg/dl)	2,4 ± 1,8	1,7 ± 1,0	1,5 ± 0,7	1,4 ± 0,6
Aclaramiento de creatinina sérica (ml/min)	57,1 ± 28,0	61,5 ± 28,8	71,2 ± 32,5	80,9 ± 38,3
% Pacientes por debajo del rango de concentración diana <sup>b</sup>	35,4	32,4	3,0	7,1
% Pacientes en el rango de concentración diana <sup>b</sup>	44,4	49,0	57,4	72,4
% Pacientes por encima del rango de concentración diana <sup>b</sup>	20,2	18,6	39,6	20,4

PRA, panel de anticuerpos citotóxicos anti-HLA reactivos. <sup>a</sup>C<sub>0</sub>, concentración valle o predosis.

<sup>b</sup>Rango de concentración diana del tacrolimus: 7-15 ng/ml de Junio del 2000 a Septiembre de 2001; entre Octubre de 2001 y Febrero de 2003, 10-15 ng/ml durante los tres primeros meses postrasplante y de 5-10 ng/ml a partir del cuarto mes.

**Tabla 22.** Características clínicas y parámetros farmacocinéticos de los pacientes trasplantados de riñón tratados con tacrolimus (n = 103). Los datos se muestran como valores numéricos (porcentaje) o como media ± desviación estándar.

#### 4.1.2. Distribución de genotipos en la población de estudio

La Tabla 23 muestra la frecuencia de los siete polimorfismos estudiados (*CYP3A4*\*1*B*, *CYP3A5*\*3, *CYP2C8*\*3, *CYP2J2*\*7 y *ABCB1* C3435T, G2677T/A y C1236T). Las frecuencias genotípicas no mostraron diferencias estadísticamente significativas de las esperadas por el principio de Hardy-Weinberg. Un sujeto fue identificado como *CYP3A5*\*1/\*1 e incluido en el grupo del *CYP3A5*\*1/\*3 para fines estadísticos, ya que un sólo alelo *CYP3A5*\*1 es suficiente para expresar la proteína (Kuehl y cols. 2001). Hubo un grado de desequilibrio de ligamiento moderadamente alto entre los SNPs *CYP3A4*\*1*B* y *CYP3A5*\*1 ( $D' = 0,99$ ,  $r^2 = 0,44$ ) que dio lugar a que todos los sujetos que portaban el alelo variante *CYP3A4*\*1*B* también portaban el alelo *CYP3A5*\*1. También se observó desequilibrio de ligamiento entre los SNPs *ABCB1* G2677T/A y C3435T ( $D' = 0,90$ ,  $r^2 = 0,57$ ), *ABCB1* G2677T/A y C1236T ( $D' = 0,90$ ,  $r^2 = 0,67$ ) y entre el *ABCB1* C3435T y C1236T ( $D' = 0,71$ ,  $r^2 = 0,43$ ). No se encontró ninguna otra vinculación significativa entre SNPs ( $r^2 < 0,1$ ).

Polimorfismo	wt/wt, N (%)	wt/m, N (%)	m/m, N (%)	MAF
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	98 (95)	5 (5)	0 (0)	0,02
<i>CYP3A5</i> *1/*3	1 (1)	9 (9)	93 (90)	0,05
<i>CYP2C8</i> *1/*3	74 (72)	27 (26)	2 (2)	0,15
<i>CYP2J2</i> *1/*7	99 (96)	4 (4)	0 (0)	0,02
<i>ABCB1</i> C3435T	31 (30)	50 (49)	22 (21)	0,46
<i>ABCB1</i> G2677T/A	40 (39)	49 (47) <sup>a</sup>	14 (14)	0,37
<i>ABCB1</i> C1236T	34 (33)	52 (50)	17 (17)	0,42

N, número de sujetos; MAF, frecuencia del alelo menos frecuente en población caucásica; m, mutante; wt, wild type

<sup>a</sup>Un sujeto portaba un alelo *ABCB1* 2677A.

**Tabla 23.** Distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en 103 trasplantados renales.

#### 4.1.3. Efecto de los genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* sobre la exposición del paciente al tacrolimus y sus requerimientos de dosis

La presencia del alelo *CYP3A5\*1* se asoció significativamente a menores niveles valle de tacrolimus en sangre corregidos por la dosis ( $C_0/D$ ) en todos los tiempos considerados (Tabla 24). Además, los portadores del alelo *CYP3A4\*1B* mostraron  $C_0/D$  más bajas (promedio de 59%) que las de los sujetos con el genotipo *CYP3A4\*1/\*1* (Tabla 24). Se observó un efecto de dosis génica (*gene dose effect*) cuando se analizó la combinación de los SNPs *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*3*. Así, los valores medios de  $C_0/D$  de tacrolimus durante todo el estudio fueron 145,59, 86,89 y 58,21 ng/ml por mg/kg/día para las combinaciones *3A4\*1-3A5\*3*, *3A4\*1-3A5\*1* y *3A4\*1B-3A5\*1*, respectivamente (Tabla 24). Los valores de  $p$  para la diferencia entre las tres combinaciones fueron de 0,120, 0,012, 0,006 y 0,010 en una semana, un mes, cinco meses y un año, respectivamente.

Entre los “expresadores” del *CYP3A5* (portadores del alelo funcional *CYP3A5\*1*) hubo una diferencia significativa en las  $C_0/D$  un año después del trasplante según fueran o no portadores del alelo *CYP3A4\*1B* ( $p= 0,016$ ) de manera que la presencia del alelo variante *CYP3A4\*1B* potencia el efecto del alelo *CYP3A5\*1* (metabolizadores rápidos).

La Tabla 25 describe los requerimientos de dosis para los portadores de los diferentes genotipos analizados. Los portadores de *CYP3A5\*1* mostraron valores significativamente más altos a uno, cinco y doce meses después del trasplante. Además, los requerimientos de dosis para las combinaciones *3A4\*1-3A5\*1* y *3A4\*1B-3A5\*1* fueron, aproximadamente, 2 veces más altos que los que mostró la combinación más común *3A4\*1-3A5\*3*. Los valores de  $p$  para la significación estadística de la diferencia entre los tres genotipos combinados fueron de 0,892, <0,01, <0,001 y <0,01 a una semana, un mes, cinco meses y un año, respectivamente. La Tabla 26 muestra que ninguno de los “expresadores” del *CYP3A5* que también portaban la variante *CYP3A4\*1B* alcanzó concentraciones predosis diana durante el primer mes tras el

trasplante. Sin embargo, debido a los dos diferentes criterios seguidos para definir el rango de concentración predosis diana (véase la sección de Métodos), no se pudo realizar un análisis estadístico formal y, por lo tanto, esta observación particular debe tomarse con cautela.

Genotipo/Combinación	N	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
Todos	103	107,18 ± 74,93	117,48 ± 59,82	155,62 ± 77,76	172,40 ± 107,35
<i>CYP3A4</i> *1/*1	98	110,03 ± 75,70	120,48 ± 59,61	160,47 ± 76,25	178,61 ± 106,64
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	5	54,28 ± 26,45	<b>59,12 ± 24,00<sup>a*</sup></b>	<b>62,43 ± 41,12<sup>a**</sup></b>	<b>57,01 ± 17,34<sup>a**</sup></b>
<i>CYP3A5</i> *3/*3	93	112,37 ± 76,60	123,21 ± 59,57	163,34 ± 76,23	183,07 ± 107,82
“Expresadores” <i>CYP3A5</i>	10	<b>61,53 ± 34,99<sup>b**</sup></b>	<b>64,74 ± 29,17<sup>b**</sup></b>	<b>85,38 ± 54,74<sup>b**</sup></b>	<b>78,54 ± 30,37<sup>b***</sup></b>
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *3	93	112,37 ± 76,60	123,21 ± 59,57	163,34 ± 76,23	183,07 ± 107,82
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *1	5	68,77 ± 43,86	<b>70,36 ± 35,49<sup>c*</sup></b>	108,32 ± 61,11	<b>100,09 ± 24,78<sup>c*</sup></b>
<i>3A4</i> *1 <i>B</i> / <i>3A5</i> *1	5	<b>54,28 ± 26,45<sup>c*</sup></b>	<b>59,12 ± 24,00<sup>c*</sup></b>	<b>62,43 ± 41,12<sup>c**</sup></b>	<b>57,01 ± 17,34<sup>c***</sup></b>

Por la existencia del desequilibrio de ligamiento, los valores para los que no expresaron el *CYP3A5* fueron los mismos que para aquellos que portaban la combinación *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3. De la misma manera, todos los pacientes que portaban el alelo *CYP3A4*\*1*B* también portaban la combinación *CYP3A4*\*1*B*-*CYP3A5*\*1 y, por lo tanto, los valores que se muestran son idénticos.

\*p <0,05; \*\*p <0,01; \*\*\*p <0,001

<sup>a</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A4*\*1/\*1; <sup>b</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A5*\*3/\*3; <sup>c</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3

**Tabla 24.** Efecto de los genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* en las concentraciones valle corregidas por dosis del tacrolimus (ng/ml por mg/día por kg de peso) a los cuatro tiempos considerados.

Genotipo/Combinación	N	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
Todos	103	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,06 ± 0,04
<i>CYP3A4</i> *1/*1	98	0,13 ± 0,06	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,04
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	5	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03	<b>0,14 ± 0,05<sup>a**</sup></b>	<b>0,12 ± 0,04<sup>a***</sup></b>
<i>CYP3A5</i> *3/*3	93	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,04
“Expresadores” <i>CYP3A5</i>	10	0,14 ± 0,05	<b>0,16 ± 0,04<sup>b**</sup></b>	<b>0,13 ± 0,05<sup>b<sup>l</sup></sup></b>	<b>0,12 ± 0,05<sup>b***</sup></b>
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *3	93	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,06 ± 0,04
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *1	5	0,14 ± 0,06	<b>0,17 ± 0,04<sup>c**</sup></b>	<b>0,12 ± 0,06<sup>c**</sup></b>	<b>0,11 ± 0,05<sup>c*</sup></b>
<i>3A4</i> *1 <i>B</i> / <i>3A5</i> *1	5	0,14 ± 0,03	0,15 ± 0,03	<b>0,14 ± 0,05<sup>c***</sup></b>	<b>0,12 ± 0,04<sup>c**</sup></b>

Por la existencia del desequilibrio de ligamiento, los valores para los que no expresaron el *CYP3A5* fueron los mismos que para aquellos que portaban la combinación de SNPs *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3. De la misma manera, todos los pacientes que portaban el alelo *CYP3A4*\*1*B* también portaban la combinación *CYP3A*\*1*B*-*CYP3A5*\*1 y, por lo tanto, los valores que se muestran son idénticos.

<sup>a</sup>p <0,05; <sup>\*\*</sup>p <0,01, <sup>\*\*\*</sup>p <0,001, <sup>l</sup>p < 0,0001

<sup>a</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A4*\*1/\*1; <sup>b</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A5*\*3/\*3 ; <sup>c</sup>p valor vs. portadores de *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3

**Tabla 25.** Efecto de los genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* en los requerimientos de dosis del tacrolimus (mg/kg/día) en los cuatro tiempos considerados.

#### 4.1.4. Efecto de los genotipos *ABCB1*/haplotipos en la exposición del paciente al tacrolimus y requerimientos de dosis

Ninguno de los polimorfismos de *ABCB1* estudiados (C3435T, G2677T/A o C1236T) se asoció de forma individual a los valores de  $C_0/D$  o requisitos de dosis (datos no mostrados). De la misma manera, no hubo diferencias significativas entre los haplotipos “extremos” *ABCB1*, es decir, aquellos con todos los alelos wild type y aquellos con todos los alelos variantes (haplotipo wild type CGC, frecuencia = 0,48 y haplotipo variante TTT, frecuencia = 0,34); ni en los valores de  $C_0/D$  ni en los requerimientos de dosis.



Genotipo/Combinación	Estado de C <sub>0</sub>	1ª semana	*p	1 <sup>er</sup> mes	*p	5º mes	*p	1 <sup>er</sup> año	*p
CYP3A5*3/*3	Bajo rango	30,3		28,3		2,2		8,0	
	<b><sup>a</sup>En rango</b>	<b>47,2</b>	Ref.	<b>52,2</b>	Ref.	<b>56,0</b>	Ref.	<b>70,5</b>	Ref.
	Sobre rango	22,5		19,6		41,8		21,6	
“Expresadores” CYP3A5	Bajo rango	80,0		70,0		10,0		0,0	
	<b><sup>a</sup>En rango</b>	<b>20,0</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>20,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>70,0</b>	0,29	<b>90,0</b>	<b>0,003</b>
	Sobre rango	0,0		10,0		20,0		10,0	
CYP3A4*1B-CYP3A5*1	Bajo rango	100,0		100,0		0,0		0,0	
	<b><sup>a</sup>En rango</b>	<b>0,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>100,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>100,0</b>	<b>&lt;0,0001</b>
	Sobre rango	0,0		0,0		0,0		0,0	
CYP3A4*1-CYP3A5*1	Bajo rango	60,0		40,0		20,0		0,0	
	<b><sup>a</sup>En rango</b>	<b>40,0</b>	0,41	<b>40,0</b>	0,13	40,0	<b>0,03</b>	80,0	0,17
	Sobre rango	0,0		20,0		40,0		20,0	

\*los valores de p fueron calculados teniendo como referencia el número de pacientes en rango terapéutico que no expresaban el CYP3A5 en los cuatro momentos distintos del estudio.

<sup>a</sup>Rango terapéutico: 7-15 ng/ml entre Junio de 2000 y Septiembre de 2001, y de 10-15 ng/ml en la primera semana y primer mes postrasplante y de 5-10 ng/ml al 5º mes y al año postrasplante entre Octubre de 2001 y Febrero de 2003.

**Tabla 26.** Proporción (%) de pacientes en el rango de concentraciones diana de tacrolimus según su genotipo de CYP3A4 y CYP3A5 en distintos momentos postrasplante del estudio.

Para eliminar el sesgo de portar o no un alelo 3A5 funcional se limitó el análisis sólo a los pacientes que no expresaban el *CYP3A5* (genotipo *CYP3A5*\*3/\*3; n=93). De esta manera, agrupando a los pacientes por el número de variantes de *ABCB1* se observaron menores niveles de fármacos ajustados por dosis y requerimientos de dosis más altos en los pacientes portadores de 4 a 6 alelos variantes del *ABCB1* (n = 70), en comparación con los pacientes con sólo 0 a 3 variantes (n = 23) (Tabla 27).

Nº variantes	N	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<i>Niveles valle corregidos por dosis (ng/ml por mg/día/ kg)</i>					
0-3	70	110,04 ± 55,28	127,82 ± 62,05	168,51 ± 75,84	191,13 ± 114,44
4-6	23	118,87 ± 122,19	105,59 ± 47,80	146,74 ± 78,55	156,40 ± 82,18
<i>Requerimientos de dosis (mg/kg)</i>					
0-3	70	0,12 ± 0,06	<b>0,11 ± 0,05*</b>	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,04
4-6	23	0,15 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,09 ± 0,04	0,07 ± 0,04

\*p <0,05.

**Tabla 27.** Efecto del número de alelos variantes *ABCB1* en niveles valle ajustados por dosis y requerimientos de dosis en pacientes que no expresan *CYP3A5* (n = 93).

#### 4.1.5. Asociación de polimorfismos genéticos con parámetros farmacodinámicos

La función renal medida como ACr no fue significativamente diferente entre los genotipos o haplotipos de *CYP3A* o *ABCB1* (Tablas 28 y 29). De los 103 pacientes trasplantados de riñón incluidos en el estudio, 19 (18,4%) desarrollaron nefrotoxicidad durante el período de estudio. El diagnóstico fue confirmado por biopsia en 6 pacientes. Catorce (13,6%) individuos mostraron neurotoxicidad. Dieciséis pacientes (15,5%) sufrieron un rechazo agudo de acuerdo con los criterios de diagnóstico que se describen en la sección de Métodos (el diagnóstico se confirmó por biopsia en tres de esos sujetos).

SNPs/Combinación	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<b>CYP3A5*3</b>				
*3/*3	56,4 ± 27,2	62,2 ± 28,7	74,0 ± 31,3	80,2 ± 34,5
*1/*1 + *1/*3	60,9 ± 32,3	55,1 ± 30,7	55,9 ± 36,2	61,0 ± 33,6
<b>CYP3A4*1B</b>				
*1A/*1A	56,3 ± 27,6	62,0 ± 28,8	72,9 ± 31,6	79,6 ± 34,9
*1A/*1B + *1B/*1B	68,1 ± 29,0	52,7 ± 30,8	59,3 ± 42,8	51,0 ± 13,5
<b>CYP3A4-CYP3A5</b>				
*1/*1- *3/*3	56,4 ± 27,2	62,2 ± 28,7	74,0 ± 31,3	80,2 ± 34,5
*1/*1B- *1/*3	68,1 ± 29,0	52,7 ± 30,8	59,3 ± 42,8	51,0 ± 13,5
*1B/*1B- *1/*3	53,8 ± 38,2	57,5 ± 33,9	52,5 ± 32,9	69,1 ± 44,0

**Tabla 28.** Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en función de los genotipos o combinaciones *CYP3A4/CYP3A5*.

Ningún SNP o combinación *CYP3A4/CYP3A5* mostró un efecto significativo sobre la nefrotoxicidad inducida por tacrolimus (Tabla 30). Por el contrario, sí que se observó relación con la neurotoxicidad inducida por tacrolimus para los genotipos wild type *ABCB1* 2677GG y 1236CC [OR (IC) = 3,12 (1,0-10,7),  $p = 0,04$  y OR (IC) = 3,19 (1,1-10,4),  $p = 0,04$ ; respectivamente] en el análisis llevado a cabo teniendo en cuenta un modelo de herencia dominante (2677GG vs. portadores GT-GA-TT o 1236CC vs. portadores CT-TT, respectivamente).

En la población de estudio se identificaron cuatro haplotipos del *ABCB1* (combinaciones alélicas en las posiciones 3435C/T, 2677G/T y 1236C/T). Los observados con mayor frecuencia fueron CGC, TTT, TGC y CGT cuyas asociaciones con la aparición de efectos adversos se muestran en la Tabla 30. Otros cuatro haplotipos infrecuentes, TGT, TTC, CTT y CTC, se identificaron con frecuencias iguales o inferiores a 0,01 y, por lo tanto, no pudieron testarse sus asociaciones con la toxicidad. De forma más relevante, y en comparación con el haplotipo wild type CGC, el haplotipo

TGC aumentó significativamente el riesgo de nefrotoxicidad [OR (IC) = 4,73 (1,3-16,7), p = 0,02].

SNPs/Haplotipos <i>ABCB1</i>	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<i>ABCB1</i> C1236T				
CC	56,1 ± 31,7	66,0 ± 26,8	75,1 ± 32,5	79,5 ± 31,6
CT	60,6 ± 27,3	60,5 ± 3,9	71,4 ± 32,9	79,6 ± 39,2
TT	47,1 ± 17,4	55,6 ± 22,7	69,1 ± 30,1	72,0 ± 26,1
<i>ABCB1</i> G2677T/A				
GG	56,3 ± 29,8	61,6 ± 24,4	74,5 ± 31,0	78,0 ± 28,9
GT/GA	60,8 ± 27,6	62,2 ± 33,4	71,3 ± 33,3	77,8 ± 40,2
TT/AA	44,9 ± 18,0	58,8 ± 24,6	68,8 ± 32,9	81,6 ± 28,6
<i>ABCB1</i> C3435T				
CC	56,0 ± 30,5	61,8 ± 24,6	71,4 ± 32,2	76,0 ± 29,6
CT	59,6 ± 27,8	59,9 ± 31,1	72,0 ± 32,4	77,3 ± 34,7
TT	52,5 ± 23,7	64,5 ± 29,9	73,9 ± 32,7	84,2 ± 41,6
Haplotipos extremos				
CGC	56,7 ± 34,4	62,3 ± 25,9	71,1 ± 32,7	75,4 ± 31,9
TTT	46,5 ± 18,1	56,8 ± 19,3	69,8 ± 32,4	80,8 ± 25,9
C3435T-G2677T/A- C1236T				
0-3 variantes	58,7 ± 28,8	61,5 ± 29,5	72,8 ± 33,0	78,4 ± 33,7
4-6 variantes	49,2 ± 21,6	59,4 ± 25,3	69,0 ± 29,9	74,2 ± 34,4

**Tabla 29.** Valores de aclaramiento de creatinina (ml/min) en función de los genotipos o haplotipos del *ABCB1* (C3435T-G2677T/A-C1236T) en 103 pacientes trasplantados renales tratados con tacrolimus.

Además, se observó que el haplotipo mutante TTT reducía moderadamente el riesgo de neurotoxicidad [OR (IC) = 0,34 (0,1-1,0), p = 0,05] (Tabla 30). Los SNPs analizados en los genes que sintetizan EETs, *CYP2C8*\*3 y *CYP2J2*\*7, no se asociaron con toxicidad por tacrolimus.

Por último, no se encontró ninguna asociación entre los SNPs que afectan los niveles sanguíneos de tacrolimus o requisitos de dosis y la incidencia de rechazo agudo, o entre este RA y la presencia de polimorfismos en *ABCB1*, *CYP2C8* o *CYP2J2* (Tabla 30).

Genotipo/Haplotipo	N	Nefrotoxicidad			Neurotoxicidad			Rechazo agudo		
		No (n=84)	Sí (n= 19)	OR (IC)	No (n=89)	Sí (n=14)	OR (IC)	No (n=87)	Sí (n=16)	OR (IC)
3A4*1-3A5*3	93	89,3	94,7	Ref.	88,8	100,0	Ref.	89,7	93,8	Ref.
3A4*1-3A5*1	5	6,0	0,0	NC	5,6	0,0	NC	5,7	0,0	NC
3A4*1B-3A5*1	5	4,8	15,3	1,04 (0,1-9,9)	5,6	0,0	NC	4,6	6,3	1,3 (0,1-12,4)
<i>ABCB1</i>										
CGC		48,2	44,7	Ref.	45,5	60,7	Ref.	48,0	43,5	Ref.
TTT		32,9	36,8	1,13 (0,5-2,6)	36,2	17,9	<b>0,34 (0,1-1,0)*</b>	33,1	37,2	1,41 (0,6-3,4)
TGC		6,2	18,4	<b>4,73 (1,3-16,7)**</b>	7,6	14,3	2,00 (0,5-8,2)	9,2	6,6	1,1 (0,2-6,0)
CGT		5,8	0,0	NC	4,3	7,1	1,27 (0,2-7,8)	5,9	0,0	NC
<i>CYP2C8*1/*1</i>	74	70,2	78,9	Ref.	71,9	71,4	Ref.	73,6	62,5	Ref.
<i>CYP2C8*1/*3+*3/*3</i>	29	29,8	21,1	0,63 (0,2-2,1)	28,1	28,6	1,02 (0,3-3,6)	26,4	37,5	1,58 (0,5-4,8)
<i>CYP2J2*1/*1</i>	99	96,4	94,7	Ref.	95,5	100,0	Ref.	95,4	100,0	Ref.
<i>CYP2J2*1/*7</i>	4	3,6	5,3	1,5 (0,1-15,2)	4,5	0,0	NC	4,6	0,0	NC

\*p = 0,05; \*\*p = 0,02

Ref., referencia; NC, no calculable; OR, Odds ratio con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

**Tabla 30.** Efectos de los polimorfismos y haplotipos de *CYP450* y *ABCB1* (3435-2677-1236) en las consecuencias clínicas del trasplante renal. Se muestran los porcentajes de los pacientes o frecuencias haplotípicas en los distintos grupos.

#### 4.1.6. Resumen de resultados del estudio I

- Portar el alelo *CYP3A5\*1* disminuye la exposición del paciente al tacrolimus en un promedio del 50% y duplica los requerimientos de dosis diarios.
- Portar un alelo *CYP3A4\*1B* junto con el *CYP3A5\*1* disminuye todavía más la exposición al fármaco (un promedio del 60% a lo largo del estudio).
- Ninguno de los pacientes con la combinación *CYP3A4\*1B/3A5\*1* alcanzó el rango terapéutico en el primer mes postrasplante.
- Pacientes con un mayor número de variantes alélicas en el gen *ABCB1* tienden a mostrar menor exposición al tacrolimus y a mayores requerimientos de dosis.
- El haplotipo *ABCB1* (C3435T-G2677T/A-C1236T) TGC está asociado con un mayor riesgo de sufrir un evento de Nefrotoxicidad.

## 4.2. ESTUDIO II: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES EN TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR CON CICLOSPORINA

### 4.2.1. Características de la población de estudio

Sesenta y ocho pacientes trasplantados renales (41 hombres) con una edad media de  $42,8 \pm 13,2$  años participaron en el estudio. Las patologías que condujeron a la insuficiencia renal fueron glomerulonefritis (41,3%), nefritis intersticial crónica (13,2%), enfermedad poliquística renal (11,7%). En un 27,9% de pacientes la patología fue incierta. Otras causas (5,9%) que se incluyeron fueron nefropatía diabética, uropatía obstructiva y enfermedad medular quística. En la Tabla 31 se muestran las características clínicas adicionales de los pacientes en los cuatro puntos tomados como referencia en el estudio.

### 4.2.2. Distribución de genotipos en la población de estudio

La distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3* y *ABCB1* C3435T, G2677T/A y C1236T) se representa en la Tabla 32. Todas las frecuencias de genotipos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg (datos no mostrados). Al igual que en el estudio anterior, se identificó un paciente con genotipo *CYP3A5\*1/\*1* que más tarde fue incluido en el grupo *CYP3A5\*1/\*3* con fines estadísticos.

Los datos de desequilibrio de ligamiento mostraron asociaciones parciales entre los siguientes SNPs del *ABCB1*: *ABCB1* G2677T/A y C3435T, ( $D' = 0,92$ ,  $r^2 = 0,68$ ), *ABCB1* G2677T/A y C1236T ( $D' = 0,84$ ,  $r^2 = 0,63$ ) y *ABCB1* C3435T y C1236T ( $D' = 0,87$ ,  $r^2 = 0,53$ ). Con respecto a los polimorfismos *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*1*, el

desequilibrio de ligamiento observado ( $D' = 0,99$ ,  $r^2 = 0,23$ ) dio lugar a que todos los sujetos que portaban la variante *CYP3A4\*1B* también portaban *CYP3A5\*1*.

#### 4.2.3. Efecto de los genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* en la exposición del paciente a la CsA y requerimientos de dosis

Los sujetos portadores del alelo *CYP3A5\*1* (que expresan la proteína *CYP3A5*) mostraron  $C_0/D$  significativamente más bajas en la primera semana después del trasplante que los “no expresadores” ( $32,5 \pm 14,7$  vs.  $55,1 \pm 3,8$ ). Sin embargo, este efecto no se observó posteriormente, tal y como se observa en la Tabla 33. En dicha tabla también se puede observar que ni el SNP *CYP3A4\*1B* ni las diferentes combinaciones *CYP3A4-CYP3A5* mostraron ninguna asociación significativa con valores de  $C_0/D$  a lo largo del estudio.

Se observó que el alelo *CYP3A4\*1B* estaba relacionado con mayores requerimientos de dosis hasta el 5<sup>o</sup> mes de estudio; efecto observado independientemente del alelo *CYP3A5\*1* (Tabla 34). Los portadores de la combinación *CYP3A4\*1B-CYP3A5\*1* mostraron valores más altos que los pacientes que portaban la combinación más común *CYP3A4\*1-CYP3A5\*3* a una semana, un mes y cinco meses después del injerto ( $12,2 \pm 1,5$  vs.  $8,1 \pm 1,9$ ,  $p=0,04$ ;  $9,6 \pm 3,0$  vs.  $6,5 \pm 1,7$ ,  $p=0,015$  y  $6,7 \pm 1,5$  vs.  $4,3 \pm 1,2$ ,  $p=0,009$ , respectivamente) (Tabla 34).

En la tabla 35 se representan los % de pacientes que presentaron niveles de CsA dentro y fuera de las concentraciones diana establecidas. A diferencia que en el estudio del tacrolimus, no hubo un efecto llamativo de ningún genotipo (Tabla 35).



Parámetro	1ª semana	1er mes	5º mes	1er año
Duración de la diálisis antes del trasplante (meses)	36,2 ± 27,8			
Número de trasplantes (1/2/3)	59/3/1			
Tiempo de isquemia fría (horas)	18,4 ± 6			
Incompatibilidad HLA-A	0,82 ± 0,7			
Incompatibilidad HLA-B	1,05 ± 0,6			
Incompatibilidad HLA-DR	0,67 ± 0,6			
% de actividad máxima de PRA	12,05 ± 23,9			
% de actividad máxima > 50% PRA	6 (8,8)			
Retraso de la función renal	16 (26,2)			
<sup>a</sup> C <sub>0</sub> (ng/ml)	416,4 ± 202,6	380,9 ± 187,0	272,1 ± 145,6	212,7 ± 124,3
Dosis (mg/kg)	8,1 ± 2,0	6,5 ± 1,9	4,5 ± 1,5	3,6 ± 1,2
Peso (kg)	67,2 ± 11,8	65,8 ± 11,3	69,7 ± 11,3	71,2 ± 11,9
C <sub>0</sub> /Dosis (ng/ml por mg/día por kg de peso)	52,6 ± 26,7	60,7 ± 26,5	63,2 ± 35,8	62,4 ± 37,6
Creatinina sérica (mg/dl)	3,0 ± 2,6	1,7 ± 0,7	1,5 ± 0,6	1,4 ± 0,5
Aclaramiento de creatinina (ml/min)	53,5 ± 19,6	55,2 ± 19,9	67,6 ± 21,1	69,9 ± 22,3
% de pacientes por debajo del rango de concentración diana <sup>b</sup>	10,3	5,9	1,5	11,8
% de pacientes en el rango de concentración diana <sup>b</sup>	39,7	60,3	33,8	55,9
% de pacientes por encima de concentración diana <sup>b</sup>	50,0	33,8	64,7	32,3

PRA, panel de anticuerpos citotóxicos anti-HLA reactivos. <sup>a</sup>C<sub>0</sub>, concentración valle o predosis; <sup>b</sup>Rango de concentración diana de CsA: 150-400 ng/ml durante los dos primeros meses y 100-200 ng/ml en los sucesivos.

**Tabla 31.** Características clínicas y parámetros farmacocinéticos de los pacientes trasplantados de riñón tratados con CsA (n=68). Los datos se muestran como valores numéricos (porcentaje) o como media ± desviación estándar.

Polimorfismo	wt/wt, N(%)	wt/m, N (%)	m/m, N(%)	MAF
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	66 (97,1)	2 (2,9)	0 (0)	0,02
<i>CYP3A5</i> *1/*3	1 (1,5)	9 (13,2)	58 (85,3)	0,92
<i>ABCB1</i> C3435T	20 (29,4)	32 (47,1)	16 (23,5)	0,47
<i>ABCB1</i> G2677T/A	24 (35,3)	32 (47,1) <sup>a</sup>	12 (17,6)	0,41
<i>ABCB1</i> C1236T	26 (38,2)	32 (47,1)	10 (14,7)	0,38

N, número de sujetos; wt, wild type; m, mutante; MAF, frecuencia del alelo no funcional.

<sup>a</sup>Uno de los sujetos portaba el alelo *ABCB1* 2677A.

**Tabla 32.** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en 68 trasplantados de riñón tratados con CsA.

Genotipos/Combinación	N	1ª semana	1er mes	5º mes	1er año
Todos	68	52,6 ± 26,7	60,7 ± 26,5	63,2 ± 35,8	62,4 ± 37,6
<i>CYP3A4</i> *1/*1	66	53,3 ± 26,5	61,4 ± 26,3	63,6 ± 35,9	68,3 ± 46,2
“Expresadores” <i>CYP3A5</i>	10	<b>32,5 ± 14,7*</b>	52,6 ± 27,0	51,1 ± 42,9	54,8 ± 44,7
<sup>a</sup> 3 <i>A4</i> *1/3 <i>A5</i> *3	58	55,1 ± 3,8	64,2 ± 4,6	67,6 ± 5,9	64,5 ± 6,3
3 <i>A4</i> *1/3 <i>A5</i> *1	8	35,8 ± 6,1	56,1 ± 10,2	50,5 ± 17,4	58,9 ± 17,6
<sup>a</sup> 3 <i>A4</i> *1 <i>B</i> /3 <i>A5</i> *1	2	24,2 ± 11,7	40,3 ± 17,6	53,3 ± 31,3	40,3 ± 20,1

<sup>a</sup>Por la existencia del desequilibrio de ligamiento, los valores para los que no expresaron el *CYP3A5* fue idéntico a aquellos que portaban la combinación *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3. Del mismo modo, todos los pacientes que portaban el alelo variante *CYP3A4*\*1*B* también portaban *CYP3A4*\*1*B*/*CYP3A5*\*1.

\**p*<0,05 vs. pacientes que no expresan *CYP3A5* (*CYP3A5*\*3/\*3 o *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3).

**Tabla 33.** Efecto de los genotipos y las combinaciones de *CYP3A4*/*CYP3A5* en los niveles de CsA corregidos por dosis (ng/ml por mg/día por Kg de peso corporal) a lo largo del estudio.

Genotipo	N	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
Todos	68	8,1 ± 2,0	6,5 ± 1,9	4,5 ± 1,5	3,6 ± 1,2
<i>CYP3A4</i> *1/*1	66	<b>8,0 ± 2,0<sup>a*</sup></b>	<b>6,4 ± 1,7<sup>a*</sup></b>	<b>4,5 ± 1,5<sup>a*</sup></b>	3,4 ± 1,2
“Expresadores” <i>CYP3A5</i>	10	8,2 ± 2,8	7,1 ± 2,7	5,8 ± 2,4	4,3 ± 1,8
<sup>c</sup> <i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *3	58	8,1 ± 1,9	6,5 ± 1,7	4,3 ± 1,2	3,5 ± 1,0
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *1	8	7,6 ± 2,5	6,5 ± 2,4	5,5 ± 2,6	4,3 ± 1,8
<sup>c</sup> <i>3A4</i> *1 <i>B</i> / <i>3A5</i> *1	2	<b>12,2 ± 1,5<sup>b*</sup></b>	<b>9,6 ± 3,0<sup>b*</sup></b>	<b>6,7 ± 1,5<sup>b**</sup></b>	4,3 ± 2,1

<sup>a</sup>p valores vs. portadores de *CYP3A4*\*1*B*

<sup>b</sup>p valores vs. la combinación más común *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3.

<sup>c</sup>Por la existencia de desequilibrio de ligamiento, los valores para los que no expresaban el *CYP3A5* fueron idénticos a aquellos mostrados para la combinación *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3. Del mismo modo, todos los pacientes que portaban el alelo no funcional *CYP3A4*\*1*B* también eran portadores de la combinación *CYP3A4*\*1*B*/*CYP3A5*\*1.

\*p<0,05; \*\*p<0,01

**Tabla 34.** Efecto de los genotipos *CYP3A4* y *CYP3A5* en los requerimientos de dosis de CsA (mg/kg/día) en los cuatro puntos de tiempo considerados.

Genotipo/Combinación	Estado de C <sub>0</sub>	1 <sup>a</sup> semana	*p	1 <sup>er</sup> mes	*p	5 <sup>o</sup> mes	*p	1 <sup>er</sup> año	*p
<i>CYP3A5*3/*3</i>	Bajo rango	6,9		5,2		0,00		12,10	
	<sup>a</sup> En rango	41,4	Ref.	62,1	Ref.	34,50	Ref.	55,20	Ref.
	Sobre rango	51,7		32,7		65,50		32,70	
"Expresadores" <i>CYP3A5</i>	Bajo rango	30,0		10,0		10,00		10,00	
	<sup>a</sup> En rango	30,0	0,70	50,0	0,74	30,00	1,00	60,00	1,00
	Sobre rango	40,0		40,0		60,00		30,00	
<i>CYP3A4*1B-CYP3A5*1</i>	Bajo rango	0,0		0,0		0,00		0,00	
	<sup>a</sup> En rango	100,0	0,18	100,0	0,53	50,00	1,00	100,00	0,50
	Sobre rango	0,0		0,0		50,00		0,00	
<i>CYP3A4*1-CYP3A5*1</i>	Bajo rango	37,5		12,5		12,50		12,50	
	<sup>a</sup> En rango	25,0	0,46	50,0	0,70	25,00	0,71	62,50	0,74
	Sobre rango	37,5		37,5		62,50		25,00	

\*los valores de p fueron calculados teniendo como referencia el número de pacientes en rango terapéutico que no expresaban el *CYP3A5* en los cuatro momentos distintos del estudio.

<sup>a</sup>Rango terapéutico: 150-400 ng/ml los dos primeros meses y 100-200 ng/ml a partir del tercer mes.

**Tabla 35.** Proporción (%) de pacientes en el rango de concentraciones valle (C<sub>0</sub>) diana de CsA según su genotipo de *CYP3A4* y *CYP3A5* en distintos momentos postrasplante del estudio.

#### 4.2.4. Efecto de los genotipos/haplotipos *ABCB1* en la exposición del paciente a CsA y sobre sus requerimientos de dosis

Los polimorfismos del *ABCB1* no se encontraron asociados a parámetros farmacocinéticos en la población de estudio, ni hubo diferencias significativas entre los principales haplotipos del *ABCB1* (1236-2677-3435), el wild type CGC (frecuencia = 0,50) y el no funcional TTT (frecuencia = 0,32) (datos no mostrados). Sólo cuando los datos se volvieron a analizar en un subgrupo de 58 pacientes que no expresaban el CYP3A5 (para eliminar el posible sesgo debido al alelo funcional CYP3A5), se observó que los pacientes que eran homocigotos para el SNP C3435T y también aquellos que llevaban de 4 a 6 alelos variantes en los tres loci estudiados tenían valores de  $C_0/D$  significativamente más bajos en comparación con, respectivamente, los portadores del genotipo *ABCB1* 3435CC ( $39,1 \pm 12,0$  vs.  $65,5 \pm 29,5$ ,  $p = 0,04$ ) y para los que tenían de 0 a 3 variantes ( $41,7 \pm 14,0$  vs.  $59,3 \pm 26,2$ ,  $p = 0,01$ ) una semana después del trasplante (Tabla 36).

#### 4.2.5. Asociación de polimorfismos con parámetros farmacodinámicos

La función renal, medida como ACr, no varió de manera relevante atendiendo a los genotipos o haplotipos estudiados (Tablas 16 y 17). Los portadores de los alelos *CYP3A4\*1B* y/o *CYP3A5\*1* sí presentaban menores valores de ACr (Tabla 37) pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Con respecto a los efectos adversos inducidos por CsA, 18 pacientes (26,5%) experimentaron nefrotoxicidad relacionada con CsA durante el período de estudio, ocho (11,8%) mostraron neurotoxicidad y 22 (32,3%) desarrollaron HG. Trece pacientes (19,1%) sufrieron rechazo agudo de acuerdo con los criterios de diagnóstico que se describen en la sección de Métodos.

Genotipos <i>ABCB1</i>	N	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
3435CC	16	65,5 ± 29,5	68,6 ± 26,4	87,5 ± 50,1	82,2 ± 52,5
3435CT	28	55,6 ± 23,1	65,6 ± 30,8	55,6 ± 21,6	47,6 ± 18,8
3435TT	14	<b>39,1 ± 12,0<sup>a</sup></b>	56,2 ± 1,7	62,3 ± 23,0	65,2 ± 28,7
2677GG	20	63,3 ± 27,8	62,1 ± 27,3	78,7 ± 49,0	76,3 ± 50,8
2677GT	27	52,4 ± 24,9	70,1 ± 30,3	57,5 ± 23,9	49,1 ± 19,4
2677TT	11	43,5 ± 9,3	52,9 ± 11,5	68,4 ± 22,2	69,4 ± 30,4
1236CC	22	63,0 ± 27,1	61,2 ± 27,1	78,4 ± 48,2	75,0 ± 49,7
1236CT	26	51,3 ± 26,0	71,4 ± 30,3	54,5 ± 21,8	48,5 ± 19,1
1236TT	10	46,2 ± 11,6	52,9 ± 11,5	70,2 ± 21,2	69,4 ± 30,4
C1236T-G2677T/A- C3435T					
0-3 alelos variantes	43	59,3 ± 26,2	66,7 ± 28,7	68,8 ± 39,9	64,2 ± 41,9
4-6 alelos variantes	15	<b>41,7 ± 14,0<sup>*</sup></b>	56,2 ± 19,7	64,4 ± 22,7	65,2 ± 28,7

<sup>\*</sup>p < 0,05; <sup>a</sup>p valores vs. portadores de *ABCB1* 3435CC.

**Tabla 36.** Efecto de genotipos *ABCB1* sobre concentraciones valle de CsA ajustadas por dosis en pacientes que no expresan *CYP3A5* (n = 58).

SNPs/Combinación	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<i>CYP3A5</i> *3				
*3/*3	54,5 ± 20,4	56,9 ± 20,6	69,5 ± 22,0	72,2 ± 23,2
*1/*1 + *1/*3	48,8 ± 15,9	45,6 ± 12,1	56,4 ± 10,6	57,2 ± 9,7
<i>CYP3A4</i> *1B				
*1A/*1A	53,7 ± 19,8	55,8 ± 19,8	68,3 ± 21,1	70,6 ± 22,4
*1A/*1B + *1B/*1B	43,3 ± 13,2	37,6 ± 20,3	47,0 ± 5,9	50,5 ± 4,5
<i>CYP3A4-CYP3A5</i>				
*1/*1-*/3	54,5 ± 20,4	56,9 ± 20,6	69,5 ± 22,0	72,2 ± 23,2
*1/*1B-*/3	49,7 ± 17,2	47,9 ± 9,9	59,1 ± 10,3	59,2 ± 10,1
*1B/*1B-*/3	43,3 ± 13,2	37,6 ± 20,3	47,0 ± 5,9	50,5 ± 4,5

**Tabla 37.** Valores de aclaramiento de creatinina en función de los genotipos o combinaciones del *CYP3A4/CYP3A5* en 68 pacientes trasplantados renales tratados con CsA.

SNPs/Haplotipos ABCB1	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<i>ABCB1</i> C1236T				
CC	51,3 ± 13,7	52,7 ± 16,5	64,2 ± 18,7	66,6 ± 23,1
CT	56,7 ± 23,4	57,4 ± 23,8	69,9 ± 23,4	71,0 ± 22,4
TT	49,2 ± 23,9	55,9 ± 16,8	71,0 ± 22,1	76,8 ± 20,4
<i>ABCB1</i> G2677T/A				
GG	51,5 ± 13,4	53,4 ± 16,4	63,4 ± 19,9	64,6 ± 24,0
GT/GA	58,1 ± 23,4	56,4 ± 23,9	70,5 ± 23,3	74,4 ± 22,2
TT/AA	47,7 ± 23,3	56,5 ± 17,9	69,7 ± 18,4	70,5 ± 17,8
<i>ABCB1</i> C3435T				
CC	53,0 ± 14,8	54,2 ± 17,7	63,2 ± 21,2	64,9 ± 23,1
CT	55,8 ± 22,1	57,1 ± 22,9	71,3 ± 21,9	74,4 ± 23,3
TT	48,7 ± 21,7	53,0 ± 17,5	66,4 ± 19,5	67,8 ± 18,6
<i>Haplotipos extremos</i>				
CGC	53,3 ± 15,5	54,2 ± 19,3	63,6 ± 22,9	64,9 ± 24,7
TTT	40,3 ± 15,3	53,6 ± 16,9	68,0 ± 22,2	74,0 ± 20,3
<i>Variantes en los 3 loci</i>				
0-3 variantes	53,7 ± 18,7	56,0 ± 20,6	66,8 ± 21,6	69,3 ± 23,3
4-6 variantes	52,7 ± 23,6	54,3 ± 17,6	68,2 ± 19,9	69,8 ± 19,4

**Tabla 38.** Valores de aclaramiento de creatinina en función de los genotipos o haplotipos del *ABCB1* (C1236T-G2177T/A-C3435T) en 68 pacientes trasplantados renales tratados con CsA.

En este apartado se observó de manera más importante que el genotipo *ABCB1* 3435TT aumentaba el riesgo de nefrotoxicidad [OR (IC) = 4,2 (1,3-13,9),  $p = 0,02$ ] en análisis realizados considerando un modelo recesivo de herencia (3435CC + CT vs. portadores TT). Además, aquellos pacientes que portaban de 4 a 6 alelos variantes en los tres loci *ABCB1* presentaban 3,6 veces más riesgo de sufrir nefrotoxicidad que los pacientes que llevaban solamente de 0 a 3 variantes, aunque la relación estaba en el límite de la significación estadística ( $p = 0,05$ ; Tabla 39).

Con respecto al desarrollo de HG, además de una tendencia hacia una mayor susceptibilidad en los portadores de genotipos *ABCB1* homocigotos mutantes (Tabla 39); los sujetos con 4-6 alelos variantes tenían un riesgo significativamente mayor de que surgiera este efecto adverso [OR (IC) = 3,29 (1,1-10,3),  $p = 0,04$ ; Tabla 39].

Genotipos <i>ABCB1</i>	Nefrotoxicidad					Hiperplasia gingival			
	N	Sí, N (%)	No, N (%)	OR <sup>a</sup>	p	Sí, N (%)	No, N (%)	OR <sup>a</sup>	p
1236CC+CT	58	14 (77,8)	44 (88)	Ref.		17 (73,9)	41 (91,1)	Ref.	
1236TT	10	4 (22,2)	6 (12)	2,09 (0,5 -8,5)	0,24	6 (26,1)	4 (8,9)	3,30 (0,7 – 14,1)	0,11
2677GG+GT	56	13 (72,2)	43 (86)	Ref.		16 (66,7)	38 (86,4)	Ref.	
2677TT	12	5 (27,8)	7 (14)	2,36 (0,6 – 8,7)	0,17	8 (33,3)	6 (13,6)	3,23 (0,8 – 12,4)	0,08
3435CC+CT	52	10 (55,6)	42 (84,0)	Ref.		15 (65,2)	37 (82,2)	Ref.	
3435TT	16	8 (44,4)	8 (16,0)	<b>4,2 (1,3 – 13,9)</b>	<b>0,02</b>	8 (34,8)	8 (17,8)	2,83 (0,8 – 9,8)	0,10
C3435T-G2677T/A-C1236T									
0-3 variantes	51	10 (55,6)	41 (82,0)	Ref.		13 (59,1)	38 (82,6)	Ref.	
4-6 variantes	17	8 (44,4)	9 (18,0)	<b>3,6 (1,1 – 11,8)</b>	<b>0,05</b>	9 (40,9)	8 (17,4)	<b>3,29 (1,1 - 10,3)</b>	<b>0,04</b>

<sup>a</sup>Valores de Odds ratio con un intervalo de confianza del 95%.

**Tabla 39.** Efecto de los distintos genotipos y combinaciones de alelos variantes *ABCB1* en la incidencia de nefrotoxicidad e hiperplasia gingival inducida por CsA (Sí/No).



#### 4.2.6. Resumen de resultados del estudio II

- El alelo *CYP3A5\*1* disminuye la exposición del paciente a la CsA en un promedio del 41% durante la primera semana tras el trasplante.
- El alelo *CYP3A4\*1B* aumenta los requerimientos de dosis independientemente del *CYP3A5\*1* (un promedio del 32% a lo largo del estudio).
- El genotipo *ABCB1* 3435TT disminuye un 40,3% la exposición del paciente a la CsA en la primera semana postrasplante y aumenta más de 4 veces el riesgo de sufrir un evento nefrotóxico.
- Los pacientes con más alelos variantes en *ABCB1* tienen el triple de riesgo de sufrir nefrotoxicidad o de hiperplasia gingival.

### 4.3. ESTUDIO III: ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA CON DISFUNCIÓN DEL INJERTO

La mayoría de los participantes en este tercer estudio estaban incluidos también en los dos trabajos anteriores. En la Tabla 40 se presentan las características clínicas de los 166 trasplantados que se analizaron. No se observaron diferencias en los diferentes resultados medidos con respecto al inmunosupresor utilizado (datos no mostrados).

Parámetro	
Sexo (masculino/femenino)	98/68
Edad del trasplantado (años)	45,7 ± 17,1
Enfermedad renal primaria	
Glomerulonefritis	61 (36,7)
Nefritis intersticial crónica	21 (12,7)
Enfermedad renal poliquística	18 (10,8)
Incierta	48 (28,9)
Otras <sup>a</sup>	18 (10,8)
Tipo de diálisis (hemodiálisis/peritoneal)	115 (69,3) / 51 (30,7)
Duración de la diálisis antes del trasplante (meses)	39,9 ± 33,3
Edad del donante (años)	43,8 ± 18,4
Nº del trasplante (primero/segundo/tercero)	156 (94,0) / 9 (5,4) / 1 (0,6)
Tiempo de isquemia fría (horas)	17,4 ± 5,6
Total de Incompatibilidades HLA	2.93 ± 1,08
Máxima actividad de PRA > 50%	12 (7,2)
Terapia de inducción <sup>b</sup>	38 (22,9)

PRA, panel de anticuerpos citotóxicos anti-HLA reactivos.

<sup>a</sup>Otras causas: nefropatía, síndrome de Alport, síndrome hemolítico urémico, nefroangioesclerosis, nefronoptisis y nefropatía isquémica.

<sup>b</sup>Pacientes tratados con anticuerpos frente al receptor de la IL-2.

**Tabla 40.** Características de los pacientes y parámetros relacionados con el trasplante en 166 pacientes. Los datos se muestran como número (porcentaje) o media ± desviación estándar.

#### 4.3.1. Distribución de genotipos en la población de estudio

En este estudio, que engloba a pacientes en tratamiento tanto con tacrolimus como con CsA, además de analizar los polimorfismos ya comentados de los genes *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1*, se analizaron SNPs en los genes *CYP2C8* y al *CYP2J2*. Como se ha descrito en la introducción, estos dos genes son los principales responsables en el riñón (y en otros tejidos) de la síntesis de EETs, metabolitos del AA con propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y profibrinolíticas, lo cual hace pensar que estos genes y sus variantes más comunes pueden ser buenos candidatos en estudios de procesos dañinos que ocurren a nivel local en el riñón y que pueden derivar, por ejemplo, en la disfunción del injerto. La Tabla 41 muestra la frecuencia de los siete polimorfismos estudiados (*CYP3A4*\*1*B*, *CYP3A5*\*3, *CYP2C8*\*3, *CYP2J2*\*7 y *ABCB1* C3435T, G2677T/A y C1236T). Las frecuencias de alelos en la población de estudio estaban todos en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$  en todos los casos).

Todos los sujetos que llevaban el alelo no funcional *CYP3A4*\*1*B* también albergaban, al menos, un alelo wild type *CYP3A5*\*1 debido al desequilibrio de ligamiento parcial que se encontró entre los polimorfismos *CYP3A4*\*1*B* y *CYP3A5*\*3 ( $D' = 0,99$ ,  $r^2 = 0,35$ ).

Polimorfismo	wt/wt, N (%)	wt/m, N (%)	m/m, N (%)	MAF
<i>CYP2C8</i> *1/*3	113 (67,8)	50 (30,4)	3 (1,8)	0,17
<i>CYP2J2</i> *1/*7	160 (96,5)	5 (2,9)	1 (0,6)	0,02
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	159 (95,9)	6 (3,5)	1 (0,6)	0,02
<i>CYP3A5</i> *1/*3	2 (1,2)	18 (10,9)	146 (87,9)	0,07
<i>ABCB1</i> C3435T	49 (29,8)	80 (48)	37 (22,2)	0,46
<i>ABCB1</i> G2677T/A	63 (37,9)	77 (46,9)	26 (15,7)	0,38
<i>ABCB1</i> C1236T	58 (35,1)	82 (49,1)	26 (15,8)	0,40

N, número de sujetos; wt, wild type; m, mutante; MAF, frecuencia del alelo menor (*Minor Allele Frequency*)

**Tabla 41.** Distribución de frecuencias alélicas y genotípicas de los SNPs estudiados en 166 pacientes trasplantados renales.

#### 4.3.2. Estudio de asociación de polimorfismos con parámetros y eventos relacionados con la función del injerto

Se produjo RFR en 49 de los 166 pacientes trasplantados (29,5%) y se encontró que éste estaba asociado a la presencia del alelo *CYP2C8\*3* [OR = 2,01 (1,1-4,1),  $p = 0,04$ ; vs. portadores de *CYP2C8\*1/\*1*].

Entre los factores no genéticos, se encontró que una edad más avanzada, tanto del receptor como del donante estaba relacionada con una mayor incidencia de RFR. La edad media de los receptores con y sin RFR fue  $51,6 \pm 13,2$  y  $43,0 \pm 14,3$  años ( $p < 0,001$ ), respectivamente. La media de edad del donante en los grupos de pacientes con y sin RFR fue  $53,7 \pm 13,9$  y  $39,8 \pm 18,5$  años, respectivamente [OR teniendo un donante de más de 48 años de edad = 5,14 (2,41-10,96),  $p < 0,0001$ ]. Cuando se llevó a cabo el análisis de regresión introduciendo covariables adicionales (ver Métodos), el efecto del *CYP2C8\*3* se incrementó [OR = 2,42 (1,09-5,37),  $p = 0,03$ ], mientras que sólo la edad del donante mayor de 48 años conservó su importancia como un factor de riesgo no genético [OR = 4,29 (1,82-10,12),  $p = 0,001$ ].

En cuanto a la función renal, medida por ACr, los pacientes, lógicamente, mostraron un aumento de dicho ACr de  $55,7 \pm 25,1$  ml/min en la primera semana a  $76,2 \pm 33,5$  ml/min un año después del injerto. Sin embargo, los sujetos portadores del alelo no funcional *CYP2C8\*3* (genotipos *\*1/\*3* o *\*3/\*3*) mostraron, de manera persistente, valores de ACr inferiores a los obtenidos en los portadores del genotipo *CYP2C8\*1/\*1* en el período de estudio, con diferencias a un mes, cinco meses y un año después del trasplante que alcanzaron significación estadística (Tabla 42). El ACr también fue menor en los portadores del alelo *CYP2J2\*7* durante todo el estudio, aunque la asociación no fue estadísticamente significativa. Por último, los portadores de al menos un alelo *CYP3A5\*1* mostraron mayor ACr en comparación con los sujetos *CYP3A5\*3/\*3* con diferencias crecientes en las etapas finales del estudio (Tabla 42). Ninguno de los

diferentes polimorfismos del *ABCB1* estudiados mostró un impacto significativo sobre la función renal (datos no mostrados).

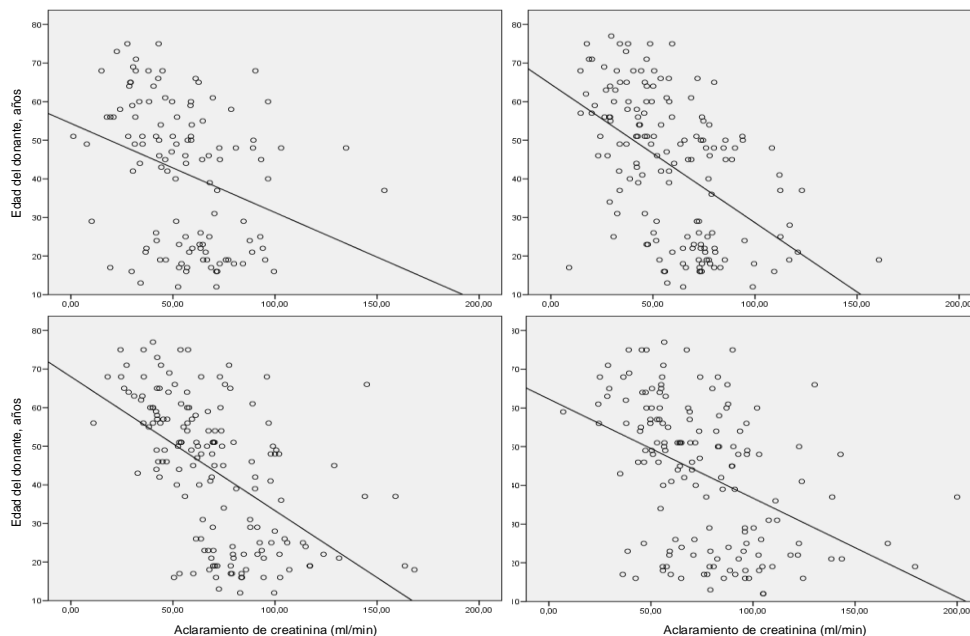
Como en el caso del RFR, una edad mayor tanto del donante como del receptor se correlacionó significativamente con menor ACr a lo largo de todo el período de estudio ( $p$  de Pearson  $<0,001$  en todos los tiempos para las dos variables, excepto en un año por la edad del receptor,  $p = 0,08$ ). (Ver Figuras 11 y 12).

A pesar de las asociaciones descritas, cuando se realizó un modelo estadístico de regresión logística que incluyó a los genotipos *CYP2C8*, *CYP3A5* y *CYP2J2* como covariables genéticas junto a otras variables demográficas y clínicas relevantes (género, edad del donante y receptor, tiempo en diálisis, RFR, RA y nefrotoxicidad inducida por tacrolimus o ciclosporina) se observó que un año después del trasplante sólo la edad del donante estaba todavía altamente relacionada con un menor ACr ( $p < 0,001$ ), mientras que el efecto de *CYP2C8\*3* se quedaba en el límite de la significación estadística ( $p = 0,06$ ).

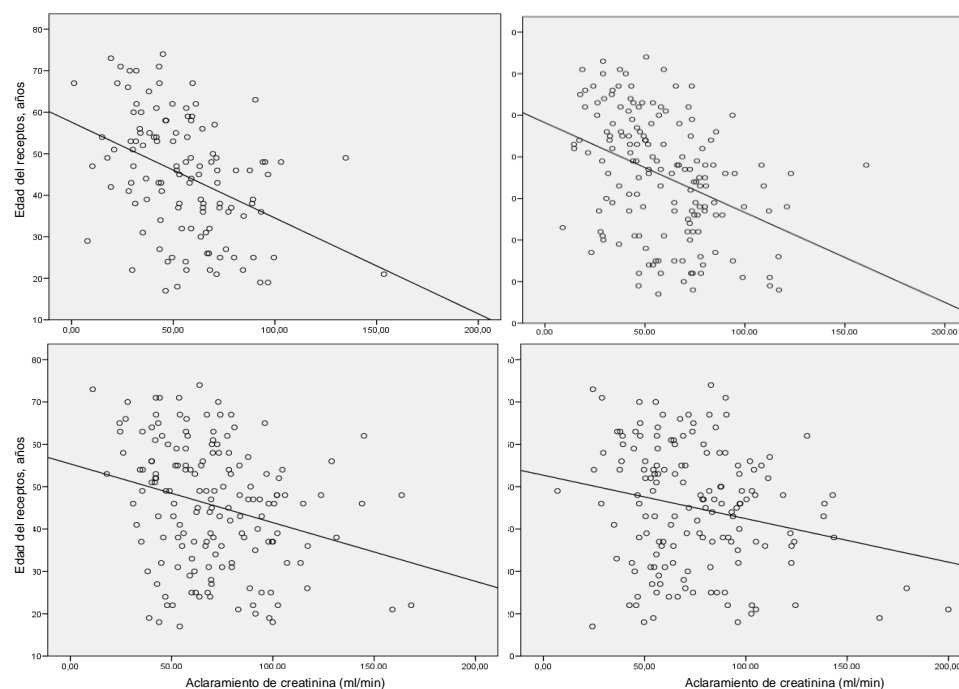
Polimorfismo	N (%)	1ª semana	1 <sup>er</sup> mes	5º mes	1 <sup>er</sup> año
<i>CYP2C8</i> *3					
*1/*1	113 (68,1)	56,5 ± 25,8	61,9 ± 26,7	73,6 ± 30,6	79,6 ± 36,2
*1/*3+*3/*3	53 (31,9)	53,8 ± 23,4	<b>53,1 ± 23,3*</b>	<b>63,5 ± 22,2*</b>	<b>68,3 ± 24,7*</b>
<i>CYP2J2</i> *7					
*1/*1	160 (96,5)	56,1 ± 24,8	59,5 ± 26,0	71,3 ± 28,5	76,8 ± 33,7
*1/*7+*7/*7	6 (3,5)	45,4 ± 35,7	48,1 ± 24,2	48,4 ± 21,3	58,8 ± 21,9
<i>CYP3A5</i> *3					
*3/*3	146 (87,9)	55,3 ± 25,9	50,6 ± 23,6	56,1 ± 26,5	59,1 ± 24,1
*1/*1+*1/*3	20 (12,1)	55,7 ± 25,2	60,6 ± 26,2	<b>72,6 ± 28,6*</b>	<b>79,2 ± 34,3**</b>
<i>CYP3A4</i> *1B					
*1/*1	159 (95,9)	55,4 ± 25,1	59,7 ± 48,4	71,1 ± 28,1	77,2 ± 33,7
*1/*1B+*1B/*1B	7 (4,1)	63,2 ± 27,4	48,4 ± 27,5	55,8 ± 35,5	50,8 ± 10,7

N, número de sujetos. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

**Tabla 42.** Asociaciones de los polimorfismos del *CYP450* con el aclaramiento de creatinina (ml/min) en los cuatro puntos temporales considerados tras el trasplante.



**Figura 11.** Correlación de la edad del donante con el ACr. De izquierda a derecha y de arriba abajo: 1 semana, 1 mes, 5 meses y un año ( $p < 0,001$  en todos los casos).



**Figura 12.** Correlación de la edad del receptor con el ACr. De izquierda a derecha y de arriba abajo: 1 semana, 1 mes, 5 meses y un año ( $p < 0,001$  en todos los casos, excepto al año tras el trasplante,  $p = 0,08$ ).

#### 4.3.3. Asociación de polimorfismos con nefrotoxicidad inducida por inmunosupresores anticalcineurínicos

De los 166 receptores de trasplante renal, 35 (21,1%) desarrollaron nefrotoxicidad inducida por ICN durante el período de estudio. Ninguno de los polimorfismos del citocromo P450 se asoció con nefrotoxicidad. En cambio, el análisis de polimorfismos *ABCB1* reveló que los portadores de 3435TT tenían un moderado mayor riesgo de desarrollar nefrotoxicidad en comparación con los sujetos homocigotos wild type 3435CC [OR = 2,26 (0,9-6,0)] (Tabla 43). Después de volver a analizar los datos mediante un modelo recesivo, es decir, TT vs. CC + portadores CT, la significación estadística de la asociación se incrementó [OR = 2,70 (1,2-6,13),  $p = 0,02$ ]. A fin de evaluar colectivamente el efecto de los polimorfismos *ABCB1*, se comparó el número total de variantes alélicas que hay conjuntamente en las tres posiciones estudiadas (1236, 2177 y 3435) y se encontró que los pacientes que llevaban de 4 a 6 variantes eran significativamente más frecuentes en el grupo con nefrotoxicidad, en comparación con los pacientes que llevaban solamente de 0 a 3 variantes [OR = 2,38 (1,1-5,4),  $p = 0,03$ ] (Tabla 43). Entre los parámetros no genéticos sólo la mayor edad del donante se asoció con una mayor incidencia de nefrotoxicidad inducida por ICN (los valores medios de edad para los pacientes con y sin nefrotoxicidad fueron, respectivamente,  $52,0 \pm 14,7$  y  $41,4 \pm 18,8$  años;  $p = 0,001$ ).

Para profundizar en este análisis, el número de variantes alélicas del conjunto de los 3 loci del *ABCB1* analizados fue incluido en un modelo de regresión logística binaria, junto con los parámetros demográficos y clínicos (ver Métodos) para evaluar el potencial de estas variables como factores de riesgo. La edad mayor del donante se asoció de nuevo con nefrotoxicidad [OR = 1,03 (1,01-1,06),  $p = 0,038$ ], mientras que el efecto de los alelos variantes de *ABCB1* disminuyó [OR = 2,31 (0,92-5,81),  $p = 0,07$ ].



#### 4.3.4. Asociación de polimorfismos con el riesgo de rechazo agudo

Veintinueve pacientes (17,5%) experimentaron RA de acuerdo con los criterios de diagnóstico que se describen en la sección de Métodos. Se observó una tendencia hacia un mayor riesgo en los portadores del alelo *CYP2C8\*3*. Doce pacientes (42,9%) eran portadores del alelo variante *CYP2C8\*3* en el grupo de RA, en comparación con sólo el 29,7% (N = 41) de portadores de *2C8\*3* en el grupo de pacientes sin rechazo [OR = 1,8 (0,8-4,1), p = 0,103]. Además, la edad del donante se asoció significativamente con la incidencia del RA. La edad del donante media en el grupo de pacientes que sufrieron un RA fue de  $49,9 \pm 15,6$  años frente a  $42,6 \pm 18,7$  años en los 137 pacientes restantes (p = 0,04). Sin embargo, la significación estadística de la relación con la edad del donante y *CYP2C8\*3* se perdió después de aplicar un modelo de regresión logística incluyendo otras variables clínicas (ver Métodos). Sólo el RFR pudo ser identificado como un factor de riesgo significativo para el RA [OR = 7,75 (2,67-22,47), p <0,001].

Polimorfismo	Genotipo	Nefrotoxicidad, N (%)	No nefrotoxicidad, N (%)	OR (IC)	p
C3435T	C/C	11 (29,7)	40 (31,0)	Referencia	<b>0,05</b>
	C/T	12 (32,4)	66 (51,2)	0,74 (0,3-1,9)	
	T/T	14 (37,8)	23 (17,8)	2,26 (0,9-6,0)	
G2677T/A <sup>a</sup>	G/G	15 (41,7)	49 (38,3)	Referencia	0,24
	G/T	13 (36,1)	61 (47,7)	0,63 (0,3-1,5)	
	T/T	8 (22,1)	18 (14,1)	1,51 (0,5-4,2)	
C1236T	C/C	16 (43,2)	44 (34,1)	Referencia	0,35
	C/T	14 (37,8)	66 (51,2)	0,59 (0,-1,3)	
	T/T	7 (18,9)	19 (14,7)	1,08 (0,4-3,1)	
<i>Nº de variantes en los 3 loci</i>	0-3	22 (59,5)	102 (79,1)	Referencia	<b>0,03</b>
	4-6	15 (40,5)	27 (20,9)	<b>2,38 (1,1-5,4)</b>	

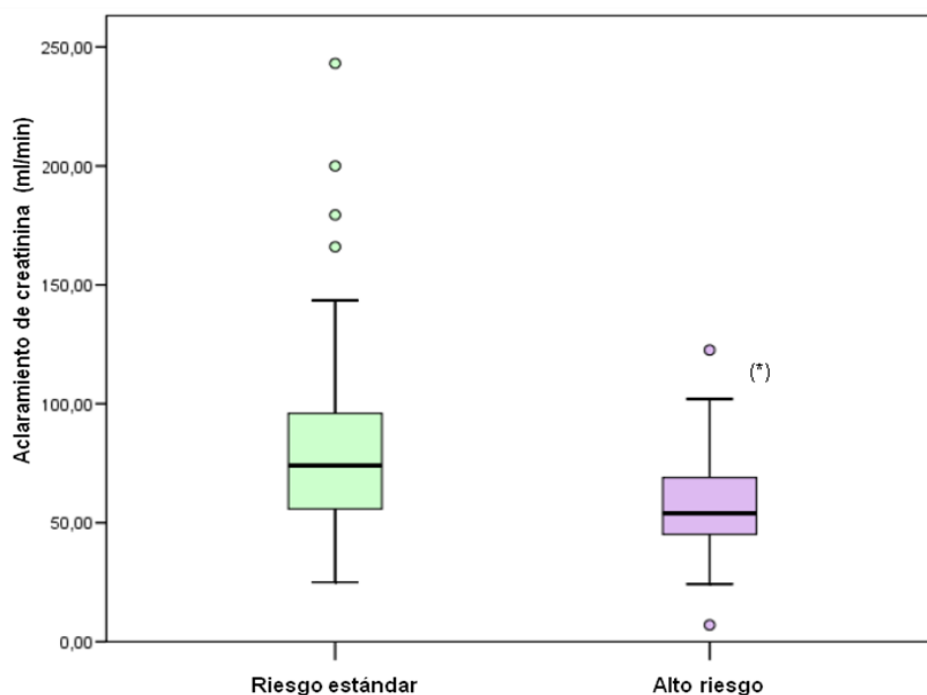
OR, Odds ratio con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

<sup>a</sup>Dos sujetos con el genotipo 2677A fueron excluidos de este análisis.

**Tabla 43.** Efecto de los genotipos *ABCB1* en la incidencia de Nefrotoxicidad inducida por Inhibidores de la calcineurina.

#### 4.3.5. Identificación de un marcador de riesgo para eventos desfavorables tras el trasplante

La población de estudio se estratificó según los factores de riesgo más relevantes para la disfunción del injerto identificados en los análisis anteriores: el *CYP2C8\*3* y la edad del donante. Los pacientes fueron divididos en (i) un grupo de posible *alto riesgo* que comprendía aquellos individuos portadores del alelo *CYP2C8\*3* y que recibieron un riñón de un donante de más de 48 años de edad, y (ii) un grupo de *riesgo estándar* con el resto de sujetos. En un modelo estadístico que incluyó covariables genéticas y no genéticas adicionales (ver Métodos), el estatus de alto riesgo fue la única variable que mostró una asociación significativa ( $p = 0,035$ ) con un menor valor del aclaramiento de creatinina un año después de recibir el injerto (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto del estatus de alto riesgo (llevar el alelo *CYP2C8\*3* y recibir un riñón de un donante mayor de 48 años) en el ACr un año después del trasplante. \* $p = 0,035$ .

La Tabla 44 (página siguiente) muestra los valores de OR obtenidos por regresión logística binaria para los dos grupos de riesgo en relación con los diferentes resultados clínicos medidos. En particular, la situación de alto riesgo mostró una fuerte asociación con el RFR [OR = 4,15 (1,53-11,30),  $p < 0,01$ ]. Las asociaciones con la nefrotoxicidad inducida por el ICN y el RA no alcanzaron significación estadística (Tabla 44).

#### 4.3.6. Resumen de resultados del Estudio III

- Nuestros resultados muestran que el portar el alelo no funcional *CYP2C8\*3* duplica el riesgo de sufrir RFR.
- El portar el alelo no funcional *CYP2C8\*3* disminuye en un 12% la función renal medida como aclaramiento de creatinina a lo largo del estudio.
- El recibir un riñón de un donante de más de 48 años conlleva un riesgo 4 veces mayor de sufrir RFR; también disminuye el aclaramiento de creatinina y aumenta la probabilidad de RA.
- Tener 4 o más alelos variantes en los loci estudiados del *ABCB1* aumenta el riesgo de sufrir nefrotoxicidad.
- La presencia de *CYP2C8\*3* junto a tener un donante de más de 48 años aumenta la probabilidad de disfunción del injerto.

Grupo	N	RFR	No RFR	OR (IC) <sup>a</sup>	p	NTICN	No NTICN	OR	p	RA	No RA	OR	p
Riesgo estándar	142	37 (71,4)	107 (91,5)	Ref.		27 (77,1)	115 (87,8)	Ref.		22 (75,8)	120 (87,6)	Ref.	
Alto riesgo	24	14 (28,6)	10 (8,5)	<b>3,91 (1,5-10,5)</b>	<b>&lt; 0,01</b>	8 (22,9)	16 (12,2)	1,59 (0,5-4,6) <sup>b</sup>	0,397	7 (24,2)	17 (12,4)	1,83 (0,6-5,9)	0,316

Se muestra el número de sujetos y porcentajes (en paréntesis).

N, número de sujetos; RFR, retraso de la función renal; NTICN, nefrotoxicidad inducida por inmunosupresores anticalcineurínicos; RA, rechazo agudo.

<sup>a</sup>Los valores de Odds ratio con un intervalo de confianza del 95% [OR (IC)] fueron calculados por regresión logística binaria incorporando variables demográficas, clínicas y genéticas mencionadas en la sección de Pacientes y Métodos.

<sup>b</sup>El modelo utilizado para calcular el OR para la nefrotoxicidad inducida por ICN incluyó al número total de variantes del *ABCB1* (0-3 vs. 4-6) así como los otros parámetros descritos en la sección de Pacientes y Métodos.

**Tabla 44.** Asociación de los eventos clínicos desfavorables con el riesgo conferido por la edad del donante mayor de 48 años y la presencia del alelo *CYP2C8\*3*.

## **5. DISCUSIÓN**

En la última década se está prestando especial atención a la dotación genética del paciente trasplantado renal, tanto desde el punto de vista de la influencia sobre los fármacos administrados, como del papel que las variantes genéticas pueden desempeñar en la evolución clínica del injerto. Sin embargo, este interés todavía no se ha traducido, al menos a gran escala, en cambios en los protocolos de tratamiento inmunosupresor, ni en un estudio rutinario de las alteraciones genéticas en el paciente trasplantado.

En este trabajo doctoral hemos estudiado esta problemática en nuestra población centrándonos en dos fármacos inmunosupresores, tacrolimus y CsA, frecuentemente utilizados en el trasplante renal, y en dos grupos principales de genes candidatos. El primer grupo, estudiado en las publicaciones adjuntas I y II, engloba, como hemos descrito en secciones anteriores, a genes que participan en el metabolismo y transporte de estos agentes anticalcineurínicos, *CYP3A4*, *CYP3A5* y *ABCB1*. El otro grupo de genes analizados en la tercera publicación adjunta (*CYP2C8* y *CYP2J2*) interviene, como ya se ha dicho, en la síntesis de EETs vasoactivos y antiinflamatorios, que juegan un papel protector en situaciones de estrés vascular o en lesiones de isquemia-reperfusión como las que se pueden producir tras la reoxigenación de un injerto trasplantado (Paller y Jacob 1994; Fisslthaler y cols. 2001; Alkayed y cols. 2002). Es cuando menos sorprendente que, dada la función de estos metabolitos del araquidónico, el papel de los genes que determinan los niveles de EETs en el trasplante renal esté todavía prácticamente inexplorado. Es lógico pensar que si existieran polimorfismos en las enzimas que catalizan la producción de EETs, podría disminuir su síntesis y aumentar consecuentemente el riesgo a sufrir una disfunción del injerto. De hecho, hay estudios clínicos que relacionan a estos polimorfismos con una mayor incidencia de isquemia cerebral, hipertensión y otras enfermedades vasculares (Gainer y cols. 2005; Deng y cols. 2010; Fava y cols. 2012).

Como se puede ver en la primera de las publicaciones adjuntas, los hallazgos en nuestra población confirman datos previos que indicaban que los pacientes trasplantados renales que son portadores del alelo *CYP3A5\*1* muestran  $C_0/D$  más bajos y requerimientos de dosis más altos de tacrolimus. En general, la media de  $C_0/D$  en pacientes que expresaban *CYP3A5* fue un 50% menor que la de los que no expresaban la proteína. Esto es también consistente con estudios previos en los que se habla de un descenso a la mitad de la  $C_0/D$  del tacrolimus (Macphee y cols. 2005; Zhang y cols. 2005; Op den Buijsch y cols. 2007). Los datos disponibles sobre el efecto del SNP *CYP3A4\*1B* son más controvertidos (Hesselink y cols. 2003; Roy y cols. 2006). En nuestro trabajo se observó que la variante *CYP3A4\*1B* se asociaba con  $C_0/D$  más bajos y requisitos de dosis mayores. Sin embargo, el desequilibrio de ligamiento entre los SNPs *CYP3A4* y *CYP3A5* resultó en que todos los portadores *CYP3A4\*1B* también portaban el alelo *CYP3A5\*1*, y por lo tanto, a priori existiría la posibilidad de que el impacto clínico observado podría ser una consecuencia del alelo *CYP3A5\*1* (Op den Buijsch y cols. 2007). Sin embargo, nuestros resultados sugieren lo contrario. Los datos farmacocinéticos eran diferentes dependiendo de la combinación *CYP3A4/CYP3A5*. Los portadores de *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3* presentaron las mayores  $C_0/D$ , seguido de pacientes *3A4\*1/3A5\*1* y luego por portadores de *3A4\*1B/3A5\*1*, lo que indicaría un papel significativo de la *CYP3A4\*1B*. Así mismo, se observó que las diferencias entre los dos grupos de “expresadores” *CYP3A5* (según fueran portadores o no de la variante *CYP3A4\*1B*) aumentaron significativamente con el tiempo. En este sentido, Kuypers et al. encontraron una tendencia similar para las mismas tres combinaciones *CYP3A4-CYP3A5* en 95 receptores de trasplante renal durante un período prolongado de cinco años (Kuypers y cols. 2007). Sin embargo, en el estudio de Kuypers et al., los valores  $C_0/D$  no fueron corregidos por el peso y las diferencias estadísticas entre los dos grupos de “expresadores” *CYP3A5* no fueron probados, lo que hace difícil la comparación con nuestros resultados.



En línea con la mayoría de los estudios (revisado por Staatz et al. (Staatz y cols. 2010)), no se encontraron pruebas de un papel significativo de los SNPs o haplotipos del *ABCB1* en la farmacocinética del tacrolimus. Es posible que los estudios que describen un impacto farmacocinético de los SNPs *ABCB1* pueden de hecho reflejar el efecto de variantes de *CYP3A*. Así, en la mayoría de los estudios se ha observado que el impacto de los SNPs del *ABCB1* se pierde después de eliminar el genotipo *CYP3A5* como factor de confusión (Cheung y cols. 2006; Fredericks y cols. 2006; Loh y cols. 2008), lo cual es coherente con nuestros resultados. Una razón de la tendencia observada en el presente estudio para los requerimientos de dosis más altos en los portadores de 4 a 6 variantes después de controlar por el genotipo *CYP3A5* puede ser la diferente distribución de algunos SNPs *ABCB1* entre “expresadores” y “no expresadores” del *CYP3A5* en nuestra población (por ejemplo, los sujetos 3435TT representaron el 23,7% entre los “no expresadores” mientras que ese genotipo estaba ausente en el grupo “expresador” de *CYP3A5*).

Los resultados de este estudio no apoyan el que los SNPs *CYP3A* o *ABCB1* tengan un papel determinante en el desarrollo de la toxicidad inducida por tacrolimus. A pesar de la fuerte asociación de *CYP3A5\*1* con la farmacocinética de tacrolimus, no hay consenso en cuanto a su papel en la toxicidad por ICN (Hesselink y cols. 2010). De acuerdo con nuestros resultados, la mayoría de los estudios no han logrado encontrar una asociación entre este SNP y disfunción renal (Zheng y cols. 2005; Ferrareso y cols. 2007; Renders y cols. 2007; Hesselink y cols. 2008; Quteineh y cols. 2008; Grenda y cols. 2009; Thervet y cols. 2010; Glowacki y cols. 2011; Metalidis y cols. 2011). Por el contrario, Kuypers et al. encontraron que la toxicidad por ICN estaba relacionada con la presencia del alelo *CYP3A5\*1* en los receptores renales (Kuypers y cols. 2007; Kuypers y cols. 2010). Sin embargo, los autores observaron que los portadores de *CYP3A5\*3* que también tenían requerimientos de dosis más altos eran también más propensos a

desarrollar toxicidad por ICN, lo que probablemente disminuye la importancia de la asociación hallada con el alelo *CYP3A5\*1* (Kuypers y cols. 2010).

Encontramos que el haplotipo *ABCB1* TGC se asoció consistentemente con toxicidad por ICN. Ya que todavía no se ha establecido el impacto preciso de los haplotipos *ABCB1* en la función de la P-gp, sólo podemos especular sobre la explicación de este hallazgo. Podría indicar una acumulación del fármaco debido a la reducción de flujo de salida por la presencia de la variante 3435T. Probablemente el genotipo del donante (que influye en el estado de P-gp en el injerto) sería más revelador sobre este asunto y de hecho hemos dados pasos en este sentido en trabajos recientes (Gervasini y cols. 2015a; Gervasini y cols. 2015b). Hay que señalar como limitación del primer estudio que el protocolo de trasplante seguido en nuestro centro no incluye la realización de biopsias en todos los pacientes con signos de disfunción renal y, por lo tanto, la incidencia real de la toxicidad por ICN podría ser diferente a la recogida.

Hasta donde sabemos, no existen estudios de asociación genética anteriores sobre la neurotoxicidad inducida por tacrolimus en receptores de trasplante renal. Dos estudios en diferentes entornos han encontrado una asociación positiva para los alelos mutantes 2677T (Yamauchi y cols. 2002) y 1236T (Yanagimachi y cols. 2010). Sin embargo, el primer estudio sólo incluyó a 17 pacientes (6 con neurotoxicidad) y ninguno de ellos lleva a cabo análisis de haplotipos. Nuestro estudio muestra resultados opuestos en el sentido de que tanto los genotipos homocigotos de tipo salvaje 2677GG como 1236CC se asociaron a un mayor riesgo de neurotoxicidad en comparación con los portadores del alelo T. No obstante, reconocemos que la importancia clínica de estos hallazgos es probablemente limitada, ya que nuevos análisis utilizando un modelo codominante de herencia no encontraron asociaciones significativas. También se observó una tendencia estadística a menor riesgo de neurotoxicidad en los portadores del haplotipo mutante *ABCB1* TTT. Estos resultados argumentarían en contra de la concepción general de que una P-gp mutada en la barrera hematoencefálica podría

causar una acumulación del fármaco en el cerebro y, por lo tanto, mayor riesgo de neurotoxicidad. Sin embargo, todavía no está claro cómo afectan exactamente estos haplotipos *ABCB1* a la capacidad de transporte de la proteína. Por otra parte, el mecanismo preciso para la neurotoxicidad del tacrolimus sigue siendo desconocido.

En cuanto al RA, de acuerdo con nuestros resultados, la mayoría de los estudios no han podido encontrar una asociación con la presencia de *CYP3A5\*1* a pesar de la baja exposición al tacrolimus producida por este alelo (MacPhee y cols. 2004; Roy y cols. 2006; Kuypers y cols. 2007; Bandur y cols. 2008; Hesselink y cols. 2008; Thervet y cols. 2010; Glowacki y cols. 2011). El efecto de las variantes genéticas *ABCB1* ha sido menos estudiado. Existe un estudio que habla de un moderado aumento del riesgo para el RA en los portadores del haplotipo *ABCB1* (3435-2677-1236)TGC, pero en su análisis incluyó a pacientes tratados con tacrolimus y CsA (Bandur y cols. 2008). Nosotros y otros (Roy y cols. 2006; Glowacki y cols. 2011) no pudimos confirmar la importancia de *ABCB1* en el RA. Sin embargo, el hecho de que se observó una asociación del mismo haplotipo TGC con toxicidad por ICN en este estudio podría ser una indicación de un papel clínico relevante para esta combinación de SNPs en el gen *ABCB1*.

Como hemos comentado al inicio de la discusión, todavía no existe una implementación de los análisis genéticos en el paciente renal en la práctica clínica rutinaria. Sin embargo, ya se están dando los primeros pasos en este sentido. Por ejemplo, un estudio prospectivo en receptores de trasplante renal analizó la eficacia de la administración de una dosis estándar de tacrolimus vs. una dosis ajustada por genotipo *CYP3A5* del paciente. Los autores concluyeron que el grupo con dosis adaptada alcanzó concentraciones diana antes y con menos cambios de dosis (Thervet y cols. 2010). Los resultados de nuestro trabajo apoyan esta conclusión, pero además, sugieren que la determinación adicional del genotipo del SNP *CYP3A4\*1B* probablemente podría hacer los ajustes de dosis más precisos. Por otro lado, tanto nuestros resultados como la percepción general en la literatura indican que esas

diferencias farmacocinéticas apenas se traducen en diferentes resultados clínicos. Hay varias razones que pueden explicar eso. Los trasplantados renales suelen someterse a adaptaciones de dosis en función de las concentraciones obtenidas de forma intensiva en los primeros días después del injerto, lo que, junto con otros factores no genéticos (por ejemplo, dosificación de esteroides, las interacciones medicamentosas, etc.), podría eclipsar el efecto de las variantes genéticas. En segundo lugar, hay nuevos datos que apuntan a otros SNPs además de *CYP3A5\*1* que pueden ser importantes a la hora de determinar los niveles de tacrolimus (de Jonge y cols. 2011; Elens y cols. 2011; Jacobson y cols. 2011). En tercer lugar, el efecto preciso de los SNPs y haplotipos *ABCB1* en la capacidad de transporte de la P-gp aún no se entiende completamente y, por lo tanto, los resultados de los estudios de asociación no tienen una interpretación directa.

El segundo de nuestros estudios se centró en la CsA. Los resultados muestran que los portadores del alelo *CYP3A5\*1* tenían valores de  $C_0/D$  un 41% más bajos que los de los “no expresadores” en la primera semana después del trasplante. Sin embargo, aunque las concentraciones continuaron siendo ligeramente inferiores, las diferencias no fueron significativas en ningún otro momento posterior del estudio. Un efecto similar del alelo de tipo salvaje *CYP3A5\*1* se ha visto en estudios en trasplantados renales previos (Haufrond y cols. 2004), incluso hasta un año después de recibir el injerto (Crettol y cols. 2008). Sin embargo, otros autores no observaron ningún efecto relevante de este alelo en la farmacocinética de la CsA (Anglicheau y cols. 2004; Hesselink y cols. 2004; Bouamar y cols. 2011). Estas discrepancias podrían deberse al distinto origen étnico (Tang y cols. 2010), los diferentes parámetros farmacocinéticos medidos (Hesselink y cols. 2004) o a diferentes concentraciones diana y las dosis iniciales (Azarpira y cols. 2006). Además, Yates et al. (Yates y cols. 2003) sugirieron que la posible vinculación entre los SNPs *CYP3A5\*3* y *ABCB1* podría sesgar los resultados basados únicamente en la determinación de *CYP3A5\*3*.

También encontramos que el genotipo *CYP3A4\*1/\*1* se asoció con un menor requerimiento de dosis de CsA en nuestros pacientes, pero sin afectar a los valores  $C_0/D$ . Una explicación a este hecho podría ser que, debido a que el SNP *CYP3A4\*1B* se encuentra en la región reguladora 5' del gen, éste causaría cambios más probablemente en la expresión de la proteína que en su actividad y, por lo tanto, el impacto sobre las concentraciones en sangre no sería tan notable (Hesselink y cols. 2003). En cualquier caso, el factor de confusión debido al supuesto desequilibrio de ligamiento existente con *CYP3A5\*3* (Op den Buijsch y cols. 2007) y el hecho de que sólo dos sujetos eran portadores del alelo *CYP3A4\*1B* en nuestra población hace que la importancia de este hallazgo sea limitada.

No pudimos confirmar un papel importante de ningún SNP o haplotipo *ABCB1* en la farmacocinética de la CsA. Sin embargo, cuando el análisis se limitó a los “no expresadores” de *CYP3A5* para eliminar el sesgo que resulta de la tendencia observada hacia una menor  $C_0/D$  en los portadores del alelo *CYP3A5\*1*, encontramos asociaciones relevantes. Tanto los sujetos con un mayor número de alelos variantes en los tres loci *ABCB1*, como aquellos con el genotipo 3435TT mostraban niveles de CsA significativamente menores en la primera semana después del trasplante. Las evidencias disponibles sobre el impacto de las variantes genéticas *ABCB1* en la biodisponibilidad de la CsA son muy contradictorias. Nuestros resultados son consistentes con un estudio previo que encontró que los alelos T adicionales correlacionaban con una disminución progresiva de la exposición al fármaco en el postoperatorio inmediato (Foote y cols. 2006). Otros autores también han observado una tendencia hacia valores  $C_0/D$  más bajos en portadores del 3435TT (Hesselink y cols. 2003; Haufroid y cols. 2004). Por el contrario, también hay estudios que se posicionan en contra de un efecto significativo del alelo 3435T o incluso estudios que observaron una asociación con mayores niveles en sangre (Staatz y cols. 2010). Las diferencias en el grado de inhibición de la P-gp entre los estudios debido a las

diferencias en las concentraciones en sangre de CsA podrían explicar estos resultados contradictorios (Staatz y cols. 2010), como lo sería, por ejemplo, el posible papel de la CsA como inhibidor de la P-gp. (Lum y cols. 2000; List y cols. 2001).

El principal hallazgo del segundo trabajo incluido en esta tesis doctoral fue que los SNPs del *ABCB1* mostraron un impacto significativo en la toxicidad relacionada con CsA. A este respecto, un estudio reciente que evaluó 2.724 SNPs en 945 trasplantados renales ha demostrado que los polimorfismos genéticos pueden predisponer a la nefrotoxicidad inducida por CsA (Jacobson y cols. 2012). Encontramos que tanto el genotipo 3435TT como la presencia de 4 o más variantes en los 3 loci *ABCB1* analizados estaban fuertemente asociados con un mayor riesgo de nefrotoxicidad. Esto concuerda con los resultados del estudio de tacrolimus que mostraba mayor nefrotoxicidad en trasplantados con haplotipos que contienen la variante 3435T. Nuestros resultados indicarían una acumulación del fármaco debido a la reducida capacidad de transporte de la P-gp; Sin embargo, las concentraciones sanguíneas mínimas de CsA no se correlacionaron con variantes *ABCB1* en este estudio. Se debe considerar que la P-gp se expresa también en los linfocitos (Klimecki y cols. 1994), diana terapéutica de los ICN, y que, por tanto, la concentración de CsA en las células T también podría contribuir a la toxicidad inducida por el fármaco. Además, una dificultad intrínseca de los estudios de asociación genética en el entorno del trasplante renal es que la nefrotoxicidad causada por estos ICN se produce en el órgano trasplantado, incorporando así el genotipo del donante como una variable adicional (Gervasini y cols. 2015a; Gervasini y cols. 2015b)

Los polimorfismos del *ABCB1* también jugaron un papel importante en la HG inducida por CsA, pues un mayor número de variantes alélicas en los tres loci *ABCB1* analizados se asociaron con un riesgo elevado de este efecto secundario. Hasta la fecha, sólo tres estudios han analizado la influencia de la farmacogenética de la CsA en el desarrollo de HG en trasplantados renales. De forma similar a nuestros resultados, De Iudicibus et al. (De Iudicibus y cols. 2008) encontraron que la variante 3435T

aumentaba el riesgo de HG en pacientes con trasplante, mientras que un estudio anterior de Drozdik sólo encontró un efecto marginal en los heterocigotos *C3435T* pero no para los portadores de los otros genotipos (Drozdik y cols. 2004). En un estudio posterior, otro grupo polaco no pudo reproducir los resultados con respecto al SNP *C3435T* (Grenda y cols. 2009). Hay que señalar, sin embargo, que ninguno de estos tres estudios analizaron los tres principales SNPs *ABCB1* y, por lo tanto, podría haber asociaciones que hubieran pasado desapercibidas. No hay consenso sobre el papel de las concentraciones en sangre de CsA como factor de riesgo de HG, pero una cantidad considerable de publicaciones indican que no parece haber ninguna correlación (Hassell y Hefti 1991; Lowry y cols. 1995; Montebugnoli y cols. 2000; De Iudibus y cols. 2008). Esto explicaría por qué los SNPs del *ABCB1* pueden aumentar la susceptibilidad a la HG sin tener un marcado efecto en la farmacocinética de la CsA, como se ha demostrado en el presente trabajo. Lo más probable es que el síndrome dependería de la condición local del *ABCB1*. La P-gp se expresa en las capas endoteliales de los vasos sanguíneos de la encía (Meisel y cols. 2006), por lo tanto, los polimorfismos funcionales en el gen *ABCB1* podrían provocar la acumulación de CsA en este tejido y, consecuentemente, un aumento de la hipertrofia. Es de destacar que las variantes genéticas del *ABCB1* podrían ser inductoras de procesos inflamatorios (Annese y cols. 2006). Incluso se ha sugerido que diferentes genotipos del *ABCB1* pueden inducir una respuesta inflamatoria modificada para los fármacos en la encía, lo que puede explicar las diferencias individuales en la susceptibilidad a GH inducida por CsA (Meisel y cols. 2006).

De acuerdo con nuestros resultados, estudios previos no han hallado una correlación entre los alelos *CYP3A4\*1B* y *CYP3A5\*1* y la tasa de RA en los trasplantados renales tratados con CsA (von Ahsen y cols. 2001; Eng y cols. 2006; Grinyo y cols. 2008; Bouamar y cols. 2011). Más controversia existe, sin embargo, en los pocos estudios que analizaron el papel de los SNPs del *ABCB1*, con datos

argumentando a favor (Bandur y cols. 2008; Grinyo y cols. 2008) y en contra (von Ahnen y cols. 2001; Bouamar y cols. 2011) de esta asociación. En cualquier caso, la implicación de las variantes del *ABCB1* en los mecanismos que conducen a un RA es incierta. Cabe señalar que en uno de los estudios que ofrecieron resultados positivos no hubo correlación entre el estado del gen *ABCB1* y los niveles sanguíneos de CsA (Bandur y cols. 2008), mientras que los parámetros farmacocinéticos no se midieron en el segundo estudio (Grinyo y cols. 2008). Por otra parte, el primer estudio de Bandur et al. incluyó a los pacientes tratados tanto con tacrolimus como con CsA y los autores reconocieron que la contribución relativa de los haplotipos *ABCB1* al RA fue pequeña (Bandur y cols. 2008).

El último de nuestros trabajos se centró en los polimorfismos de enzimas responsables de la biosíntesis de EETs, *CYP2C8* y *CYP2J2*, que desempeñan un papel protector contra los procesos inflamatorios y vasculares (Wu y cols. 1997; Fisslthaler y cols. 2001).

Nuestros resultados muestran que el alelo *CYP2C8\*3* se asoció con la incidencia del RFR en nuestra población de estudio. El RFR afecta del 10 al 40% de los receptores de riñón de donante fallecido (Jung y cols. 2010) y tiene múltiples causas, incluyendo factores de donantes y receptores y los procedimientos del trasplante que producen lesiones de isquemia-reperfusión graves (Marshall y cols. 1996). La asociación observada con *CYP2C8\*3* confirma nuestra hipótesis de trabajo, es decir, una reducción de la actividad *CYP2C8* llevaría a niveles bajos de EETs y, eventualmente, podría resultar en una mayor susceptibilidad a la lesión renal. De hecho, los datos anteriores in vitro muestran que el variante *CYP2C8\*3* es capaz de reducir la biotransformación in vitro de AA a EETs un 75% (Smith y cols. 2008).

Por otro lado, *CYP2J2\*7* no se correlacionó con la incidencia de RFR. Esto indicaría que *CYP2J2* probablemente juega un papel menor que *CYP2C8* en la biosíntesis de EETs involucrados en el mantenimiento de la homeostasis vascular en el



riñón. De hecho, se ha demostrado una tasa mucho más alta de producción de EETs in vitro para CYP2C8 que para CYP2J2 (Smith y cols. 2008). Además, en un estudio llevado a cabo en muestras de tejidos humanos sanos, Enayetallah et al. encontraron una mayor expresión de la proteína CYP2C8 que CYP2J2 en el riñón (Enayetallah y cols. 2004). En cualquier caso, existe también la posibilidad de que la baja frecuencia del alelo *CYP2J2\*7* en la muestra de población (2%) puede haber evitado obtener resultados estadísticamente significativos. La frecuencia de este polimorfismo no había sido probada hasta ahora en españoles. Otros estudios en caucásicos han informado frecuencias ligeramente superiores, pero siempre por debajo de 10% (Berlin y cols. 2010). En cuanto a *CYP2C8\*3*, la frecuencia observada (17%) fue idéntica a la encontrada en un estudio previo con voluntarios sanos españoles (Martinez y cols. 2005).

También hemos demostrado que la edad del donante es un factor de riesgo para el RFR, lo cual es consistente con estudios anteriores sobre los trasplantados renales (Bronzatto y cols. 2009; Krajewska y cols. 2009; Bouamar y cols. 2011), aunque nuevamente existen resultados contradictorios (Dominguez y cols. 2009; Jung y cols. 2010). De manera más remarcable, nuestros resultados indican que la combinación de ambos factores de riesgo, es decir, el portar el alelo *CYP2C8\*3* y recibir un riñón de un donante de más de 48 años de edad, aumenta de manera considerable la asociación con RFR a un OR significativo de 4,15. Ésta es la primera vez que estos polimorfismos se combinan con factores no genéticos para identificar los factores de riesgo de disfunción del injerto en el trasplante renal.

Igual que en los resultados del análisis del RFR, *CYP2C8\*3* fue también el polimorfismo más significativamente asociado con el ACr. Nuestros resultados muestran que podría constituir un factor predictor independiente de ACr alterado cuando se considera junto con la edad del donante. El papel de otros polimorfismos *CYP* estudiados parece ser menor, lo cual es consistente con resultados anteriores (Bouamar

y cols. 2011). De la misma manera, no se observó una modulación del ACr o del riesgo de RFR por polimorfismos *ABCB1*. En contraste con éste y otros hallazgos similares (Bouamar y cols. 2011; Glowacki y cols. 2011), Cattaneo et al. observaron una mayor susceptibilidad al RFR para los trasplantados renales que eran portadores de variantes alélicas *ABCB1*, lo que sugeriría que la acumulación del ICN procedente de la disminución del transporte de flujo de salida incrementaría el riesgo de RFR (Cattaneo y cols. 2009).

Sí se observó una asociación de polimorfismos *ABCB1* con la aparición de nefrotoxicidad inducida por ICN. En particular, la presencia de un número alto (4 a 6) de variantes en los 3 loci analizados fue identificado como factor de riesgo, junto con la edad de los donantes y el RFR. Los portadores de un mayor número de variantes tienen, presumiblemente, una capacidad de transporte de la P-gp disminuida lo que conduce a la acumulación del fármaco y un mayor riesgo de nefrotoxicidad, especialmente en pacientes con riñones de donantes mayores. De hecho, la edad del donante se ha sugerido que desempeña un papel importante en determinar la susceptibilidad del riñón para la nefrotoxicidad inducida por ICN, ya que los riñones de los individuos de más edad se deterioran más rápidamente (Naesens y cols. 2009). Como comentamos en el estudio de tacrolimus, una limitación de los resultados presentados en esta tesis es que no a todos los pacientes con signos de nefrotoxicidad en nuestro centro se les realiza una biopsia y, por lo tanto, se podría haber subestimado la verdadera incidencia de nefrotoxicidad inducida por el ICN.

Smith et al. identificaron a *CYP2C8\*3* como un factor de riesgo para la enfermedad renal crónica en pacientes trasplantados hepáticos tratados con ICN (Smith y cols. 2008), un hallazgo que no hemos podido reproducir en nuestro estudio. Una razón para esta discrepancia podría ser que el estudio realizado por Smith et al. tuvo una duración más larga (3 años) y, por lo tanto, podría incluir pacientes que desarrollaron nefrotoxicidad en una etapa posterior. Cabe señalar que en el estudio de

Smith et al. la asociación fue significativa para los pacientes tratados con tacrolimus pero no para aquellos tratados con CsA.

La misma hipótesis sostenida para la influencia del *CYP2C8\*3* en la función del injerto es válida para el RA, ya que la reducción de los niveles de EETs comprometerían mecanismos endógenos de defensa contra los procesos que conducen al rechazo. Sin embargo, el nivel de significación de la asociación con *2C8\*3* fue notablemente menor en este caso. Otros parámetros clínicos parecen ser más relevantes para el desarrollo del RA en nuestra serie y, probablemente, eclipsaron el efecto de las variantes genéticas. En particular, el RFR mostró una OR muy significativa (7,02,  $p < 0,001$ ), un hallazgo que también se ha observado en estudios previos con los trasplantados renales (Bronzatto y cols. 2009).

La principal limitación de este trabajo, sobre todo en lo referente a la CsA, fue que el tamaño de la muestra era limitado, lo que, junto con las bajas frecuencias de algunos de los alelos variantes evaluados produjo algunos grupos de genotipo/haplotipos pequeños y, por lo tanto, las asociaciones de éstas variantes que se observaron deberían extrapolarse con cautela.

En resumen, hemos demostrado que la genotipación de *CYP3A5* y *CYP3A4* puede ser útil para hacer ajustes de dosis más precisos, sobre todo, en pacientes tratados con tacrolimus. Por otro lado, estas diferencias farmacocinéticas no parecen tener un efecto reflejo en los resultados clínicos. Sin embargo, describimos en este trabajo que la variante *CYP2C8\*3* y la edad del donante sí se asocian con parámetros clínicos relacionados con peor función de injerto en el trasplante renal. Las combinaciones de estos dos parámetros se pueden utilizar para obtener un factor de riesgo independiente para la incidencia del RFR y/o pobre aclaramiento de creatinina en los trasplantados renales. También hemos visto que los polimorfismos en el transportador *ABCB1* pueden ser útiles en la predicción de la nefrotoxicidad por ICN por

ICN o de la hiperplasia gingival inducida por CsA. Los resultados también sugieren que los mecanismos que están detrás de estas asociaciones genéticas son probablemente independientes de las concentraciones sanguíneas valle del fármaco. La información sobre el impacto de los polimorfismos en *ABCB1* y otros genes en la toxicidad inducida por CsA es todavía escasa y contradictoria. Los esfuerzos de investigación se están centrando actualmente en el análisis de nuevas variantes alélicas en estos y otros genes que podrían explicar algunas de las lagunas existentes (Elens y cols. 2012; Jacobson y cols. 2012).

Estudios adicionales que incluyan material genético de los donantes o la expresión de enzimas en tejido renal (tanto productoras de EETs como implicadas en la biodisponibilidad de fármacos) ayudarán a identificar más factores de riesgo para estos eventos adversos.

## **6. CONCLUSIONES**

Basándonos en los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. El portar el alelo funcional *CYP3A5\*1* disminuye aproximadamente a la mitad la exposición del paciente al tacrolimus y duplica los requerimientos de dosis diarios. Además, la presencia adicional del alelo *CYP3A4\*1B* disminuye todavía más la exposición al fármaco.
2. Ninguno de los pacientes con la combinación *CYP3A4\*1B/3A5\*1* alcanzó el rango terapéutico de tacrolimus en el primer mes postrasplante. Sin embargo, la presencia de estos alelos variantes no se tradujo en consecuencias clínicas reseñables.
3. El haplotipo *ABCB1* TGC (3435-2677-1236) sí se observó asociado a un mayor riesgo de sufrir nefrotoxicidad inducida por tacrolimus.
4. Hasta cinco meses después del trasplante, los pacientes con al menos un alelo funcional *CYP3A5\*1* o con un alelo *CYP3A4\*1B* presentan menor exposición a ciclosporina y mayores requerimientos de dosis respectivamente. Igualmente, la combinación de los dos alelos se asoció también a mayores requerimientos de dosis.
5. El genotipo *ABCB1* 3435TT disminuyó alrededor del 40% la exposición del paciente a la ciclosporina en la primera semana postrasplante y aumentó más de 4 veces el riesgo de sufrir un evento nefrotóxico en el primer año.
6. Los pacientes con más alelos variantes en el gen *ABCB1* vieron incrementado sensiblemente el riesgo de sufrir nefrotoxicidad o de hiperplasia gingival inducida por ciclosporina.

7. En pacientes tratados con ciclosporina o tacrolimus, el portar la variante *CYP2C8\*3* duplicó el riesgo de sufrir retraso en la función renal y disminuyó en un 12% la función renal a lo largo del estudio.
8. Sí además de portar el alelo *CYP2C8\*3*, el paciente tenía un donante de más de 48 años, el riesgo de retraso de la función renal se cuadruplicaba, disminuía aún más el aclaramiento de creatinina y aumentaba la probabilidad de rechazo agudo.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Akhlaghi, F. and A. K. Trull. Distribution of cyclosporin in organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:615-637.
- Alkayed, N. J., T. Goyagi, H. D. Joh, J. Klaus, D. R. Harder, R. J. Traystman, y cols. Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack. *Stroke* 2002;33:1677-1684.
- Allison, A. C. Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 2000;47:63-83.
- Amirimani, B., B. Ning, A. C. Deitz, B. L. Weber, F. F. Kadlubar and T. R. Rebbeck. Increased transcriptional activity of the CYP3A4\*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003;42:299-305.
- Anglicheau, D., M. Flamant, M. H. Schlageter, F. Martinez, B. Cassinat, P. Beaune, y cols. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2003a;18:2409-2414.
- Anglicheau, D., E. Thervet, I. Etienne, B. Hurault De Ligny, Y. Le Meur, G. Touchard, y cols. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:422-433.
- Anglicheau, D., C. Verstuyft, P. Laurent-Puig, L. Becquemont, M. H. Schlageter, B. Cassinat, y cols. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003b;14:1889-1896.
- Annese, V., M. R. Valvano, O. Palmieri, A. Latiano, F. Bossa and A. Andriulli. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006;12:3636-3644.
- Armendariz, Y., L. Pou, C. Cantarell, R. Lopez, M. Perello and L. Capdevila. Evaluation of a limited sampling strategy to estimate area under the curve of tacrolimus in adult renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2005;27:431-434.
- Azarpira, N., M. H. Aghdaie, A. Behzad-Behbahanie, B. Geramizadeh, S. Behzadi, S. A. Malekhoseinie, y cols. Association between cyclosporine concentration and genetic

- polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 during the early stage after renal transplantation. *Exp Clin Transplant* 2006;4:416-419.
- Baciewicz, A. M. and F. A. Baciewicz, Jr. Cyclosporine pharmacokinetic drug interactions. *Am J Surg* 1989;157:264-271.
- Balbontin, F. G., B. Kiberd, J. Squires, D. Singh, A. Fraser, P. Belitsky, y cols. Tacrolimus monitoring by simplified sparse sampling under the concentration time curve. *Transplant Proc* 2003;35:2445-2448.
- Ball, S. E., J. Scatina, J. Kao, G. M. Ferron, R. Fruncillo, P. Mayer, y cols. Population distribution and effects on drug metabolism of a genetic variant in the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:288-294.
- Bandur, S., J. Petrasek, P. Hribova, E. Novotna, I. Brabcova and O. Viklicky. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008;86:1206-1213.
- Barbarino, J. M., C. E. Staats, R. Venkataramanan, T. E. Klein and R. B. Altman. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:563-585.
- Bechstein, W. O. Neurotoxicity of calcineurin inhibitors: impact and clinical management. *Transpl Int* 2000;13:313-326.
- Berlin, D. S., K. Sangkuhl, T. E. Klein and R. B. Altman. PharmGKB summary: cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2: CYP2J2. *Pharmacogenet Genomics* 2010;21:308-311.
- Bernabeu, M. Monitorización de ciclosporina (Sandimmun). Implicaciones clínicas y farmacológicas. *NEFROLOGIA* 1990;x:25-30.
- Borel, J. F., C. Feurer, H. U. Gubler and H. Stahelin. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1976;6:468-475.
- Borgel, J., D. Bulut, C. Hanefeld, H. Neubauer, A. Mugge, J. T. Epplen, y cols. The CYP2J2 G-50T polymorphism and myocardial infarction in patients with cardiovascular risk profile. *BMC Cardiovasc Disord* 2008;8:41.

- Bottiger, Y., C. Brattstrom, G. Tyden, J. Sawe and C. G. Groth. Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:445-448.
- Bouamar, R., D. A. Hesselink, R. H. van Schaik, W. Weimar, I. A. Macphee, J. W. de Fijter, y cols. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit* 2011;33:178-184.
- Bronzatto, E. J., K. R. da Silva Quadros, R. L. Santos, G. Alves-Filho and M. Mazzali. Delayed graft function in renal transplant recipients: risk factors and impact on 1-year graft function: a single center analysis. *Transplant Proc* 2009;41:849-851.
- Busuttill, R. W. and C. D. Holt. Tacrolimus (FK506) is superior to cyclosporine in liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:534-538.
- Campbell, W. B., D. Gebremedhin, P. F. Pratt and D. R. Harder. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res* 1996;78:415-423.
- Campbell, W. B. and D. R. Harder. Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circ Res* 1999;84:484-488.
- Cantarovich, M., J. Barkun, J. G. Besner, P. Metrakos, E. Alpert, M. Deschenes, y cols. Cyclosporine peak levels provide a better correlation with the area-under-the-curve than trough levels in liver transplant patients treated with neoral. *Transplant Proc* 1998;30:1462-1463.
- Capdevila, J. H., J. R. Falck and R. C. Harris. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res* 2000;41:163-181.
- Cattaneo, D., P. Ruggenenti, S. Baldelli, N. Motterlini, E. Gotti, S. Sandrini, y cols. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1404-1415.

- Cavalli, S. A., M. H. Hirata and R. D. Hirata. Detection of Mbol polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem* 2001;47:348-351.
- Ciavarella, D., R. Guiglia, G. Campisi, M. Di Cosola, C. Di Liberto, A. Sabatucci, y cols. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E19-25.
- Ciftci, H. S., T. K. Ayna, Y. K. Caliskan, I. Guney, H. Bakkaloglu, I. Nane, y cols. Effect of MDR1 polymorphisms on the blood concentrations of tacrolimus in Turkish renal transplant patients. *Transplant Proc* 2013;45:895-900.
- Clase, C. M., K. Mahalati, B. A. Kiberd, J. G. Lawen, K. A. West, A. D. Fraser, y cols. Adequate early cyclosporin exposure is critical to prevent renal allograft rejection: patients monitored by absorption profiling. *Am J Transplant* 2002;2:789-795.
- Copeland, K. R., R. W. Yatscoff and R. M. McKenna. Immunosuppressive activity of cyclosporine metabolites compared and characterized by mass spectroscopy and nuclear magnetic resonance. *Clin Chem* 1990;36:225-229.
- Crettol, S., J. P. Venetz, M. Fontana, J. D. Aubert, M. Pascual and C. B. Eap. CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2008;30:689-699.
- Cruzado, J., O. Bestard and J. M. Grinyó (2008). Terapéutica inmunosupresora. Nefrología Clínica. L. Hernando, P. Aljama, M. Ariaset al. Buenos Aires; Madrid, Editorial Médica Panamericana: 1036-1047.
- Chen, J. S., L. S. Li, D. R. Cheng, S. M. Ji, Q. Q. Sun, Z. Cheng, y cols. Effect of CYP3A5 genotype on renal allograft recipients treated with tacrolimus. *Transplant Proc* 2009;41:1557-1561.
- Cheung, C. Y., R. A. Op den Buijsch, K. M. Wong, H. W. Chan, K. F. Chau, C. S. Li, y cols. Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2006;7:563-574.

- Chitnis, S. D., K. Ogasawara, B. Schniedewind, R. Y. Gohh, U. Christians and F. Akhlaghi. Concentration of tacrolimus and major metabolites in kidney transplant recipients as a function of diabetes mellitus and cytochrome P450 3A gene polymorphism. *Xenobiotica* 2013;43:641-649.
- Cho, J. H., Y. D. Yoon, J. Y. Park, E. J. Song, J. Y. Choi, S. H. Yoon, y cols. Impact of cytochrome P450 3A and ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms on tacrolimus dose-adjusted trough concentrations among Korean renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012;44:109-114.
- Christians, U., W. Jacobsen, L. Z. Benet and A. Lampen. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:813-851.
- Christians, U., T. Strom, Y. L. Zhang, W. Steudel, V. Schmitz, S. Trump, y cols. Active drug transport of immunosuppressants: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Ther Drug Monit* 2006;28:39-44.
- Chu, X. M., H. P. Hao, G. J. Wang, L. Q. Guo and P. Q. Min. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on cyclosporine A metabolism and elimination in Chinese renal transplant recipients. *Acta Pharmacol Sin* 2006;27:1504-1508.
- Dai, D., D. C. Zeldin, J. A. Blaisdell, B. Chanas, S. J. Coulter, B. I. Ghanayem, y cols. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001;11:597-607.
- Dai, Y., M. F. Hebert, N. Isoherranen, C. L. Davis, C. Marsh, D. D. Shen, y cols. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos* 2006;34:836-847.
- Dai, Y., K. Iwanaga, Y. S. Lin, M. F. Hebert, C. L. Davis, W. Huang, y cols. In vitro metabolism of cyclosporine A by human kidney CYP3A5. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1889-1902.
- Daikh, B. E., J. M. Lasker, J. L. Raucy and D. R. Koop. Regio- and stereoselective epoxidation of arachidonic acid by human cytochromes P450 2C8 and 2C9. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:1427-1433.

- Danovitch, G. M. (2009). Immunosuppressive Medications and Protocols for Kidney Transplantation. Handbook of Kidney Transplantation. G. M. Danovitch. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins: 77-126.
- David-Neto, E., F. B. Lemos, E. A. Furusawa, B. S. Schwartzman, J. S. Cavalcante, E. M. Yagyu, y cols. Impact of cyclosporin A pharmacokinetics on the presence of side effects in pediatric renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:343-349.
- Dawson, T. M., J. P. Steiner, W. E. Lyons, M. Fotuhi, M. Blue and S. H. Snyder. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. *Neuroscience* 1994;62:569-580.
- De Iudicibus, S., G. Castronovo, A. Gigante, G. Stocco, G. Decorti, R. Di Lenarda, y cols. Role of MDR1 gene polymorphisms in gingival overgrowth induced by cyclosporine in transplant patients. *J Periodontal Res* 2008;43:665-672.
- de Jonge, H., C. Metalidis, M. Naesens, D. Lambrechts and D. R. Kuypers. The P450 oxidoreductase \*28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011;12:1281-1291.
- Deng, S., G. Zhu, F. Liu, H. Zhang, X. Qin, L. Li, y cols. CYP4F2 gene V433M polymorphism is associated with ischemic stroke in the male Northern Chinese Han population. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:664-668.
- Dominguez, J., F. Lira, P. Troncoso, C. Aravena, M. Ortiz and R. Gonzalez. Factors that predict duration of delayed graft function in cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc* 2009;41:2668-2669.
- Dreisbach, A. W., S. Japa, A. Sigel, M. B. Parenti, A. E. Hess, S. L. Srinouanprachanh, y cols. The Prevalence of CYP2C8, 2C9, 2J2, and soluble epoxide hydrolase polymorphisms in African Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 2005;18:1276-1281.

- Drescher, S., E. Schaeffeler, M. Hitzl, U. Hofmann, M. Schwab, U. Brinkmann, y cols. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:526-534.
- Drozdziak, M., K. Mysliwiec, M. Lewinska-Chelstowska, J. Banach, A. Drozdziak and J. Grabarek. P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 2004;31:758-763.
- Drugs.com (2015a, 2015 Aug 31). "Cyclosporine drugs interactions." from <http://www.drugs.com/drug-interactions/cyclosporine.html>.
- Drugs.com (2015b, 2015 Aug 31). "Tacrolimus drug interactions". from <http://www.drugs.com/drug-interactions/tacrolimus.html>.
- Ducharme, M. P., L. H. Warbasse and D. J. Edwards. Disposition of intravenous and oral cyclosporine after administration with grapefruit juice. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:485-491.
- Eidelman, B. H., K. Abu-Elmagd, J. Wilson, J. J. Fung, M. Alessiani, A. Jain, y cols. Neurologic complications of FK 506. *Transplant Proc* 1991;23:3175-3178.
- Elens, L., R. Bouamar, D. A. Hesselink, V. Haufroid, I. P. van der Heiden, T. van Gelder, y cols. A New Functional CYP3A4 Intron 6 Polymorphism Significantly Affects Tacrolimus Pharmacokinetics in Kidney Transplant Recipients. *Clin Chem* 2011;57:1574-1583.
- Elens, L., R. Bouamar, D. A. Hesselink, V. Haufroid, T. van Gelder and R. H. van Schaik. The new CYP3A4 intron 6 C>T polymorphism (CYP3A4\*22) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2012.
- Enayetallah, A. E., R. A. French, M. S. Thibodeau and D. F. Grant. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem* 2004;52:447-454.
- Eng, H. S., Z. Mohamed, R. Calne, C. C. Lang, M. A. Mohd, W. T. Seet, y cols. The influence of CYP3A gene polymorphisms on cyclosporine dose requirement in renal allograft recipients. *Kidney Int* 2006;69:1858-1864.

- Evans, W. E. and H. L. McLeod. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;348:538-549.
- Fahr, A. Cyclosporin clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 1993;24:472-495.
- Fava, C., M. Montagnana, P. Almgren, B. Hedblad, G. Engstrom, G. Berglund, y cols. The common functional polymorphism -50G>T of the CYP2J2 gene is not associated with ischemic coronary and cerebrovascular events in an urban-based sample of Swedes. *J Hypertens* 2010;28:294-299.
- Fava, C., M. Ricci, O. Melander and P. Minuz. Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012;98:75-85.
- Fellay, J., C. Marzolini, E. R. Meaden, D. J. Back, T. Buclin, J. P. Chave, y cols. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30-36.
- Ferraresso, M., A. Tirelli, L. Ghio, P. Grillo, V. Martina, E. Torresani, y cols. Influence of the CYP3A5 genotype on tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in young kidney transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2007;11:296-300.
- Fisslthaler, B., R. Popp, L. Kiss, M. Potente, D. R. Harder, I. Fleming, y cols. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 1999;401:493-497.
- Fisslthaler, B., R. Popp, U. R. Michaelis, L. Kiss, I. Fleming and R. Busse. Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension* 2001;38:1427-1432.
- Fitzpatrick, F. A., M. D. Ennis, M. E. Baze, M. A. Wynalda, J. E. McGee and W. F. Liggett. Inhibition of cyclooxygenase activity and platelet aggregation by epoxyeicosatrienoic acids. Influence of stereochemistry. *J Biol Chem* 1986;261:15334-15338.
- Flechner, S. M., A. R. Katz, A. J. Rogers, C. Van Buren and B. D. Kahan. The presence of cyclosporine in body tissues and fluids during pregnancy. *Am J Kidney Dis* 1985;5:60-63.



- Foote, C. J., W. Greer, B. A. Kiberd, A. Fraser, J. Lawen, B. Nashan, y cols. MDR1 C3435T polymorphisms correlate with cyclosporine levels in de novo renal recipients. *Transplant Proc* 2006;38:2847-2849.
- Formea, C. and J. Karlix (2011). Antirejection Agents (AHFS 92:00). Clinical Pharmacokinetics. ASHP. Tucson, Murphy, J.
- Fredericks, S., M. Moreton, S. Reboux, N. D. Carter, L. Goldberg, D. W. Holt, y cols. Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006;82:705-708.
- Fromm, M. F. P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;38:69-74.
- Fromm, M. F. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *Eur J Clin Invest* 2003;33 Suppl 2:6-9.
- Fukudo, M., I. Yano, A. Yoshimura, S. Masuda, M. Uesugi, K. Hosohata, y cols. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:413-423.
- Gainer, J. V., A. Bellamine, E. P. Dawson, K. E. Womble, S. W. Grant, Y. Wang, y cols. Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyeicosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation* 2005;111:63-69.
- Garcia-Roca, P., M. Medeiros, H. Reyes, B. A. Rodriguez-Espino, J. Alberu, L. Ortiz, y cols. CYP3A5 polymorphism in Mexican renal transplant recipients and its association with tacrolimus dosing. *Arch Med Res* 2012;43:283-287.
- Garcia de Jalón Martínez, A., D. Pascual Regueiro, M. A. Trivez Boned, C. Sancho Serrano, E. Mallen Mateo, P. Gil Martínez, y cols. [Kidney transplantation. Technique and complications]. *Actas Urol Esp* 2003;27:662-677.
- Geddes, C. C., Y. M. Woo and A. G. Jardine. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol* 2002;15:17-21.

- Gervasini, G., M. Garcia-Cerrada, E. Coto, E. Vergara, G. Garcia-Pino, R. Alvarado, y cols. A 3'-UTR Polymorphism in Soluble Epoxide Hydrolase Gene Is Associated with Acute Rejection in Renal Transplant Recipients. *PLoS One* 2015a;10:e0133563.
- Gervasini, G., M. Garcia-Cerrada, E. Vergara, G. Garcia-Pino, R. Alvarado, M. J. Fernandez-Cavada, y cols. Polymorphisms in CYP-mediated arachidonic acid routes affect the outcome of renal transplantation. *Eur J Clin Invest* 2015b.
- Gervasini, G., S. Vizcaino, J. A. Carrillo, M. J. Caballero and J. Benitez. The effect of CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 and the MDR1 polymorphisms and gender on the urinary excretion of the metabolites of the H-receptor antihistamine ebastine: a pilot study. *Br J Clin Pharmacol* 2006;62:177-186.
- Gervasini, G., S. Vizcaino, C. Gasiba, J. A. Carrillo and J. Benitez. Differences in CYP3A5\*3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and Other Caucasian populations. *Ther Drug Monit* 2005;27:819-821.
- Giessing, M., T. F. Fuller, M. Tuellmann, T. Slowinski, K. Budde and L. Liefeldt. Steroid- and calcineurin inhibitor free immunosuppression in kidney transplantation: state of the art and future developments. *World J Urol* 2007;25:325-332.
- Glowacki, F., A. Lionet, D. Buob, M. Labalette, D. Allorge, F. Provot, y cols. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:3046-3050.
- Go, A. S., G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch and C. Y. Hsu. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296-1305.
- González-Molina, M. (2005). Nefropatía crónica del injerto. Manual de trasplante renal. M. Arias, J. M. Campistol and J. M. Morales. Madrid, Grupo 2 Comunicación Médica: 167-183.
- González-Posada, J., L. Pérez Tamajón, D. Marrero Miranda, A. Álvarez González, C. Rodríguez Adanero and A. González Rinne (2012). Complicaciones médicas precoces

- tras el trasplante renal. Nefrología al día [Internet]. S. E. d. Nefrología/Plusmedical. Barcelona (Spain), Loenzo Sellarés, V. López-Gómez, JM.: 769-794.
- Gordon, R. D., B. W. Shaw, Jr., S. Iwatsuki, C. O. Esquivel and T. E. Starzl. Indications for liver transplantation in the cyclosporine era. *Surg Clin North Am* 1986;66:541-556.
- Goto, M., S. Masuda, H. Saito, S. Uemoto, T. Kiuchi, K. Tanaka, y cols. C3435T polymorphism in the MDR1 gene affects the enterocyte expression level of CYP3A4 rather than Pgp in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2002;12:451-457.
- Grenda, R., S. Prokurat, A. Ciechanowicz, B. Piatosa and P. Kalicinski. Evaluation of the genetic background of standard-immunosuppressant-related toxicity in a cohort of 200 paediatric renal allograft recipients--a retrospective study. *Ann Transplant* 2009;14:18-24.
- Grinyo, J., Y. Vanrenterghem, B. Nashan, F. Vincenti, H. Ekberg, K. Lindpaintner, y cols. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int* 2008;21:879-891.
- Gross, G. J., J. R. Falck, E. R. Gross, M. Isbell, J. Moore and K. Nithipatikom. Cytochrome P450 and arachidonic acid metabolites: role in myocardial ischemia/reperfusion injury revisited. *Cardiovasc Res* 2005;68:18-25.
- Haehner, B. D., J. C. Gorski, M. Vandenbranden, S. A. Wrighton, S. K. Janardan, P. B. Watkins, y cols. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996;50:52-59.
- Hamilton, D. (1984). Kidney Transplantation, A History. Kidney Transplantation. P. J. Morris. London, Grune & Stratton: 1-13.
- Hamzah, S., L. K. Teh, J. S. Siew, G. Ahmad, H. S. Wong, Z. A. Zakaria, y cols. Pharmacogenotyping of CYP3A5 in predicting dose-adjusted trough levels of tacrolimus among Malaysian kidney-transplant patients. *Can J Physiol Pharmacol* 2014;92:50-57.

- Haschke-Becher, E., J. Kirchheiner, O. Trummer, G. Grunbacher, A. Kainz, B. O. Boehm, y cols. Impact of CYP2C8 and 2C9 polymorphisms on coronary artery disease and myocardial infarction in the LURIC cohort. *Pharmacogenomics* 2010;11:1359-1365.
- Hassell, T. M. and A. F. Hefti. Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:103-137.
- Haufroid, V., M. Mourad, V. Van Kerckhove, J. Wawrzyniak, M. De Meyer, D. C. Eddour, y cols. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14:147-154.
- Haufroid, V., P. Wallemacq, V. VanKerckhove, L. Elens, M. De Meyer, D. C. Eddour, y cols. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study. *Am J Transplant* 2006;6:2706-2713.
- Hauser, I. A., E. Schaeffeler, S. Gauer, E. H. Scheuermann, B. Wegner, J. Gossmann, y cols. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1501-1511.
- Hebert, M. F. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;27:201-214.
- Hebert, M. F., J. P. Roberts, T. Prueksaritanont and L. Z. Benet. Bioavailability of cyclosporine with concomitant rifampin administration is markedly less than predicted by hepatic enzyme induction. *Clin Pharmacol Ther* 1992;52:453-457.
- Hebert, M. F., S. Zheng, K. Hays, D. D. Shen, C. L. Davis, J. G. Umans, y cols. Interpreting tacrolimus concentrations during pregnancy and postpartum. *Transplantation* 2013;95:908-915.
- Herweijer, H., P. Sonneveld, F. Baas and K. Nooter. Expression of mdr1 and mdr3 multidrug-resistance genes in human acute and chronic leukemias and association with stimulation of drug accumulation by cyclosporine. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1133-1140.

- Hesselink, D. A., R. Bouamar and T. van Gelder. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit* 2010;32:387-393.
- Hesselink, D. A., T. van Gelder, R. H. van Schaik, A. H. Balk, I. P. van der Heiden, T. van Dam, y cols. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76:545-556.
- Hesselink, D. A., R. H. van Schaik, M. van Agteren, J. W. de Fijter, A. Hartmann, M. Zeier, y cols. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:339-348.
- Hesselink, D. A., R. H. van Schaik, I. P. van der Heiden, M. van der Werf, P. J. Gregoor, J. Lindemans, y cols. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:245-254.
- Hirt, D. L., J. Capdevila, J. R. Falck, M. D. Breyer and H. R. Jacobson. Cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid are potent inhibitors of vasopressin action on rabbit cortical collecting duct. *J Clin Invest* 1989;84:1805-1812.
- Hitzl, M., S. Drescher, H. van der Kuip, E. Schaffeler, J. Fischer, M. Schwab, y cols. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11:293-298.
- Hitzl, M., E. Schaeffeler, B. Hocher, T. Slowinski, H. Halle, M. Eichelbaum, y cols. Variable expression of P-glycoprotein in the human placenta and its association with mutations of the multidrug resistance 1 gene (MDR1, ABCB1). *Pharmacogenetics* 2004;14:309-318.
- Hoffmann, M. M., P. Bugert, U. Seelhorst, B. Wellnitz, B. R. Winkelmann, B. O. Boehm, y cols. The -50G>T polymorphism in the promoter of the CYP2J2 gene in coronary heart disease: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health study. *Clin Chem* 2007;53:539-540.

- Hoffmeyer, S., O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmoller, A. John, y cols. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-3478.
- Hu, Y. F., W. Qiu, Z. Q. Liu, L. J. Zhu, J. H. Tu, D. Wang, y cols. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:1093-1098.
- Hubner, G. I., R. Eismann and W. Sziegoleit. Drug interaction between mycophenolate mofetil and tacrolimus detectable within therapeutic mycophenolic acid monitoring in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 1999;21:536-539.
- Hume, D. M., J. P. Merrill, B. F. Miller and G. W. Thorn. Experiences with renal homotransplantation in the human: report of nine cases. *J Clin Invest* 1955;34:327-382.
- Hustert, E., M. Haberl, O. Burk, R. Wolbold, Y. Q. He, K. Klein, y cols. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001;11:773-779.
- Ihara, H., D. Shinkuma, Y. Ichikawa, M. Nojima, S. Nagano and F. Ikoma. Intra- and interindividual variation in the pharmacokinetics of tacrolimus (FK506) in kidney transplant recipients--importance of trough level as a practical indicator. *Int J Urol* 1995;2:151-155.
- Iwasaki, K., T. Shiraga, H. Matsuda, K. Nagase, Y. Tokuma, T. Hata, y cols. Further metabolism of FK506 (tacrolimus). Identification and biological activities of the metabolites oxidized at multiple sites of FK506. *Drug Metab Dispos* 1995;23:28-34.
- Iwasaki, K., T. Shiraga, K. Nagase, Z. Tozuka, K. Noda, S. Sakuma, y cols. Isolation, identification, and biological activities of oxidative metabolites of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone. *Drug Metab Dispos* 1993;21:971-977.
- Jacobs, E. R. and D. C. Zeldin. The lung HETEs (and EETs) up. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1-H10.

- Jacobson, P. A., W. S. Oetting, A. M. Brearley, R. Leduc, W. Guan, D. Schladt, y cols. Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation* 2011;91:300-308.
- Jacobson, P. A., D. Schladt, A. Israni, W. S. Oetting, Y. C. Lin, R. Leduc, y cols. Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium. *Transplantation* 2012;93:624-631.
- Jaksch, P., A. Kocher, P. Neuhauser, K. Sarahrudi, J. Seweryn, W. Wisser, y cols. Monitoring C2 level predicts exposure in maintenance lung transplant patients receiving the microemulsion formulation of cyclosporine (Neoral). *J Heart Lung Transplant* 2005;24:1076-1080.
- Jevnikar, A. M. and R. B. Mannon. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 2:S56-67.
- Jiang, Z. P., Y. R. Wang, P. Xu, R. R. Liu, X. L. Zhao and F. P. Chen. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435T polymorphism on cyclosporine pharmacokinetics. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:433-444.
- Jorgensen, K., J. Povlsen, S. Madsen, M. Madsen, H. Hansen, A. Pedersen, y cols. C2 (2-h) levels are not superior to trough levels as estimates of the area under the curve in tacrolimus-treated renal-transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1487-1490.
- Jung, G. O., M. R. Yoon, S. J. Kim, M. J. Sin, E. Y. Kim, J. I. Moon, y cols. The risk factors of delayed graft function and comparison of clinical outcomes after deceased donor kidney transplantation: single-center study. *Transplant Proc* 2010;42:705-709.
- Jusko, W. J. Analysis of tacrolimus (FK 506) in relation to therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1995;17:596-601.
- Kamdem, L. K., F. Streit, U. M. Zanger, J. Brockmoller, M. Oellerich, V. W. Armstrong, y cols. Contribution of CYP3A5 to the in vitro hepatic clearance of tacrolimus. *Clin Chem* 2005;51:1374-1381.
- Kaplan, B., K. Lown, R. Craig, M. Abecassis, D. Kaufman, J. Leventhal, y cols. Low bioavailability of cyclosporine microemulsion and tacrolimus in a small bowel transplant

- recipient: possible relationship to intestinal P-glycoprotein activity. *Transplantation* 1999;67:333-335.
- Kapturczak, M. H., H. U. Meier-Kriesche and B. Kaplan. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc* 2004;36:25S-32S.
- Karanam, B. V., S. H. Vincent, D. J. Newton, R. W. Wang and S. H. Chiu. FK 506 metabolism in human liver microsomes: investigation of the involvement of cytochrome P450 isozymes other than CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 1994;22:811-814.
- Katsakiori, P. F., E. P. Papapetrou, G. C. Sakellaropoulos, D. S. Goumenos, G. C. Nikiforidis and C. S. Flordellis. Factors affecting the long-term response to tacrolimus in renal transplant patients: pharmacokinetic and pharmacogenetic approach. *Int J Med Sci* 2010;7:94-100.
- Kazancioglu, H. O., G. Ak, A. Turkmen, U. Ozbek, F. N. Tuncer and A. Karabulut. The role of MDR1 C3435T gene polymorphism on gingival hyperplasia in Turkish renal transplant patients treated with cyclosporine in the absence of calcium channel blockers. *Transplant Proc* 2013;45:2233-2237.
- Kellerman, P. S. and R. T. Bogusky. Microfilament disruption occurs very early in ischemic proximal tubule cell injury. *Kidney Int* 1992;42:896-902.
- Kellerman, P. S., R. A. Clark, C. A. Hoilien, S. L. Linas and B. A. Molitoris. Role of microfilaments in maintenance of proximal tubule structural and functional integrity. *Am J Physiol* 1990;259:F279-285.
- Keown, P. A. New concepts in cyclosporine monitoring. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:619-626.
- Kershner, R. P. and W. E. Fitzsimmons. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996;62:920-926.
- Kim, I. W., Y. J. Moon, E. Ji, K. I. Kim, N. Han, S. J. Kim, y cols. Clinical and genetic factors affecting tacrolimus trough levels and drug-related outcomes in Korean kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2012;68:657-669.



- Kim, J. Y. and K. S. Suh. Light microscopic and electron microscopic features of cyclosporine nephrotoxicity in rats. *J Korean Med Sci* 1995;10:352-359.
- Kim, R. B., B. F. Leake, E. F. Choo, G. K. Dresser, S. V. Kubba, U. I. Schwarz, y cols. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-199.
- Kimchi-Sarfaty, C., J. M. Oh, I. W. Kim, Z. E. Sauna, A. M. Calcagno, S. V. Ambudkar, y cols. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525-528.
- King, L. M., J. V. Gainer, G. L. David, D. Dai, J. A. Goldstein, N. J. Brown, y cols. Single nucleotide polymorphisms in the CYP2J2 and CYP2C8 genes and the risk of hypertension. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:7-13.
- King, L. M., J. Ma, S. Srettabunjong, J. Graves, J. A. Bradbury, L. Li, y cols. Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms. *Mol Pharmacol* 2002;61:840-852.
- Kino, T., H. Hatanaka, S. Miyata, N. Inamura, M. Nishiyama, T. Yajima, y cols. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* 1987;40:1256-1265.
- Kivisto, K. T., M. Niemi and M. F. Fromm. Functional interaction of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Fundam Clin Pharmacol* 2004;18:621-626.
- Klauke, B., A. Wirth, A. Zittermann, B. Bohms, G. Tenderich, R. Korfer, y cols. No association between single nucleotide polymorphisms and the development of nephrotoxicity after orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:741-745.
- Klimecki, W. T., B. W. Futscher, T. M. Grogan and W. S. Dalton. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 1994;83:2451-2458.
- Klose, T. S., J. A. Blaisdell and J. A. Goldstein. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. *J Biochem Mol Toxicol* 1999;13:289-295.
- Knoll, G. Trends in kidney transplantation over the past decade. *Drugs* 2008;68 Suppl 1:3-10.

- Krajewska, M., K. Koscielska-Kasprzak, W. Weyde, D. Drulis-Fajdasz, K. Madziarska, O. Mazanowska, y cols. Impact of donor-dependent genetic factors on long-term renal graft function. *Transplant Proc* 2009;41:2978-2980.
- Kramer, B. K., G. Montagnino, D. Del Castillo, R. Margreiter, H. Sperschneider, C. J. Olbricht, y cols. Efficacy and safety of tacrolimus compared with cyclosporin A microemulsion in renal transplantation: 2 year follow-up results. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:968-973.
- Kreutz, R., J. Bolbrinker, F. van der Sman-de Beer, E. W. Boeschoten, F. W. Dekker, S. Kain, y cols. CYP3A5 genotype is associated with longer patient survival after kidney transplantation and long-term treatment with cyclosporine. *Pharmacogenomics J* 2008;8:416-422.
- Kroetz, D. L., C. Pauli-Magnus, L. M. Hodges, C. C. Huang, M. Kawamoto, S. J. Johns, y cols. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003;13:481-494.
- Krotz, F., T. Riexinger, M. A. Buerkle, K. Nithipatikom, T. Gloe, H. Y. Sohn, y cols. Membrane-potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:595-600.
- Kuehl, P., J. Zhang, Y. Lin, J. Lamba, M. Assem, J. Schuetz, y cols. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27:383-391.
- Kuypers, D. R. Immunosuppressive drug monitoring - what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome. *Transpl Int* 2005;18:140-150.
- Kuypers, D. R., K. Claes, P. Evenepoel, B. Maes, W. Coosemans, J. Pirenne, y cols. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2004a;43:741-762.
- Kuypers, D. R., K. Claes, P. Evenepoel, B. Maes and Y. Vanrenterghem. Clinical efficacy and toxicity profile of tacrolimus and mycophenolic acid in relation to combined long-term

- pharmacokinetics in de novo renal allograft recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2004b;75:434-447.
- Kuypers, D. R., H. de Jonge, M. Naesens, E. Lerut, K. Verbeke and Y. Vanrenterghem. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:711-725.
- Kuypers, D. R., M. Naesens, H. de Jonge, E. Lerut, K. Verbeke and Y. Vanrenterghem. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2010;32:394-404.
- Kuzuya, T., T. Kobayashi, N. Moriyama, T. Nagasaka, I. Yokoyama, K. Uchida, y cols. Amlodipine, but not MDR1 polymorphisms, alters the pharmacokinetics of cyclosporine A in Japanese kidney transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:865-868.
- Lai, X. S., L. P. Yang, X. T. Li, J. P. Liu, Z. W. Zhou and S. F. Zhou. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. *Curr Drug Metab* 2009;10:1009-1047.
- Lamba, J. K., Y. S. Lin, E. G. Schuetz and K. E. Thummel. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1271-1294.
- Lee, C. A., D. Neul, A. Clouser-Roche, D. Dalvie, M. R. Wester, Y. Jiang, y cols. Identification of novel substrates for human cytochrome P450 2J2. *Drug Metab Dispos* 2010a;38:347-356.
- Lee, C. R., J. D. Imig, M. L. Edin, J. Foley, L. M. DeGraff, J. A. Bradbury, y cols. Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice. *Faseb J* 2010b;24:3770-3781.
- Lee, C. R., K. E. North, M. S. Bray, D. J. Couper, G. Heiss and D. C. Zeldin. CYP2J2 and CYP2C8 polymorphisms and coronary heart disease risk: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17:349-358.

- Lemahieu, W. P., B. D. Maes, K. Verbeke and Y. Vanrenterghem. CYP3A4 and P-glycoprotein activity in healthy controls and transplant patients on cyclosporin vs. tacrolimus vs. sirolimus. *Am J Transplant* 2004;4:1514-1522.
- Levin, A. and P. E. Stevens. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int* 2014;85:49-61.
- Levy, G. A. C2 monitoring strategy for optimising cyclosporin immunosuppression from the Neoral formulation. *BioDrugs* 2001;15:279-290.
- Li, A. P., D. L. Kaminski and A. Rasmussen. Substrates of human hepatic cytochrome P450 3A4. *Toxicology* 1995;104:1-8.
- Li, D. Y., R. C. Teng, H. J. Zhu and Y. Fang. CYP3A4/5 polymorphisms affect the blood level of cyclosporine and tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013;51:466-474.
- Li, R., X. Xu, C. Chen, X. Yu, M. L. Edin, L. M. Degraff, y cols. Cytochrome P450 2J2 is protective against global cerebral ischemia in transgenic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012a;99:68-78.
- Li, Y., X. Hu, B. Cai, J. Chen, Y. Bai, J. Tang, y cols. Meta-analysis of the effect of MDR1 C3435 polymorphism on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transpl Immunol* 2012b;27:12-18.
- Lin, J. H. and M. Yamazaki. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2003;42:59-98.
- Lindholm, A. and B. D. Kahan. Influence of cyclosporine pharmacokinetics, trough concentrations, and AUC monitoring on outcome after kidney transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 1993;54:205-218.
- List, A. F., K. J. Kopecky, C. L. Willman, D. R. Head, D. L. Persons, M. L. Slovak, y cols. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 2001;98:3212-3220.

- Liu, C., Y. F. Shang, X. F. Zhang, X. G. Zhang, B. Wang, Z. Wu, y cols. Co-administration of grapefruit juice increases bioavailability of tacrolimus in liver transplant patients: a prospective study. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:881-885.
- Liu, P. Y., Y. H. Li, T. H. Chao, H. L. Wu, L. J. Lin, L. M. Tsai, y cols. Synergistic effect of cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2\*7 polymorphism with smoking on the onset of premature myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2007;195:199-206.
- Loh, P. T., H. X. Lou, Y. Zhao, Y. M. Chin and A. Vathsala. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2008;40:1690-1695.
- Lopez-Montenegro Soria, M. A., J. Kanter Berga, S. Beltran Catalan, J. Milara Paya, L. M. Pallardo Mateu and N. V. Jimenez Torres. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc* 2010;42:3031-3033.
- Lown, K. S., R. R. Mayo, A. B. Leichtman, H. L. Hsiao, D. K. Turgeon, P. Schmiedlin-Ren, y cols. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:248-260.
- Lowry, L. Y., R. R. Welbury, R. A. Seymour, P. J. Waterhouse and J. R. Hamilton. Gingival overgrowth in paediatric cardiac transplant patients: a study of 19 patients aged between 2 and 16 years. *Int J Paediatr Dent* 1995;5:217-222.
- Lum, B. L., S. Kaubisch, G. A. Fisher, B. W. Brown and B. I. Sikic. Effect of high-dose cyclosporine on etoposide pharmacodynamics in a trial to reverse P-glycoprotein (MDR1 gene) mediated drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:305-311.
- Lyson, T., L. D. Ermel, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber and R. G. Victor. Cyclosporine- and FK506-induced sympathetic activation correlates with calcineurin-mediated inhibition of T-cell signaling. *Circ Res* 1993;73:596-602.
- Ma, J., S. Ramachandran, F. T. Fiedorek, Jr. and D. C. Zeldin. Mapping of the CYP2J cytochrome P450 genes to human chromosome 1 and mouse chromosome 4. *Genomics* 1998;49:152-155.

- Macphee, I. A., S. Fredericks, M. Mohamed, M. Moreton, N. D. Carter, A. Johnston, y cols. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005;79:499-502.
- Macphee, I. A., S. Fredericks, T. Tai, P. Syrris, N. D. Carter, A. Johnston, y cols. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002;74:1486-1489.
- MacPhee, I. A., S. Fredericks, T. Tai, P. Syrris, N. D. Carter, A. Johnston, y cols. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:914-919.
- Madhun, Z. T., D. A. Goldthwait, D. McKay, U. Hopfer and J. G. Douglas. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid mediates angiotensin II-induced rises in cytosolic calcium in rabbit proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest* 1991;88:456-461.
- Maes, B. D. and Y. F. Vanrenterghem. Cyclosporine: advantages versus disadvantages vis-a-vis tacrolimus. *Transplant Proc* 2004;36:40S-49S.
- Maganto, E. (2000). Historia del trasplante renal. Trasplante renal. M. González and J. M. García. Madrid, Grupo Aula Médica, S. A. : 1-14.
- Mahalati, K., P. Belitsky, I. Sketris, K. West and R. Panek. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* 1999;68:55-62.
- Mahalati, K., P. Belitsky, K. West, B. Kiberd, A. Fraser, I. Sketris, y cols. Approaching the therapeutic window for cyclosporine in kidney transplantation: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:828-833.
- Mai, I., E. S. Perloff, S. Bauer, M. Goldammer, A. Johne, G. Filler, y cols. MDR1 haplotypes derived from exons 21 and 26 do not affect the steady-state pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58:548-553.

- Mai, I., E. Stormer, M. Goldammer, A. Johne, H. Kruger, K. Budde, y cols. MDR1 haplotypes do not affect the steady-state pharmacokinetics of cyclosporine in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003;43:1101-1107.
- Makita, K., J. R. Falck and J. H. Capdevila. Cytochrome P450, the arachidonic acid cascade, and hypertension: new vistas for an old enzyme system. *Faseb J* 1996;10:1456-1463.
- Marcen, R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs* 2009;69:2227-2243.
- Marshall, R., N. Ahsan, S. Dhillon, M. Holman and H. C. Yang. Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function. *Surgery* 1996;120:663-665; discussion 666.
- Martin, P. and P. Errasti. Trasplante renal. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006;29:79-92.
- Martinez, C., E. Garcia-Martin, G. Blanco, F. J. Gamito, J. M. Ladero and J. A. Agundez. The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2005;59:62-69.
- Masuda, S. and K. Inui. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther* 2006;112:184-198.
- Mathew, B. S., D. H. Fleming, V. Jeyaseelan, S. J. Chandy, V. M. Annapandian, P. K. Subbanna, y cols. A limited sampling strategy for tacrolimus in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:467-472.
- Maurer, G. and M. Lemaire. Biotransformation and distribution in blood of cyclosporine and its metabolites. *Transplant Proc* 1986;18:25-34.
- Mayer, A. D., J. Dmitrewski, J. P. Squifflet, T. Besse, B. Grabensee, B. Klein, y cols. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997;64:436-443.

- McDiarmid, S. V., P. Wallace, J. Vargas, M. E. Ament and R. W. Busuttil. The treatment of intractable rejection with tacrolimus (FK506) in pediatric liver transplant recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:291-299.
- McGiff, J. C. and J. Quilley. 20-HETE and the kidney: resolution of old problems and new beginnings. *Am J Physiol* 1999;277:R607-623.
- McGiff, J. C. and J. Quilley. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids and blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:231-237.
- McMaster, P. Patient and graft survival in the European Multicentre Liver Study--FK 506 vs. cyclosporin A. *Transpl Int* 1994;7 Suppl 1:S32-36.
- McMillan, M. A. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Pharmacol Ther* 1989;42:135-156.
- Meisel, P., J. Giebel, C. Kunert-Keil, P. Dazert, H. K. Kroemer and T. Kocher. MDR1 gene polymorphisms and risk of gingival hyperplasia induced by calcium antagonists. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79:62-71.
- Meng, X. G., C. X. Guo, G. Q. Feng, Y. C. Zhao, B. T. Zhou, J. L. Han, y cols. Association of CYP3A polymorphisms with the pharmacokinetics of cyclosporine A in early post-renal transplant recipients in China. *Acta Pharmacol Sin* 2012;33:1563-1570.
- Metalidis, C., E. Lerut, M. Naesens and D. R. Kuypers. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation* 2011;91:1098-1102.
- Mihatsch, M. J., M. Kyo, K. Morozumi, Y. Yamaguchi, V. Nickleit and B. Ryffel. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* 1998;49:356-363.
- Mihatsch, M. J., B. Ryffel, M. Hermle, F. P. Brunner and G. Thiel. Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin Nephrol* 1986;25 Suppl 1:S2-8.
- Min, D. I. and V. L. Ellingrod. Association of the CYP3A4\*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 2003;25:305-309.



- Min, S. I., S. Y. Kim, S. H. Ahn, S. K. Min, S. H. Kim, Y. S. Kim, y cols. CYP3A5 \*1 allele: impacts on early acute rejection and graft function in tacrolimus-based renal transplant recipients. *Transplantation* 2010;90:1394-1400.
- Miura, M., T. Nioka, H. Kagaya, M. Saito, M. Hayakari, T. Habuchi, y cols. Pharmacogenetic determinants for interindividual difference of tacrolimus pharmacokinetics 1 year after renal transplantation. *J Clin Pharm Ther* 2011;36:208-216.
- Molitoris, B. A. New insights into the cell biology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1991;1:1263-1270.
- Moller, A., K. Iwasaki, A. Kawamura, Y. Teramura, T. Shiraga, T. Hata, y cols. The disposition of <sup>14</sup>C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* 1999;27:633-636.
- Montebugnoli, L., D. Servidio and F. Bernardi. The role of time in reducing gingival overgrowth in heart-transplanted patients following cyclosporin therapy. *J Clin Periodontol* 2000;27:611-614.
- Moore, J., A. J. McKnight, B. Dohler, M. J. Simmonds, A. E. Courtney, O. J. Brand, y cols. Donor ABCB1 variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:1891-1899.
- Morales, J. and A. Andrés (2008). Necrosis tubular aguda. Rechazo del trasplante. Nefrología Clínica. L. Hernando, A. Aljama, M. Ariaset al. Buenos Aires; Madrid, Editorial Médica Panamericana: 1014-1034.
- Morozumi, K., A. Takeda, K. Uchida and M. J. Mihatsch. Cyclosporine nephrotoxicity: how does it affect renal allograft function and transplant morphology? *Transplant Proc* 2004;36:251S-256S.
- Mourad, M., G. Mourad, P. Wallemacq, V. Garrigue, C. Van Bellingen, V. Van Kerckhove, y cols. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005;80:977-984.

- Mourad, M., P. Wallemacq, M. De Meyer, D. Brandt, V. Van Kerkhove, J. Malaise, y cols. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:1192-1198.
- Mueller, A. R., K. P. Platz, W. O. Bechstein, N. Schattenfroh, G. Stoltenburg-Didinger, G. Blumhardt, y cols. Neurotoxicity after orthotopic liver transplantation. A comparison between cyclosporine and FK506. *Transplantation* 1994;58:155-170.
- Myrillas, T. T., G. J. Linden, J. J. Marley and C. R. Irwin. Cyclosporin A regulates interleukin-1beta and interleukin-6 expression in gingiva: implications for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1999;70:294-300.
- Naesens, M., E. Lerut, H. de Jonge, B. Van Damme, Y. Vanrenterghem and D. R. Kuypers. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:2468-2480.
- Nakamura, T., T. Sakaeda, M. Horinouchi, T. Tamura, N. Aoyama, T. Shirakawa, y cols. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:297-303.
- Neitzel, H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet* 1986;73:320-326.
- Noble, S. and A. Markham. Cyclosporin. A review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral). *Drugs* 1995;50:924-941.
- Numakura, K., S. Satoh, N. Tsuchiya, Y. Horikawa, T. Inoue, H. Kakinuma, y cols. Clinical and genetic risk factors for posttransplant diabetes mellitus in adult renal transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 2005;80:1419-1424.
- Nyberg, G., U. Haljamae, C. Frisenette-Fich, M. Wennergren and I. Kjellmer. Breast-feeding during treatment with cyclosporine. *Transplantation* 1998;65:253-255.

- Op den Buijsch, R. A., M. H. Christiaans, L. M. Stolk, J. E. de Vries, C. Y. Cheung, N. A. Undre, y cols. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007;21:427-435.
- Otte, J. B. History of pediatric liver transplantation. Where are we coming from? Where do we stand? *Pediatr Transplant* 2002;6:378-387.
- Ounissi, M., M. Cherif, T. B. Abdallah, M. Bacha, H. Hedri, E. Abderrahim, y cols. Risk factors and consequences of delayed graft function. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013;24:243-246.
- Paine, M. F., M. Khalighi, J. M. Fisher, D. D. Shen, K. L. Kunze, C. L. Marsh, y cols. Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;283:1552-1562.
- Paller, M. S. and H. S. Jacob. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7002-7006.
- Pérez, M. La Actividad científica de la Asociación Española de Urología recogida en las publicaciones periódicas. *Actas Urol Esp* 2006;30:735-748.
- Perico, N., D. Cattaneo, M. H. Sayegh and G. Remuzzi. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814-1827.
- Pescovitz, M. D. and R. Barbeito. Two-hour post-dose cyclosporine level is a better predictor than trough level of acute rejection of renal allografts. *Clin Transplant* 2002;16:378-382.
- Pirsch, J. D., J. Miller, M. H. Deierhoi, F. Vincenti and R. S. Filo. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997;63:977-983.
- Polonikov, A. V., V. P. Ivanov, M. A. Solodilova, I. V. Khoroshaya, M. A. Kozhuhov, V. E. Ivakin, y cols. A common polymorphism G-50T in cytochrome P450 2J2 gene is associated with increased risk of essential hypertension in a Russian population. *Dis Markers* 2008;24:119-126.

- Press, R. R., B. A. Ploeger, J. den Hartigh, T. van der Straaten, H. van Pelt, M. Danhof, y cols. Explaining variability in ciclosporin exposure in adult kidney transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66:579-590.
- Press, R. R., B. A. Ploeger, J. den Hartigh, T. van der Straaten, J. van Pelt, M. Danhof, y cols. Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2009;31:187-197.
- Ptachcinski, R., R. Venkataramanan and G. Burckart. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 1986;11:107-132.
- Qiu, X. Y., Z. Jiao, M. Zhang, L. J. Zhong, H. Q. Liang, C. L. Ma, y cols. Association of MDR1, CYP3A4\*18B, and CYP3A5\*3 polymorphisms with cyclosporine pharmacokinetics in Chinese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:1069-1084.
- Quteineh, L., C. Verstuyft, V. Furlan, A. Durrbach, A. Letierce, S. Ferlicot, y cols. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;103:546-552.
- Randhawa, P. S., R. Shapiro, M. L. Jordan, T. E. Starzl and A. J. Demetris. The histopathological changes associated with allograft rejection and drug toxicity in renal transplant recipients maintained on FK506. Clinical significance and comparison with cyclosporine. *Am J Surg Pathol* 1993;17:60-68.
- Rebbeck, T. R., J. M. Jaffe, A. H. Walker, A. J. Wein and S. B. Malkowicz. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1225-1229.
- Renders, L., M. Frisman, M. Ufer, I. Mosyagin, S. Haenisch, U. Ott, y cols. CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81:228-234.
- Rendic, S. and F. J. Di Carlo. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997;29:413-580.

- Rifkind, A. B., C. Lee, T. K. Chang and D. J. Waxman. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 1995;320:380-389.
- Roman, R. J., K. G. Maier, C. W. Sun, D. R. Harder and M. Alonso-Galicia. Renal and cardiovascular actions of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:855-865.
- Romero, M. F., Z. T. Madhun, U. Hopfer and J. G. Douglas. An epoxygenase metabolite of arachidonic acid 5,6 epoxy-eicosatrienoic acid mediates angiotensin-induced natriuresis in proximal tubular epithelium. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991;21A:205-208.
- Rong, G., L. Jing, L. Deng-Qing, Z. Hong-Shan, Z. Shai-Hong and N. Xin-Min. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2010;42:3455-3458.
- Roy, J. N., A. Barama, C. Poirier, B. Vinet and M. Roger. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:659-665.
- Sakaeda, T., T. Nakamura, M. Horinouchi, M. Kakumoto, N. Ohmoto, T. Sakai, y cols. MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;18:1400-1404.
- Sakairi, Y., H. R. Jacobson, T. D. Noland, J. H. Capdevila, J. R. Falck and M. D. Breyer. 5,6-EET inhibits ion transport in collecting duct by stimulating endogenous prostaglandin synthesis. *Am J Physiol* 1995;268:F931-939.
- Salama, N. N., Z. Yang, T. Bui and R. J. Ho. MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci* 2006;95:2293-2308.

- Santoro, A., C. R. Felipe, H. Tedesco-Silva, J. O. Medina-Pestana, C. J. Struchiner, E. B. Ojopi, y cols. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011;12:1293-1303.
- Sata, F., A. Sapone, G. Elizondo, P. Stocker, V. P. Miller, W. Zheng, y cols. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000;67:48-56.
- Satoh, S., H. Kagaya, M. Saito, T. Inoue, M. Miura, K. Inoue, y cols. Lack of tacrolimus circadian pharmacokinetics and CYP3A5 pharmacogenetics in the early and maintenance stages in Japanese renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:207-214.
- Satoh, S., M. Saito, T. Inoue, H. Kagaya, M. Miura, K. Inoue, y cols. CYP3A5 \*1 allele associated with tacrolimus trough concentrations but not subclinical acute rejection or chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:473-481.
- Satoh, T., H. T. Cohen and A. I. Katz. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATPase. II. Role of eicosanoids. *J Clin Invest* 1993;91:409-415.
- Sattler, M., F. P. Guengerich, C. H. Yun, U. Christians and K. F. Sewing. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 1992;20:753-761.
- Scarborough, P. E., J. Ma, W. Qu and D. C. Zeldin. P450 subfamily CYP2J and their role in the bioactivation of arachidonic acid in extrahepatic tissues. *Drug Metab Rev* 1999;31:205-234.
- Scholten, E. M., S. C. Cremers, R. C. Schoemaker, A. T. Rowshani, E. J. van Kan, J. den Hartigh, y cols. AUC-guided dosing of tacrolimus prevents progressive systemic overexposure in renal transplant recipients. *Kidney Int* 2005;67:2440-2447.
- Schroeder, T. J., S. Hariharan and M. R. First. Relationship between cyclosporine bioavailability and clinical outcome in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1994;26:2787-2790.

- Schuetz, E. G., W. T. Beck and J. D. Schuetz. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49:311-318.
- SENEFRO (2014). Informe de Diálisis y Trasplante 2013. Registros Autonómicos-de Enfermos Renales-ONT. Registro Español de Enfermos Renales. XLIV Congreso Nacional de Sociedad Española de Nefrología, Barcelona.
- Seymen, P., M. Yildiz, M. F. Turkmen, M. I. Titiz and H. O. Seymen. Effects of cyclosporine-tacrolimus switching in posttransplantation hyperlipidemia on high-density lipoprotein 2/3, lipoprotein a1/b, and other lipid parameters. *Transplant Proc* 2009;41:4181-4183.
- Seymour, R. A., D. G. Smith and S. R. Rogers. The comparative effects of azathioprine and cyclosporin on some gingival health parameters of renal transplant patients. A longitudinal study. *J Clin Periodontol* 1987;14:610-613.
- Seymour, R. A., J. M. Thomason and J. S. Ellis. The pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 1996;23:165-175.
- Shilbayeh, S. The impact of genetic polymorphisms on time required to attain the target tacrolimus levels and subsequent pharmacodynamic outcomes in pediatric kidney transplant patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2014;25:266-277.
- Shilbayeh, S., R. Zmeili and R. I. Almardini. The impact of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and trough concentrations in pediatric renal transplant recipients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013;24:1125-1136.
- Siedlecki, A., W. Irish and D. C. Brennan. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant* 2011;11:2279-2296.
- Siegmund, W., K. Ludwig, T. Giessmann, P. Dazert, E. Schroeder, B. Sperker, y cols. The effects of the human MDR1 genotype on the expression of duodenal P-glycoprotein and disposition of the probe drug talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:572-583.
- Siegmund, M. J., C. Cardarelli, I. Aksentijevich, Y. Sugimoto, I. Pastan and M. M. Gottesman. Ketoconazole effectively reverses multidrug resistance in highly resistant KB cells. *J Urol* 1994;151:485-491.

- Silva, H. T., Jr., H. C. Yang, M. Abouljoud, P. C. Kuo, K. Wisemandle, P. Bhattacharya, y cols. One-year results with extended-release tacrolimus/MMF, tacrolimus/MMF and cyclosporine/MMF in de novo kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7:595-608.
- Sim, S. (2007). *CYP2J2* allele nomenclature. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database Ingelman-Sundberg, M. Daly, AK. Nebert, DW.
- Sim, S. (2013). *CYP3A5* allele nomenclature. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database Ingelman-Sundberg, M. Daly, AK. Nebert, DW. Sim, S. (2014). *CYP3A4* allele nomenclature. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database Ingelman-Sundberg, M. Daly, AK. Nebert, DW.
- Singer, J., A. Gritsch and J. T. Rosenthal (2005). The transplant operation and its surgical complications. Handbook of kidney transplantation. G. Danovitch. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 193-211.
- Singh, N., A. Bonham and M. Fukui. Immunosuppressive-associated leukoencephalopathy in organ transplant recipients. *Transplantation* 2000;69:467-472.
- Singh, R., A. Srivastava, R. Kapoor and R. D. Mittal. Do drug transporter (ABCB1) SNPs influence cyclosporine and tacrolimus dose requirements and renal allograft outcome in the posttransplantation period? *J Clin Pharmacol* 2011;51:603-615.
- Singh, R., A. Srivastava, R. Kapoor, K. S. R and D. M. R. Impact of CYP3A5 and CYP3A4 gene polymorphisms on dose requirement of calcineurin inhibitors, cyclosporine and tacrolimus, in renal allograft recipients of North India. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009;380:169-177.
- Smith, H. E., J. P. Jones, 3rd, T. F. Kalhorn, F. M. Farin, P. L. Stapleton, C. L. Davis, y cols. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:943-953.
- Sole, X., E. Guino, J. Valls, R. Iñesta and V. Moreno. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 2006;22:1928-1929.



- Soyama, A., Y. Saito, K. Komamura, K. Ueno, S. Kamakura, S. Ozawa, y cols. Five novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2C8 gene, one of which induces a frame-shift. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:374-377.
- Spector, A. A., X. Fang, G. D. Snyder and N. L. Weintraub. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Prog Lipid Res* 2004;43:55-90.
- Spector, A. A. and A. W. Norris. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C996-1012.
- Spiecker, M., H. Darius, T. Hankeln, M. Soufi, A. M. Sattler, J. R. Schaefer, y cols. Risk of coronary artery disease associated with polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2. *Circulation* 2004;110:2132-2136.
- Spierings, N., D. W. Holt and I. A. MacPhee. CYP3A5 genotype had no impact on inpatient variability of tacrolimus clearance in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit* 2013;35:328-331.
- Staatz, C., P. Taylor and S. Tett. Low tacrolimus concentrations and increased risk of early acute rejection in adult renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1905-1909.
- Staatz, C. E., L. K. Goodman and S. E. Tett. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:141-175.
- Starzl, T. E., S. Iwatsuki, D. H. Van Thiel, J. C. Gartner, B. J. Zitelli, J. J. Malatack, y cols. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982;2:614-636.
- Stepkowski, S. M. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. *Expert Rev Mol Med* 2000;2:1-23.
- Sy, S. K., J. Heuberger, S. Shilbayeh, D. J. Conrado and H. Derendorf. A Markov chain model to evaluate the effect of CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms on adverse events associated with tacrolimus in pediatric renal transplantation. *AAPS J* 2013;15:1189-1199.

- Tada, H., N. Tsuchiya, S. Satoh, H. Kagaya, Z. Li, K. Sato, y cols. Impact of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) C3435T polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005;37:1730-1732.
- Taegtmeier, A. B., J. B. Breen, J. Smith, M. Burke, N. Leaver, P. Pantelidis, y cols. ATP-binding cassette subfamily B member 1 polymorphisms do not determine cyclosporin exposure, acute rejection or nephrotoxicity after heart transplantation. *Transplantation* 2010;89:75-82.
- Tanabe, M., I. Ieiri, N. Nagata, K. Inoue, S. Ito, Y. Kanamori, y cols. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1137-1143.
- Tang, H. L., L. L. Ma, H. G. Xie, T. Zhang and Y. F. Hu. Effects of the CYP3A5\*3 variant on cyclosporine exposure and acute rejection rate in renal transplant patients: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:525-531.
- Tang, H. L., H. G. Xie, Y. Yao and Y. F. Hu. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the CYP3A5 nonexpressers than expressers. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:713-720.
- Tavira, B., E. Coto, C. Diaz-Corte, V. Alvarez, C. Lopez-Larrea and F. Ortega. A search for new CYP3A4 variants as determinants of tacrolimus dose requirements in renal-transplanted patients. *Pharmacogenet Genomics* 2013;23:445-448.
- Tavira, B., E. Coto, C. Diaz-Corte, F. Ortega, M. Arias, A. Torres, y cols. Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2011;49:825-833.
- Terrazzino, S., M. Quaglia, P. Stratta, P. L. Canonico and A. A. Genazzani. The effect of CYP3A5 6986A>G and ABCB1 3435C>T on tacrolimus dose-adjusted trough levels and acute rejection rates in renal transplant patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 2012;22:642-645.

- Thervet, E., D. Anglicheau, B. King, M. H. Schlageter, B. Cassinat, P. Beaune, y cols. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003;76:1233-1235.
- Thervet, E., M. A. Lorient, S. Barbier, M. Buchler, M. Ficheux, G. Choukroun, y cols. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:721-726.
- Tirelli, S., M. Ferrareso, L. Ghio, E. Meregalli, V. Martina, M. Belingheri, y cols. The effect of CYP3A5 polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in adolescent kidney transplant recipients. *Med Sci Monit* 2008;14:CR251-254.
- Torio, A., I. Auyanet, O. Montes-Ares, R. M. Guerra, E. J. Fernandez, M. A. Perez, y cols. Effect of CYP3A51/3 polymorphism on blood pressure in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2012;44:2596-2598.
- Total, R. A. and A. E. Rettie. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:341-352.
- Toyokuni, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int* 1999;49:91-102.
- Tsuchiya, N., S. Satoh, H. Tada, Z. Li, C. Ohyama, K. Sato, y cols. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004;78:1182-1187.
- Turolo, S., A. S. Tirelli, M. Ferrareso, L. Ghio, M. Belingheri, E. Groppali, y cols. Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacol Rep* 2010;62:1159-1169.
- Undre, N. A., J. van Hooff, M. Christiaans, Y. Vanrenterghem, J. Donck, U. Heeman, y cols. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999;31:296-298.
- van der Velde, M., K. Matsushita, J. Coresh, B. C. Astor, M. Woodward, A. Levey, y cols. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-

- cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int* 2011;79:1341-1352.
- van Gelder, T., J. Klupp, M. J. Barten, U. Christians and R. E. Morris. Comparison of the effects of tacrolimus and cyclosporine on the pharmacokinetics of mycophenolic acid. *Ther Drug Monit* 2001;23:119-128.
- van Herwaarden, A. E., R. A. van Waterschoot and A. H. Schinkel. How important is intestinal cytochrome P450 3A metabolism? *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:223-227.
- van Schaik, R. H., I. P. van der Heiden, J. N. van den Anker and J. Lindemans. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002;48:1668-1671.
- Vannaprasaht, S., S. Reungjui, D. Supanya, D. Sirivongs, C. Pongskul, Y. Avihingsanon, y cols. Personalized tacrolimus doses determined by CYP3A5 genotype for induction and maintenance phases of kidney transplantation. *Clin Ther* 2013;35:1762-1769.
- Vasiliou, V., K. Vasiliou and D. W. Nebert. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 2009;3:281-290.
- Venkatachalam, M. A., D. B. Jones, H. G. Rennke, D. Sandstrom and Y. Patel. Mechanism of proximal tubule brush border loss and regeneration following mild renal ischemia. *Lab Invest* 1981;45:355-365.
- Venkataramanan, R., A. Swaminathan, T. Prasad, A. Jain, S. Zuckerman, V. Warty, y cols. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995;29:404-430.
- von Ahsen, N., M. Richter, C. Grupp, B. Ringe, M. Oellerich and V. W. Armstrong. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;47:1048-1052.
- Wacher, V. J., J. A. Silverman, Y. Zhang and L. Z. Benet. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci* 1998;87:1322-1330.
- Wang, C. P., W. C. Hung, T. H. Yu, C. A. Chiu, L. F. Lu, F. M. Chung, y cols. Genetic variation in the G-50T polymorphism of the cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2

- gene and the risk of younger onset type 2 diabetes among Chinese population: potential interaction with body mass index and family history. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010;118:346-352.
- Wang, D., A. D. Johnson, A. C. Papp, D. L. Kroetz and W. Sadee. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:693-704.
- Wang, Y., C. Wang, J. Li, X. Wang, G. Zhu, X. Chen, y cols. Effect of genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine concentration during the early stage after renal transplantation in Chinese patients co-treated with diltiazem. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:239-247.
- Wang, Y. Y., M. Zhang, F. M. Lu, Z. Jiao and X. Y. Qiu. CYP3A4 genetic polymorphisms predict cyclosporine-related clinical events in Chinese renal transplant recipients. *Chin Med J (Engl)* 2012;125:4233-4238.
- Watkins, P. B. The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;27:161-170.
- Webster, A. C., R. C. Woodroffe, R. S. Taylor, J. R. Chapman and J. C. Craig. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* 2005;331:810.
- Westlind, A., L. Lofberg, N. Tindberg, T. B. Andersson and M. Ingelman-Sundberg. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259:201-205.
- Wiederrecht, G., E. Lam, S. Hung, M. Martin and N. Sigal. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696:9-19.
- Wijdicks, E. F. Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. *Liver Transpl* 2001;7:937-942.
- Williamson, M. S., E. K. Miller, J. Plemons, T. Rees and A. M. Iacopino. Cyclosporine A upregulates interleukin-6 gene expression in human gingiva: possible mechanism for gingival overgrowth. *J Periodontol* 1994;65:895-903.

- Winkler, M., U. Jost, B. Ringe, G. Gubernatis, K. Wonigeit and R. Pichlmayr. Association of elevated FK 506 plasma levels with nephrotoxicity in liver-grafted patients. *Transplant Proc* 1991;23:3153-3155.
- Woillard, J. B., J. P. Rerolle, N. Picard, A. Rousseau, A. Guillaudeau, E. Munteanu, y cols. Donor P-gp polymorphisms strongly influence renal function and graft loss in a cohort of renal transplant recipients on cyclosporine therapy in a long-term follow-up. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:95-100.
- Wong, K. M., C. C. Shek, K. F. Chau and C. S. Li. Abbreviated tacrolimus area-under-the-curve monitoring for renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 2000;35:660-666.
- Wu, P., X. Ni, M. Wang, X. Xu, G. Luo and Y. Jiang. Polymorphisms in CYP3A5\*3 and MDR1, and haplotype modulate response to plasma levels of tacrolimus in Chinese renal transplant patients. *Ann Transplant* 2011;16:54-60.
- Wu, S., W. Chen, E. Murphy, S. Gabel, K. B. Tomer, J. Foley, y cols. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:12551-12559.
- Wu, S., C. R. Moomaw, K. B. Tomer, J. R. Falck and D. C. Zeldin. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J Biol Chem* 1996;271:3460-3468.
- Wu, S. N., Y. Zhang, C. O. Gardner, Q. Chen, Y. Li, G. L. Wang, y cols. Evidence for association of polymorphisms in CYP2J2 and susceptibility to essential hypertension. *Ann Hum Genet* 2007;71:519-525.
- Wysocki, G. P., H. A. Gretzinger, A. Laupacis, R. A. Ulan and C. R. Stiller. Fibrous hyperplasia of the gingiva: a side effect of cyclosporin A therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;55:274-278.
- Xin, H. W., H. M. Liu, Y. Q. Li, H. Huang, L. Zhang, A. R. Yu, y cols. Association of CYP3A4\*18B and CYP3A5\*3 polymorphism with cyclosporine-related liver injury in Chinese renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2014;52:497-503.

- Xu, Y., H. Ding, J. Peng, G. Cui, L. Liu, K. Cianflone, y cols. Association between polymorphisms of CYP2J2 and EPHX2 genes and risk of coronary artery disease. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:489-494.
- Yamauchi, A., I. Ieiri, Y. Kataoka, M. Tanabe, T. Nishizaki, R. Oishi, y cols. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 2002;74:571-572.
- Yanagimachi, M., T. Naruto, R. Tanoshima, H. Kato, T. Yokosuka, R. Kajiwara, y cols. Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms on calcineurin inhibitor-related neurotoxicity after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2010;24:855-861.
- Yang, B., L. Graham, S. Dikalov, R. P. Mason, J. R. Falck, J. K. Liao, y cols. Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2001;60:310-320.
- Yarlagadda, S. G., S. G. Coca, R. N. Formica, Jr., E. D. Poggio and C. R. Parikh. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1039-1047.
- Yarlagadda, S. G., S. G. Coca, A. X. Garg, M. Doshi, E. Poggio, R. J. Marcus, y cols. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2995-3003.
- Yasar, U., A. M. Bennet, E. Eliasson, S. Lundgren, B. Wiman, U. De Faire, y cols. Allelic variants of cytochromes P450 2C modify the risk for acute myocardial infarction. *Pharmacogenetics* 2003;13:715-720.
- Yates, C. R., W. Zhang, P. Song, S. Li, A. O. Gaber, M. Kotb, y cols. The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 2003;43:555-564.
- Zahir, H., G. McCaughan, M. Gleeson, R. A. Nand and A. J. McLachlan. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:298-309.

- Zeldin, D. C. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem* 2001;276:36059-36062.
- Zeldin, D. C., R. N. DuBois, J. R. Falck and J. H. Capdevila. Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform. *Arch Biochem Biophys* 1995;322:76-86.
- Zhang, L., H. Ding, J. Yan, R. Hui, W. Wang, G. E. Kissling, y cols. Genetic variation in cytochrome P450 2J2 and soluble epoxide hydrolase and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics* 2008a;18:45-51.
- Zhang, W., T. Otsuka, N. Sugo, A. Ardeshiri, Y. K. Alhadid, J. J. Iliff, y cols. Soluble epoxide hydrolase gene deletion is protective against experimental cerebral ischemia. *Stroke* 2008b;39:2073-2078.
- Zhang, X., Z. H. Liu, J. M. Zheng, Z. H. Chen, Z. Tang, J. S. Chen, y cols. Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clin Transplant* 2005;19:638-643.
- Zhang, Y. and L. Z. Benet. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:159-168.
- Zhang, Y., J. L. Li, Q. Fu, X. D. Wang, L. S. Liu, C. X. Wang, y cols. Associations of ABCB1, NFKB1, CYP3A, and NR1I2 polymorphisms with cyclosporine trough concentrations in Chinese renal transplant recipients. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34:555-560.
- Zhao, Y., M. Song, D. Guan, S. Bi, J. Meng, Q. Li, y cols. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005;37:178-181.
- Zheng, H. X., A. Zeevi, K. McCurry, E. Schuetz, S. Webber, J. Ristich, y cols. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol* 2005;14:37-42.
- Zhu, H. J., S. H. Yuan, Y. Fang, X. Z. Sun, H. Kong and W. H. Ge. The effect of CYP3A5 polymorphism on dose-adjusted cyclosporine concentration in renal transplant recipients: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 2011;11:237-246.



- Zhu, L., H. T. Song, Q. H. Wang, W. Z. Wu, S. L. Yang and J. M. Tan. [Effect of CYP3A4\*18B, CYP3A5\*3 gene polymorphism on dosage and concentration of tacrolimus in renal transplant patients]. *Yao Xue Xue Bao* 2012;47:878-883.
- Zochowska, D., J. Wyzgal and L. Paczek. Impact of CYP3A4\*1B and CYP3A5\*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients. *Ann Transplant* 2012;17:36-44.
- Zou, A. P., J. T. Fleming, J. R. Falck, E. R. Jacobs, D. Gebremedhin, D. R. Harder, y cols. Stereospecific effects of epoxyeicosatrienoic acids on renal vascular tone and K(+)-channel activity. *Am J Physiol* 1996;270:F822-832.

## **8. PUBLICACIONES**

## ORIGINAL ARTICLE

# Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation

Guillermo Gervasini,<sup>1</sup> Montserrat Garcia,<sup>1</sup> Rosa María Macias,<sup>2</sup> Juan Jose Cubero,<sup>2</sup> Francisco Caravaca<sup>2</sup> and Julio Benitez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical and Surgical Therapeutics, Medical School, University of Extremadura, Badajoz, Spain

<sup>2</sup> Service of Nephrology, Infanta Cristina Hospital, Badajoz, Spain

## Keywords

*ABCB1*, *CYP3A*, polymorphisms, renal transplant, tacrolimus.

## Correspondence

Guillermo Gervasini PhD, Department of Medical and Surgical Therapeutics, Medical School, University of Extremadura, Av. Elvas s/n 06071, Badajoz, Spain.  
Tel.: +34 927 257 120;  
fax: +34 927 257 106;  
e-mail: ggervasini@unex.es

## Conflicts of Interest

The authors have declared no conflicts of interest.

Received: 14 October 2011

Revision requested: 7 November 2011

Accepted: 23 January 2012

Published online: 28 February 2012

doi:10.1111/j.1432-2277.2012.01446.x

## Introduction

The clinical use of tacrolimus is hampered by a narrow therapeutic window and its large interindividual variability in its pharmacokinetics (PKs) [1]. In the last years, a number of studies have shown that pharmacogenetics could be helpful in tailoring immunosuppressant therapy to the needs of transplant recipients [2,3]. *CYP3A4* and *CYP3A5* are the major enzymes responsible for tacrolimus biotransformation [4] and hence have received much attention regarding the presence of functional polymorphisms that could affect their activity. Amongst the most frequently studied polymorphisms, *CYP3A5\*3* is the most common *CYP3A5* allele in Caucasians and produces a nonfunctional protein [5]. It has been shown that transplant recipients with at least one *CYP3A5\*1* allele

## Summary

We retrospectively examined the association of polymorphisms in the *CYP3A*, *CYP2J2*, *CYP2C8*, and *ABCB1* genes with pharmacokinetic (PKs) and pharmacodynamic (PDs) parameters of tacrolimus in 103 renal transplant recipients for a period of 1 year. *CYP3A5* expressers had lower predose concentrations ( $C_0$ )/dose and higher dose requirements than nonexpressers throughout the study. Among *CYP3A5\*1* carriers, those also carrying the *CYP3A4\*1B* allele showed the lowest  $C_0$ /dose, as compared with *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3* carriers ( $54.28 \pm 26.45$ ,  $59.12 \pm 24.00$ ,  $62.43 \pm 41.12$ , and  $57.01 \pm 17.34$  vs.  $112.37 \pm 76.60$ ,  $123.21 \pm 59.57$ ,  $163.34 \pm 76.23$ , and  $183.07 \pm 107.82$  at 1 week, 1 month, 5 months, and 1 year after transplantation). In addition, *CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1* carriers showed significantly lower dose-corrected exposure than *CYP3A4\*1/CYP3A5\*1* carriers 1 year after transplantation ( $57.01 \pm 17.34$  vs.  $100.09 \pm 24.78$ ;  $P = 0.016$ ). Only the *ABCB1* TGC (3435-2677-1236) haplotype showed a consistent association with PDs (nephrotoxicity; OR = 4.73; CI: 1.3–16.7;  $P = 0.02$ ). Our findings indicate that the *CYP3A4\*1B-CYP3A5\*1* haplotype may have a more profound impact in tacrolimus PKs than the *CYP3A5\*1* allele. This study does not support a critical role of the *CYP450* or *ABCB1* single nucleotide polymorphisms in the occurrence of toxicity or acute rejection in renal transplant recipients treated with tacrolimus.

(expressing *CYP3A5* protein) show lower tacrolimus concentration to dose ratios and higher dose requirements than nonexpressers (carriers of the *CYP3A5\*3/\*3* genotype) [6–8]. More controversy exists, however, regarding the clinical significance of the major polymorphism in the *CYP3A4* gene (*CYP3A4\*1B*) [9–11].

Tacrolimus is also a substrate for P-glycoprotein (P-gp, *ABCB1*, *MDR1*) [12], an efflux transporter that limits the oral absorption of its substrates among other functions. Despite large research efforts, reported results on the influence of the major *ABCB1* polymorphisms (C1236T, G2177T/A and C1236T) on tacrolimus PKs and pharmacodynamics (PDs) are still inconclusive [13,14].

In addition, there are other CYP enzymes that could affect the outcome of renal transplantation. *CYP2C8* and *CYP2J2* are polymorphically expressed in the kidney and

are involved in the synthesis of epoxyeicosatrienoic acids (EETs) [15–18], which play a protective role by vasodilator mechanisms against processes that could lead to acute rejection or toxicity.

In the present work, our goal was to identify relevant single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes in the aforementioned enzymes and transporters in a population of renal transplant recipients treated with tacrolimus. These genetic variants were retrospectively associated with PK parameters collected during 1 year after the transplant, as well as with kidney function and the occurrence of tacrolimus-related adverse effects and acute rejection.

## Patients and methods

### Study population

The study included 103 consecutive adult renal transplant recipients who received a single kidney at the Infanta Cristina Hospital (Badajoz, Spain) between June 2000 and February 2003 and were administered a tacrolimus-based immunosuppressive therapy. The Infanta Cristina Hospital is a 890-bed hospital situated in a rural area of Spain where people of mostly Caucasian ethnicity live. The transplant program started in 1990 and as a result, most patients presented here were nonimmunized and received a first kidney allograft (Table 1). All patients reported herein received a kidney from a deceased donor, as no

transplants from living donors are performed in our institution.

Initial dosage of tacrolimus was 0.1 mg/kg twice a day for all patients and was subsequently adjusted according to blood concentrations. Tacrolimus target levels were 7–15 ng/ml between June 2000 and September 2001, and were then adjusted to 10–15 ng/ml (months 0–3) and 5–10 ng/ml (months 4–12) between October 2001 and February 2003.

Tacrolimus was given in combination with mycophenolate mofetil (2 g/day) and a tapering schedule of steroids (500 mg IV methylprednisolone at the time of surgery, 125 mg IV the following day, and then 20 mg of oral prednisone daily, which was progressively tapered to 5 mg daily at 2 months after transplantation). Thirty-one patients (30.1%) received antibodies against the interleukin 2 receptor. Induction therapy with antithymocyte globulin was not implemented. Subjects with a chronic use of substances known to interfere with tacrolimus absorption, distribution, metabolism, and excretion (e.g. macrolides, rifampin, phenytoin, carbamezipine, etc.) were excluded from the study.

All participants were of Caucasian origin and gave oral and written consent for their participation. The study was approved by the Ethics Committee of the Infanta Cristina University Hospital and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

**Table 1.** PK parameters and clinical characteristics of renal transplant recipients ( $n = 103$ ) at the four time points considered in the study.

	1 Week	1 Month	5 Months	1 Year
$C_0$ (ng/ml)*	12.1 ± 5.3	11.8 ± 3.9	9.8 ± 3.6	8.3 ± 3.3
Dose (mg/kg)	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.05	0.06 ± 0.04
Weight (kg)	69.0 ± 14.2	68.9 ± 13.8	72.0 ± 13.9	72.6 ± 15.0
$C_0$ /dose (ng/ml per mg/day per kg body weight)	107.2 ± 74.9	117.5 ± 59.8	155.6 ± 77.8	172.4 ± 107.3
Serum creatinine (mg/dl)	2.4 ± 1.8	1.7 ± 1.0	1.5 ± 0.7	1.4 ± 0.6
Creatinine clearance (ml/min)	57.1 ± 28.0	61.5 ± 28.8	71.2 ± 32.5	80.9 ± 38.3
% Recipients below target concentration range†	35.4	32.4	3.0	7.1
% Recipients within target concentration range†	44.4	49.0	57.4	72.4
% Recipients above target concentration range†	20.2	18.6	39.6	20.4
Duration of dialysis before transplantation (years)				3.7 ± 3.1
Number of transplants (first/second)				97/6
Cold ischemia (hours)				16.8 ± 5.4
Mismatch HLA-A				1.2 ± 0.7
Mismatch HLA-B				1.3 ± 0.6
Mismatch HLA-DR				0.6 ± 0.6
PRA activity max				9.7 ± 17.9
PRA activity max. >50%				6 (5.8)
DGF				26 (25.2)

Data are shown as number (percentage) or mean ± standard deviation.

\* $C_0$ , predose concentrations.

†Target concentrations range was 10–15 ng/ml during the first month and 5–10 ng/ml for the third month onwards.

## Data collection

Tacrolimus predose concentrations ( $C_0$ ; ng/ml), daily doses (mg/kg), and dose-normalized predose concentrations ( $C_0$ /dose; ng/ml per mg/day per kg body weight) were retrieved from medical records at 1 week, 1 month, 5 months, and 1 year after transplantation. Tacrolimus blood concentrations were routinely measured using an immunoassay performed using a Cobas Mira Plus analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Renal function was assessed by estimating the glomerular filtration rate (GFR) from serum creatinine, using the 4-variable modification of diet in renal disease formula [19],  $GFR = 186(Cr^{-1.154} \times age^{-0.203}) \times (1.212 \text{ if black}) \times (0.742 \text{ if female})$ . Delayed graft function (DGF) was defined according to standard criteria, creatinine clearance <10 ml/min during the first 3 days post-transplantation and/or the need for dialysis treatment during the first postoperative week [20].

CNIT was diagnosed by experienced nephrologists based on (i) impairment of renal function defined by elevated serum creatinine values (25% increase from basal figures) coinciding with high tacrolimus plasma levels with subsequent decrease following dose reduction and/or (ii) exclusion of renal impairment as a result of acute rejection either proved by biopsy and/or judged by clinical evaluation when patients presented with a rise  $\geq 0.30$  mg/dl in serum creatinine not coincidental with supratherapeutic tacrolimus predose concentrations, fever without signs of infection, graft swelling, or tenderness, oliguria, increased resistive index on Doppler ultrasonography or clinical response to steroid treatment consistent with rejection. Acute allograft rejection was established by histological findings in renal biopsies according to the 1997 Banff classification and/or by clinical evaluation (see above). Diagnosis was confirmed by biopsy in all corticoid-resistant patients.

Symptoms defining neurotoxicity included tremor, headache, insomnia, hyperesthesia, itching, and seizures. As part of the protocol followed in our center, patients were specifically questioned about the presence of these neurologic symptoms.

## Genotyping analyses

Blood samples were drawn from each subject and immediately stored at  $-80^\circ\text{C}$  until genotype analysis. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes in each subject's whole-blood sample using a QIAamp DNA Blood Kit method (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, USA).

Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis were used for the determination of the *CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C8\*3*, and

*CYP2J2\*7* variants following previously described protocols [21–24]. The analysis of index samples was duplicated and confirmed by direct sequencing. The three major *ABCB1* polymorphisms, namely C1236T, G2677T/A, and C3435T were detected by direct sequencing (ABI3700 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) using primers and PCR conditions previously described [25].

## Statistical analyses

The distribution of the outcome variables was tested by the Kolmogorov–Smirnov test for normality. The statistical significance of the differences of quantitative variables (dose-adjusted predose concentrations, dose requirements, creatinine values, etc.) among individuals with different genotypes was calculated by using the ANOVA-Bonferroni or Kruskal–Wallis tests, as appropriate. When only two different genotypes were considered, T-student or Mann–Whitney tests were applied. Fisher's exact test or Pearson's  $X^2$  was used for the univariate analysis of the associations between categorical data (incidence of acute rejection or adverse effects) in the different genotype groups.

The statistical power of the sample size was evaluated with a genetic model analyzing the frequency for carriers of the variant alleles with arbitrarily established effect size at 2.5 ( $\alpha = 0.05$ ). With the available sample size, the power for unilateral associations with efficacy and safety parameters was 0.831. Power calculations were made using the program G\*Power version 3.1.3.

The effect of haplotypes on quantitative variables was calculated through linear regression modeling assuming an additive mode of inheritance using SNPstats [26] and Hapstat software version 3.0. For binary traits, the logistic regression model was employed, and the regression parameters pertained to the log odds ratios. Differences were considered significant when *P* values were under 0.05.

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 15.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

A total of 103 renal transplant recipients (41 women) with a mean age of  $48.7 \pm 16.9$  years at the time of transplantation were included in the study. Underlying diseases for renal failure were classified as followed: glomerulonephritis (33.0%), chronic interstitial nephritis (11.7%), polycystic kidney disease (9.7%), diabetic nephropathy (7.8%), and uncertain (28.2%). Other causes (9.7%) included Alport's syndrome, hemolytic uremic syndrome,

nephroangiosclerosis, nephronophthisis, and ischemic nephropathy. Additional clinical characteristics of the patients at the four time points considered in the study are shown in Table 1.

Table 2 shows the frequency of the seven studied polymorphisms (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C8\*3*, *CYP2J2\*7*, and *ABCB1* C3435T, G2677T/A, and C1236T). Genotype frequencies did not show statistically significant differences from those expected by the Hardy-Weinberg principle. One *CYP3A5\*1/\*1* subject was identified and included in the *CYP3A5\*1/\*3* group for statistical purposes, as it is assumed that only one *CYP3A5\*1* allele is enough to express the protein. There was a moderately high degree of linkage disequilibrium between the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*1* SNPs ( $D' = 0.99$ ,  $r^2 = 0.44$ ) that resulted in all the subjects carrying the *CYP3A4\*1B* variant also having the *CYP3A5\*1* allele. Linkage disequilibrium was also observed between the *ABCB1* G2677T and C3435T SNPs ( $D' = 0.90$ ,  $r^2 = 0.57$ ), the *ABCB1* G2677T, and C1236T SNPs ( $D' = 0.90$ ,  $r^2 = 0.67$ ) and between the *ABCB1* C3435T and C1236T SNPs ( $D' = 0.71$ ,  $r^2 = 0.43$ ). No further significant linkage was found between other combinations of SNPs ( $r^2 < 0.1$ ).

#### Effect of CYP3A4 and CYP3A5 genotypes on tacrolimus predose concentrations and dose requirements

The presence of the *CYP3A5\*1* allele was strongly associated with lower dose-corrected tacrolimus trough blood levels ( $C_0$ ) at all time points considered (Table 3). Furthermore, carriers of the *CYP3A4\*1B* variant allele displayed tacrolimus predose concentrations that were on average 59% lower than those of subjects with the *CYP3A4\*1/\*1* genotype (Table 3). A gene-dose effect was observed when the combination of both the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3* SNPs was analyzed. Mean tacrolimus dose-adjusted  $C_0$  values throughout the study were 145.59, 86.89 and 58.21 ng/ml per mg/kg/day for the *3A4\*1-3A5\*3*, *3A4\*1-3A5\*1*, and *3A4\*1B-3A5\*1* haplo-

**Table 2.** Distribution of allelic and genotypic frequencies in 103 renal transplant recipients.

Polymorphism	wt/wt, n (%)	wt/m, n (%)	m/m, n (%)	MAF
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	98 (95)	5 (5)	0 (0)	0.02
<i>CYP3A5</i> *1/*3	1 (1)	9 (9)	93 (90)	0.05
<i>CYP2C8</i> *1/*3	74 (72)	27 (26)	2 (2)	0.15
<i>CYP2J2</i> *1/*7	99 (96)	4 (4)	0 (0)	0.02
<i>ABCB1</i> C3435T	31 (30)	50 (49)	22 (21)	0.46
<i>ABCB1</i> G2677T/A	40 (39)	49 (47)*	14 (14)	0.37
<i>ABCB1</i> C1236T	34 (33)	52 (50)	17 (0.17)	0.42

*n*, Number of subjects; MAF, minor allele frequency; m, mutant; wt, wild type.

\*One subject was carrier of one *ABCB1* 2677A allele.

types, respectively (Table 3). *P* values for the significance of the difference between the three haplotypes were 0.120, 0.012, 0.006, and 0.010 at 1 week, 1 month, 5 months, and 1 year, respectively. The difference in dose-corrected exposure between *CYP3A5* expressers carrying or not carrying the *CYP3A4\*1B* allele reached statistical significance 1 year after grafting ( $P = 0.016$ ).

Table 4 depicts dose requirements for carriers of the different genotypes analyzed. *CYP3A5\*1* carriers showed significantly higher values at 1, 5, and 12 months after transplantation. Dose requirements for the *3A4\*1-3A5\*1* and *3A4\*1B-3A5\*1* haplotypes were approximately 2-fold higher than those showed by the most common *3A4\*1-3A5\*3* combination. *P* values for the statistical significance of the difference between the three combined genotypes were 0.892, <0.01, <0.001, and <0.01 at 1 week, 1 month, 5 months, and 1 year, respectively.

Remarkably, none of the *CYP3A5* expressers who were also harboring the *CYP3A4\*1B* variant reached target predose concentrations during the first month post-transplantation. However, because of the two different criteria followed to define predose concentration target range (see Methods section), a formal statistical analysis could not be performed and hence this particular observation should be taken with caution.

#### Effect of ABCB1 genotypes/haplotypes on tacrolimus predose concentrations and dose requirements

None of the *ABCB1* polymorphisms studied (C3435T, G2677T/A or C1236T) was individually associated with  $C_0$ /dose values or dose requirements (data not shown). In the same manner, there were no significant differences between the major wild type (CGC, frequency = 0.48) and mutant (TTT, frequency = 0.34) *ABCB1* haplotypes.

However, when the analysis was confined only to *CYP3A5* nonexpressers (*CYP3A5\*3/\*3* carriers), a statistical trend was observed towards lower dose-corrected exposure and higher dose requirements in those patients carrying 4 to 6 *ABCB1* variants ( $n = 69$ ) compared with patients with 0 to 3 variants ( $n = 22$ ) (Table 5).

#### Associations with clinical outcomes

Renal function measured as creatinine clearance was not statistically significantly different between the *CYP3A* or *ABCB1* genotypes or haplotypes studied. DGF was observed in 26 patients (25.2%) and was found to be moderately associated with the presence of the *CYP2C8\*3/\*3* genotype [OR = 2.4, CI (0.9–6.1),  $P = 0.05$ , vs. *CYP2C8\*1* carriers].

Out of the 103 kidney transplant recipients included in the study, 19 (18.4%) developed CNIT during the

**Table 3.** Effect of *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes on tacrolimus predose concentrations at the four different time points considered.

Genotype	n	Predose concentrations (ng/ml per mg/day per kg body weight)			
		1 Week	1 Month	5 Months	12 Months
All	103	107.18 ± 74.93	117.48 ± 59.82	155.62 ± 77.76	172.40 ± 107.35
<i>CYP3A4</i> *1/*1	98	110.03 ± 75.70	120.48 ± 59.61	160.47 ± 76.25	178.61 ± 106.64
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	5	54.28 ± 26.45	59.12 ± 24.00†*	62.43 ± 41.12†**	57.01 ± 17.34†***
<i>CYP3A5</i> *3/*3	93	112.37 ± 76.60	123.21 ± 59.57	163.34 ± 76.23	183.07 ± 107.82
<i>CYP3A5</i> expressers	10	61.53 ± 34.99†**	64.74 ± 29.17†**	85.38 ± 54.74†**	78.54 ± 30.37†***
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *3	93	112.37 ± 76.60	123.21 ± 59.57	163.34 ± 76.23	183.07 ± 107.82
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *1	5	68.77 ± 43.86	70.36 ± 35.49§*	108.32 ± 61.11	100.09 ± 24.78§*
<i>3A4</i> *1 <i>B</i> / <i>3A5</i> *1	5	54.28 ± 26.45§*	59.12 ± 24.00§*	62.43 ± 41.12§**	57.01 ± 17.34§***

Values shown are mean ± standard deviation. Because of the existing linkage disequilibrium, values for *CYP3A5* nonexpressers are the same as those shown by carriers of the *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3 haplotype. In the same manner, all the patients who carried the *CYP3A4*\*1*B* variant were also carriers of the *CYP3A*\*1*B*-*CYP3A5*\*1 haplotype and hence displayed values are identical.

\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001.

†*P* value vs. *CYP3A4*\*1/\*1 carriers.

‡*P* value vs. *CYP3A5*\*3/\*3 carriers.

§*P* value vs. *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3 carriers.

**Table 4.** Effect of *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes on tacrolimus dose requirements at the four different time points considered.

Genotype	n	Dose requirements (mg/kg)			
		1 Week	1 Month	5 Months	12 Months
All	103	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.05	0.06 ± 0.04
<i>CYP3A4</i> *1/*1	98	0.13 ± 0.06	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.04	0.06 ± 0.04
<i>CYP3A4</i> *1/*1 <i>B</i>	5	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.05†**	0.12 ± 0.04†***
<i>CYP3A5</i> *3/*3	93	0.13 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.04
<i>CYP3A5</i> expressers	10	0.14 ± 0.05	0.16 ± 0.04†**	0.13 ± 0.05†]	0.12 ± 0.05†***
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *3	93	0.13 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.04
<i>3A4</i> *1/ <i>3A5</i> *1	5	0.14 ± 0.06	0.17 ± 0.04§**	0.12 ± 0.06§**	0.11 ± 0.05§*
<i>3A4</i> *1 <i>B</i> / <i>3A5</i> *1	5	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.05§***	0.12 ± 0.04§**

Values shown are mean ± standard deviation. Because of the existing linkage disequilibrium, values for *CYP3A5* nonexpressers are the same as those shown by carriers of the *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3 haplotype. In the same manner, all the patients who carried the *CYP3A4*\*1*B* variant were also carriers of the *CYP3A*\*1*B*-*CYP3A5*\*1 haplotype and hence displayed values are identical.

\**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, †*P* < 0.0001.

†*P* value vs. *CYP3A4*\*1/\*1 carriers.

‡*P* value vs. *CYP3A5*\*3/\*3 carriers.

§*P* value vs. *CYP3A4*\*1/*CYP3A5*\*3 carriers.

**Table 5.** Effect of the number of *ABCB1* variant alleles on dose-adjusted predose concentrations and dose requirements in *CYP3A5* nonexpressers (*n* = 93). Mean ± standard deviation values are shown.

<i>ABCB1</i> variants	n	1 Week	<i>P</i>	1 Month	<i>P</i>	5 Months	<i>P</i>	12 Months	<i>P</i>
Dose-corrected predose concentrations (ng/ml per mg/day per kg body weight)									
0–3	70	110.04 ± 55.28	0.64	127.82 ± 62.05	0.13	168.51 ± 75.84	0.25	191.13 ± 114.44	0.21
4–6	23	118.87 ± 122.19		105.59 ± 47.80		146.74 ± 78.55		156.40 ± 82.18	
Dose requirements (mg/kg)									
0–3	70	0.12 ± 0.06	0.06	0.11 ± 0.05	0.01	0.07 ± 0.04	0.09	0.05 ± 0.04	0.14
4–6	23	0.15 ± 0.06		0.14 ± 0.05		0.09 ± 0.04		0.07 ± 0.04	

period of study. Diagnosis was confirmed by biopsy in six patients. No protocol biopsies were performed in individuals with stable graft function. Sixteen patients

(15.5%) underwent acute rejection according to diagnostic criteria described in the Methods section (diagnosis was confirmed by biopsy in three of those

subjects). Fourteen (13.6%) individuals showed neurotoxicity.

No *CYP3A4/CYP3A5* SNPs or haplotypes showed a significant effect on tacrolimus-induced toxicity (Table 6). In contrast, both the *ABCB1* 2677GG and 1236CC wild type genotypes increased the risk for neurotoxic events [OR (CI) = 3.12 (1.0–10.7),  $P = 0.04$  and OR (CI) = 3.19 (1.1–10.4),  $P = 0.04$ ; respectively] in analyses carried out considering a dominant model of inheritance (2677GG vs. GT+TT carriers or 1236CC vs. CT + TT carriers, respectively). No further associations were found for the rest of the *ABCB1* SNPs (data not shown).

Four major *ABCB1* haplotypes (3435-2677-1236), namely CGC, TTT, TGC, and CGT, were identified in the population of study and their associations with the occurrence of adverse effects are depicted in Table 6. Four other rare haplotypes, namely TGT, TTC, CTT, and CTC, were also identified with frequencies equal to or lower than 0.01, and hence their associations with toxicity were not tested. Most notably, and in comparison with the wildtype CGC haplotype, the TGC haplotype significantly increased the risk for CNIT [OR (CI) = 4.73 (1.3–16.7),  $P = 0.02$ ]. In addition, the mutant TTT haplotype was observed to moderately reduce the risk for neurotoxicity [OR (CI) = 0.34 (0.1–1.0),  $P = 0.05$ ] (Table 6). The analyzed SNPs in the EETs-synthesizing genes *CYP2C8\*3* and *CYP2J2\*7* were not associated with tacrolimus toxicity.

Finally, no associations were found between SNPs affecting tacrolimus blood levels or dose requirements and the occurrence of acute rejection. In the same manner, we did not observe any significant association between acute rejection and polymorphisms in the *ABCB1*, *CYP2C8*, or *CYP2J2* genes (Table 6).

## Discussion

Our findings confirm in our population previous data indicating that renal transplant recipients who are carriers of the *CYP3A5\*1* allele display lower dose-corrected exposure and higher dose requirements of tacrolimus. Overall, mean  $C_0$ /dose in *CYP3A5* expressers was 50.5% lower than that of nonexpressers, which is also consistent with previous studies reporting an approximate halving of the tacrolimus  $C_0$ /dose [11,27,28]. Less and more controversial data are available on the effect of the *CYP3A4\*1B* SNP [10,29]. We observed that the *CYP3A4\*1B* variant was associated with lower  $C_0$ /dose levels and higher dose requirements. However, linkage disequilibrium between *CYP3A4* and *CYP3A5* SNPs resulted in all *CYP3A4\*1B* carriers also harboring the *CYP3A5\*1* allele, and therefore the possibility exists that the observed clinical impact could be a consequence of the *CYP3A5\*1* allele [11]. Still, our results suggest otherwise. PK data were different depending on the *CYP3A4/CYP3A5* haplotype. *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3* carriers showed the highest predose concentrations followed by *3A4\*1/3A5\*1* patients and then by *3A4\*1B/3A5\*1* carriers, which would indicate a significant role of the *CYP3A4\*1B*. Furthermore, we observed that differences between the two groups of *CYP3A5* expressers (carrying or not carrying the *CYP3A4\*1B* variant) increased significantly over time. In this regard, Kuypers *et al.* [30] found a similar trend for the same three *CYP3A4-CYP3A5* haplotypes in 95 renal transplant recipients for an extended period of 5 years. However, in the study by Kuypers *et al.*,  $C_0$ /dose values were not corrected by weight and statistical differences between the two groups of *CYP3A5* expressers were not

**Table 6.** Effect of *CYP450* polymorphisms and *ABCB1* haplotypes (3435-2677-1236) on the clinical outcome of renal transplantation. Percentages of patients or estimated haplotype frequencies in the different groups are shown.

Genotype/haplotype	Nephrotoxicity			Neurotoxicity			Acute rejection		
	No	Yes	OR (CI)	No	Yes	OR (CI)	No	Yes	OR (CI)
<i>3A4*1-3A5*3</i>	89.3	94.7	Ref.	88.8	100	Ref.	89.7	93.8	Ref.
<i>3A4*1-3A5*1</i>	6.0	0.0	NC	5.6	0.0	NC	5.7	0.0	NC
<i>3A4*1B-3A5*1</i>	4.8	15.3	1.04 (0.1–9.9)	5.6	0.0	NC	4.6	6.3	1.3 (0.1–12.4)
<i>ABCB1</i>									
CGC	48.2	44.7	Ref.	45.5	60.7	Ref.	48.0	43.5	Ref.
TTT	32.9	36.8	1.13 (0.5–2.6)	36.2	17.9	0.34 (0.1–1.0)*	33.1	37.2	1.41 (0.6–3.4)
TGC	6.2	18.4	4.73 (1.3–16.7)**	7.6	14.3	2.00 (0.5–8.2)	9.2	6.6	1.1 (0.2–6.0)
CGT	5.8	0.0	NC	4.3	7.1	1.27 (0.2–7.8)	5.9	0.0	NC
<i>CYP2C8*1/*1</i>	70.2	78.9	Ref.	71.9	71.4	Ref.	73.6	62.5	Ref.
<i>CYP2C8*1/*3 + *3/*3</i>	29.8	21.1	0.63 (0.2–2.1)	28.1	28.6	1.02 (0.3–3.6)	26.4	37.5	1.58 (0.5–4.8)
<i>CYP2J2*1/*1</i>	96.4	94.7	Ref.	95.5	100.0	Ref.	95.4	100	Ref.
<i>CYP2J2*1/*7</i>	3.6	5.3	1.5 (0.1–15.2)	4.5	0.0	NC	4.6	0 (0)	NC

\* $P = 0.05$ ; \*\* $P = 0.02$ .

Ref., reference; NC, noncalculable; OR, Odds ratio with 95% confidence intervals (CI).



tested, which makes comparisons with our results difficult. One of the putative explanations for the differences observed between the different *CYP3A4-CYP3A5* haplotypes could be the tapering of glucocorticoids. These drugs are known *CYP3A4* inducers [31], and hence lower doses would lead to a decrease induction and subsequent higher drug exposure. This would be particularly noticeable in carriers of the wild type allele, as it has been shown that the *CYP3A4\*1B* variant is less responsive to drug inducibility [32].

In accordance with the majority of studies (reviewed by Staatz *et al.* [13]), we found no evidence of a significant role of *ABCB1* SNPs or haplotypes on tacrolimus PKs. It is possible that those studies reporting a PK impact of *ABCB1* SNPs may in fact be observing the effect of *CYP3A* variants. Most studies have observed that the impact of *ABCB1* SNPs is lost after eliminating the confounder *CYP3A5* genotype [33–35], which is consistent with our results. A reason for the observed trend in the present study toward higher dose requirements in carriers of 4–6 variants after controlling for the *CYP3A5* genotype may be the different distribution of some *ABCB1* SNPs between *CYP3A5* expressers and nonexpressers in our population (e.g. 3435 TT subjects accounted for 23.7% among nonexpressers while being absent in the *CYP3A5* expresser group).

The results of this study do not support a critical role of *CYP3A* or *ABCB1* SNPs in the development of toxicity induced by tacrolimus. Despite the strong association of *CYP3A5\*1* with tacrolimus PKs, there is no consensus regarding its role in CNIT [36]. In agreement with our results, most studies have failed to find an association between this SNP and renal dysfunction [2,9,37–43]. Conversely, Kuypers *et al.* found that CNIT was related to the presence of the *CYP3A5\*1* allele in renal recipients [30,44]. However, the authors observed that the proportion of *CYP3A5\*3* carriers who also had higher dose requirements were as well more prone to develop CNIT, which probably diminishes the significance of the reported association with the *CYP3A5\*1* allele [44].

We found that the *ABCB1* TGC haplotype was consistently associated with CNIT. As the precise impact of *ABCB1* haplotypes on P-glycoprotein function is yet to be established, we can only speculate on the explanation for this finding. It might indicate an accumulation of the drug due to reduced efflux because of the presence of the 3435T variant. The donor's genotype (influencing P-glycoprotein status in the allograft) would most likely be more revealing on this matter. It needs to be pointed out that the protocol followed in our center does not include performing biopsies in all patients with signs of renal dysfunction and therefore potential underreporting of the true incidence of CNIT might have occurred.

To our knowledge, there are no previous genetic association studies on tacrolimus-induced neurotoxicity in renal transplant recipients. Two studies in different settings have found a positive association for the 2677T [45] and 1236T [46] mutant alleles. However, the first study only included 17 patients (six with neurotoxicity) and none of them carried out haplotype analyses. Our study shows opposite results in the sense that both the wild type 2677GG and 1236CC genotypes were associated with increased risk of neurotoxicity compared with T-allele carriers. Notwithstanding, we acknowledge that the clinical significance of these findings is probably limited, as further analyses using a codominant model of inheritance did not find significant associations. A statistical trend toward lower risk of neurotoxicity in carriers of the mutant *ABCB1* TTT haplotype was also observed. These results would argue against the general conception that a mutated P-glycoprotein in the blood–brain barrier would cause an accumulation of drug in the brain and hence higher risk of neurotoxicity. However, it is still not clear how exactly these *ABCB1* haplotypes affect the transporting capacity of the protein. Moreover, the precise mechanism for tacrolimus neurotoxicity remains unknown, and studies other than case reports and including determinations of tacrolimus in the cerebrospinal fluid are warranted. Finally, there is also a potential risk that the relatively low sample size of the study, along with the low frequency of some polymorphisms, may have resulted in putative spurious associations.

In agreement with our results, and despite the observed underexposure to tacrolimus, most association studies have failed to find a correlation between the presence of the *CYP3A5\*1* allele and the rate of acute rejection in renal transplant recipients [2,9,29,30,37,47,48]. The effect of *ABCB1* genetic variants has been less studied. A large study has reported a moderately increased risk for acute rejection in carriers of the *ABCB1* TGC (3435-2677-1236) haplotype, although their analysis included both tacrolimus- and cyclosporine-treated patients [47]. We and others [29,37] could not confirm the significance of *ABCB1* in acute rejection. However, the fact that an association of the very same TGC haplotype with CNIT was observed in this study could be an indication of a relevant clinical role for this combination of SNPs in the *ABCB1* gene.

To date, the influence of *CYP2C8\*3* and *CYP2J2\*7* SNPs on the outcome of renal transplantation had not been tested. We have shown that the incidence of DGF was higher in *CYP2C8\*3/\*3* carriers, a genotype associated with reduced arachidonic acid biotransformation to EETs [22]. It is tempting to speculate that lower amounts of these protective compounds could have played a role in the development of DGF. Consistent with these results,

Smith *et al.* [49] have reported a higher risk of tacrolimus nephrotoxicity in liver recipients who were carriers of the *CYP2C8\*3* allele.

Recently, a prospective study in renal transplant recipients analyzed the effect of administering either a standard tacrolimus dose or a dose according to the patient's *CYP3A5* genotype. The authors concluded that the dose-adapted group reached target concentrations earlier and with less dose changes [2]. The results of this study support that view, but also suggest that the additional genotyping of the *CYP3A4\*1B* SNP could probably make dose adjustments more accurate. On the other hand, both our results and the general perception in the literature indicate that those PK differences hardly translate into different clinical outcomes. There are several reasons that can explain this. Renal recipients are usually subjected to intensive concentration-controlled dose adaptations in the first days after grafting, which, along with other nongenetic factors (e.g. steroids dosing, drugs interactions, etc.), might overshadow the effect of genetic variants. Second, new data have revealed other significant SNPs besides *CYP3A5\*1* that may be important in a pharmacogenetic approach to dose adaptations of tacrolimus [50–52]. Third, the precise effect of *ABCB1* SNPs and haplotypes on the P-glycoprotein transporting capacity is as yet not fully understood and hence results from association studies do not have a straightforward interpretation. Genetic analyses of donors together with gene expression studies in the allograft will probably help elucidate the link between genetic variations and tacrolimus PDs in the near future.

## Authorship

GG: designed study and wrote the paper. MG, RMM: performed the genetic analyses and collected clinical data. JJC, FC: designed study and collected data. JB: designed study.

## Funding

This work has been supported in part by grant GR10022 from Junta de Extremadura, Consejería de Economía, Comercio e Innovación, Merida (Spain), and grant PRIS113 from Fundesalud, Merida (Spain).

## References

- Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, *et al.* Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29**: 404.
- Thervet E, Lioriot MA, Barbier S, *et al.* Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Therapeut* 2010; **87**: 721.
- Chandel N, Aggarwal PK, Minz M, Sakhuja V, Kohli KK, Jha V. *CYP3A5\*1/\*3* genotype influences the blood concentration of tacrolimus in response to metabolic inhibition by ketoconazole. *Pharmacogenet Genom* 2009; **19**: 458.
- Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 1992; **20**: 753.
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, *et al.* Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic *CYP3A5* expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383.
- Macphee IA, Fredericks S, Tai T, *et al.* Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002; **74**: 1486.
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, *et al.* The effect of *CYP3A5* and *MDR1* (*ABCB1*) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 147.
- Thervet E, Anglicheau D, King B, *et al.* Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; **76**: 1233.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, *et al.* *CYP3A5* genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genom* 2008; **18**: 339.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, *et al.* Genetic polymorphisms of the *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *MDR-1* genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Therapeut* 2003; **74**: 245.
- Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, *et al.* Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (*ABCB1*) and cytochrome (*CYP*) 3A polymorphisms. *Fundamental Clin Pharm* 2007; **21**: 427.
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 1993; **268**: 6077.
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of *CYP3A* and *ABCB1* single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2010; **49**: 141.
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of *CYP3A* and *ABCB1* single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clinical Pharmacokinet* 2010; **49**: 207.
- Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, *et al.* Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys* 1996; **330**: 87.

16. Zeldin DC, DuBois RN, Falck JR, Capdevila JH. Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform. *Arch Biochem Biophys* 1995; **322**: 76.
17. Node K, Huo Y, Ruan X, *et al.* Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science* 1999; **285**: 1276.
18. Chen G, Wang P, Zhao G, *et al.* Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 attenuates nephropathy in streptozotocin-induced diabetic mice. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; **96**: 63–71.
19. Levey AS, Greene T, Kuske J, Beck GJ, Group MS. A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 155A.
20. Geddes CC, Woo YM, Jardine AG. The impact of delayed graft function on the long-term outcome of renal transplantation. *J Nephrol* 2002; **15**: 17.
21. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5' promoter region of CYP3A4. *Clin Chem* 2001; **47**: 348.
22. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, *et al.* Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001; **11**: 597.
23. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 2002; **48**: 1668.
24. King LM, Ma J, Srettabunjong S, *et al.* Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms. *Mol Pharmacol* 2002; **61**: 840.
25. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, *et al.* Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1889.
26. Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2006; **22**: 1928.
27. Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, *et al.* Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5\*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; **79**: 499.
28. Zhang X, Liu ZH, Zheng JM, *et al.* Influence of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus concentration in the early stage after renal transplantation. *Clin Transplant* 2005; **19**: 638.
29. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genom* 2006; **16**: 659.
30. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Therapeut* 2007; **82**: 711.
31. Sewing KF. Pharmacokinetics, dosing principles, and blood level monitoring of FK506. *Transplant Proc* 1994; **26**: 3267.
32. Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, *et al.* Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003; **13**: 595.
33. Fredericks S, Moreton M, Reboux S, *et al.* Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements. *Transplantation* 2006; **82**: 705.
34. Cheung CY, Op den Buijsch RA, Wong KM, *et al.* Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients. *Pharmacogenomics* 2006; **7**: 563.
35. Loh PT, Lou HX, Zhao Y, Chin YM, Vathsala A. Significant impact of gene polymorphisms on tacrolimus but not cyclosporine dosing in Asian renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2008; **40**: 1690.
36. Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Therapeut Drug Monitoring* 2010; **32**: 387.
37. Glowacki F, Lionet A, Buob D, *et al.* CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2011; **26**: 3046.
38. Ferrarasso M, Tirelli A, Ghio L, *et al.* Influence of the CYP3A5 genotype on tacrolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in young kidney transplant recipients. *Pediatric Transplant* 2007; **11**: 296.
39. Renders L, Frisman M, Ufer M, *et al.* CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients. *Clin Pharmacol Therapeut* 2007; **81**: 228.
40. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, *et al.* The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transplant Immunol* 2005; **14**: 37.
41. Grenda R, Prokurat S, Ciechanowicz A, Piatosa B, Kalicinski P. Evaluation of the genetic background of standard-immunosuppressant-related toxicity in a cohort of 200 paediatric renal allograft recipients—a retrospective study. *Ann Transplant* 2009; **14**: 18.
42. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, *et al.* Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; **103**: 546.
43. Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation* 2011; **91**: 1098.
44. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin

- inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Therapeut Drug Monitoring* 2010; **32**: 394–404.
45. Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, *et al.* Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation: relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 2002; **74**: 571.
46. Yanagimachi M, Naruto T, Tanoshima R, *et al.* Influence of CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms on calcineurin inhibitor-related neurotoxicity after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2010; **24**: 855.
47. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O. Haplotypic structure of ABCB1/MDR1 gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2008; **86**: 1206.
48. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, *et al.* The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**: 914.
49. Smith HE, Jones JP 3rd, Kalhorn TF, *et al.* Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genom* 2008; **18**: 943.
50. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase \*28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1281.
51. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, *et al.* A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clin Chem* 2011; **57**: 1574.
52. Jacobson PA, Oetting WS, Brearley AM, *et al.* Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation* 2011; **91**: 300.

# *ABCB1* polymorphisms are associated with cyclosporine-induced nephrotoxicity and gingival hyperplasia in renal transplant recipients

Montserrat García · Rosa María Macías ·  
Juan José Cubero · Julio Benítez · Francisco Caravaca ·  
Guillermo Gervasini

Received: 30 May 2012 / Accepted: 10 July 2012  
© Springer-Verlag 2012

## Abstract

**Purpose** There is a great deal of controversy regarding the clinical impact of genetic variants in patients receiving cyclosporine (CsA) as immunosuppressant therapy. We have investigated the effect of polymorphisms in the *CYP3A* and *ABCB1* genes on CsA pharmacokinetics, acute rejection incidence and drug-related side effects in renal transplant recipients

**Methods** The presence of *CYP3A5\*3*, *CYP3A4\*1B* and *ABCB1* C1236T, G2677T/A and C3435T polymorphisms was assessed in 68 patients and retrospectively associated with pharmacokinetic and clinical parameters at 1 week and 1, 5 and 12 months after transplantation.

**Results** Only minor associations were found between the tested polymorphisms and CsA pharmacokinetics. Most notably, *CYP3A5* expressers showed lower blood trough levels than non-expressers in the first week after grafting ( $32.5 \pm 14.7$  vs.  $55.1 \pm 3.8$  ng/ml per mg/day per kilogram). In terms of CsA-induced adverse effects, the incidence of nephrotoxicity was higher in carriers of the *ABCB1* 3435TT genotype and in those patients carrying four to six variants in the three *ABCB1* loci [odds ratio (OR) 4.2, 95 % confidence interval (CI) 1.3–13.9,  $p=0.02$  and OR 3.6, 95 % CI 1.1–11.8,  $p=0.05$ , respectively]. These subjects with four to six *ABCB1* variants were also at higher risk for gingival hyperplasia (OR 3.29, 95 % CI 1.1–10.3,  $p=0.04$ ). Renal

function and the incidence of neurotoxicity and of acute rejection did not vary across the different genotypes.

**Conclusions** *ABCB1* polymorphisms may be helpful in predicting certain CsA-related side effects in renal transplant recipients. Our results also suggest that the mechanisms underlying these genetic associations are most likely independent of the drug's trough blood concentrations.

**Keywords** *ABCB1* · *CYP3A* · Polymorphisms · Renal transplant · Cyclosporine

## Introduction

The clinical use of cyclosporine (CsA), a widely used immunosuppressant in solid organ transplantation, is hampered by a narrow therapeutic window and a large interindividual variability in its pharmacokinetics [1]. Tailoring immunosuppressive therapy to the individual patient to optimize efficacy and minimize toxicity is therefore essential. In recent years, a number of studies have focused on investigating the effects of genetic polymorphisms on CsA pharmacokinetics and pharmacodynamics in transplant recipients, trying to identify genetic variants that could play a relevant role. However, a great deal of controversy still exists on this issue.

CsA is mainly metabolized by the cytochrome P450 (CYP) 3A4 and CYP3A5 enzymes [2], whose encoding genes are known to present a number of single nucleotide polymorphisms (SNPs). Most importantly, *CYP3A5\*3* (rs776746) is a non-functional variant that happens to be the most frequent *CYP3A5* allele in Caucasians [3]. However, the effect of this SNP, as well as that of the most studied *CYP3A4* variant in Caucasians, *CYP3A4\*1B* (rs2740574), on CsA pharmacokinetics remains largely unknown [4–7]. In the same manner, there is as yet no unequivocal evidence that *CYP3A* SNPs may alter clinical

M. García · J. Benítez · G. Gervasini (✉)  
Department of Surgical and Medical Therapeutics, Division  
of Pharmacology, Medical School, University of Extremadura,  
Av. Elvas s/n 06071,  
Badajoz, Spain  
e-mail: ggervasi@unex.es

R. M. Macías · J. J. Cubero · F. Caravaca  
Service of Nephrology, Infanta Cristina Hospital,  
Badajoz, Spain

outcomes, such as CsA-induced nephrotoxicity, a common and serious side effect of anti-calcineurin drugs, or acute rejection in transplant recipients [7, 8]. In comparison, the influence of pharmacogenetics on other common CsA-related side effects, such as neurotoxicity or gingival hyperplasia (GH), has been less investigated.

CsA is also a substrate for P-glycoprotein [P-gp; also known as multidrug resistance protein 1 (MDR1) or ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1)] [9], an energy-dependent efflux pump that plays a protective role by keeping xenobiotics out of the cells. Three SNPs, namely, C1236T (rs1128503), G2177T/A (rs2032582) and C3435T (rs1045642), have been the major variants studied in relation to CsA disposition and clinical end-points in renal transplantation. Parallel to the findings reported for *CYP3A*, there are also contradictory reports on the impact of these SNPs in renal transplant recipients receiving CsA (reviewed by Staatz et al. [10, 11]).

Despite the body of evidence that has accumulated, few studies have analysed the effect of *CYP3A4–CYP3A5* or *ABCB1* haplotypes, as most studies have evaluated the influence of SNPs separately. The aim of our study was to identify relevant SNPs and haplotypes in the aforementioned genes in a population of renal transplant recipients treated with CsA. These genetic variants were retrospectively associated with pharmacokinetic parameters collected during the first year post-transplant, as well as with kidney function and the occurrence of several CsA-related adverse effects, such as nephrotoxicity, neurotoxicity and gingival hyperplasia and acute rejection.

## Patients and methods

### Study population

A total of 68 consecutive adult renal transplant recipients were included in the study. The patients received a single kidney from a deceased donor (living donor transplants are not performed in our institution) at the Infanta Cristina Hospital (Badajoz, Spain). All participants were of Caucasian origin and provided oral and written consent for their participation in the study. The study was approved by the Ethics Committee of the Infanta Cristina University Hospital and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

The patients were administered a CsA-based immunosuppressive therapy. Initial dosage was 6–12 mg/kg/day, given orally unless not possible, divided into two administrations. The first dose was administered orally 4–12 h before transplantation, or intravenously (IV) in the perioperative period when the patient's condition did not support the enteral route. The amount of drug administered IV was one-

third of the oral dose. Doses were subsequently adjusted for all patients based on blood CsA concentrations. CsA target levels were adjusted to 150–400 ng/ml (months 0–2) and 100–200 ng/ml (months 3–12).

A concomitant therapy with mycophenolate mofetil (2 g/day) and a tapering schedule of steroids (500 mg IV methylprednisolone at the time of surgery, 125 mg IV the following day and then 20 mg of oral prednisone daily, which was progressively tapered to 5 mg daily at 2 months after transplantation) was administered to all patients. Ten subjects (15 %) received antibodies against the interleukin 2 receptor; induction therapy with antithymocyte globulin was not implemented in these patients. Subjects with a chronic use of substances known to interfere with CsA absorption, distribution, metabolism and excretion (e.g. macrolides, rifampin, phenytoin, carbamezpine etc.) were excluded from the study.

### Data collection

Cyclosporin blood trough (predose) concentrations were routinely measured using an homogeneous enzyme immunoassay performed on a Cobas Mira Plus analyser (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) from samples obtained before the morning dose ( $C_0$ ). CsA predose concentrations ( $C_0$ ; ng/ml), daily doses (mg/kg) and dose-normalized predose concentrations ( $C_0$ /dose; ng/ml per mg/day per kilogram body weight) were retrieved from medical records at 1 week, 1 and 5 months and 1 year after transplantation.

Renal function was evaluated from creatinine clearance values (ml/min) retrieved from medical records at 1 week, 1 and 5 months and 1 year after grafting. Delayed graft function (DGF) was defined as the need for dialysis within the first week after transplantation and/or a creatinine clearance of <10 ml/min during the first postoperative 3 days.

CsA-induced nephrotoxicity was clinically diagnosed on the basis of (1) impairment of renal function as defined by elevated serum creatinine values (25 % increase from base values) coinciding with high CsA plasma levels, with a subsequent decrease in both parameters following dose reduction and/or (2) exclusion of renal impairment as a result of an acute rejection episode either proven by biopsy and/or judged by clinical evaluation (see below). According to standard practice at our centre, no protocol biopsies were performed in individuals with stable graft function in this study. Acute allograft rejection was established by histological findings in renal biopsies and/or by clinical evaluation when patients presented with a rise in serum creatinine level of  $\geq 0.30$  mg/dl that was not coincidental with supratherapeutic calcineurin inhibitor (CNI) predose concentrations, fever without signs of infection, graft swelling or tenderness, oliguria, increased resistive index on Doppler ultrasonography or clinical response to steroid treatment consistent

with rejection. Diagnosis was confirmed by biopsy in all corticoid-resistant patients.

Patients were examined and questioned about the presence of neurological symptoms, in accordance with the hospital protocol for immunosuppressant therapy with anti-calcineurin drugs. Reported symptoms included tremor, headache, insomnia, hyperesthesia, itching and seizures. Gingival hyperplasia (GH), an erythematous gum overgrowth with granular or lobulated aspect, was diagnosed by an otolaryngologist and was categorically classified as present (from a slight increase in size of the gums with gingival bleeding to severe gingival enlargement) or absent.

### Genotyping analyses

Blood samples (5 ml) were collected from the participants, and genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by a QIAamp DNA Blood kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands). Assessment of the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3* variants was performed by PCR coupled with restriction fragment length polymorphisms, as described elsewhere [12, 13]. Ten percent of the wild-type samples and those samples with mutant genotypes were duplicated and the results confirmed by direct sequencing. The three *ABCB1* polymorphisms, namely, C1236T, G2677T/A and C3435T were detected by direct sequencing (ABI3700 DNA Analyser; Applied Biosystems, Foster City, CA) using previously described primers and PCR conditions [14]. The influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters was then evaluated for SNPs and haplotypes. The effect of these parameters on the number of variants (0–3 vs. 4–6) in the three *ABCB1* loci investigated was also studied, as described previously in studies with renal transplant recipients [15, 16].

### Statistical analyses

The statistical power of the sample size was evaluated with a genetic model analysing the frequency of carriers of the variant alleles with arbitrarily established effect size at 3.0 ( $\alpha=0.05$ ). With the available sample size, the power for unilateral associations with efficacy and safety parameters was 0.822. Power calculations were made with G\*Power ver. 3.1.3. The distribution of the outcome variables were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov method and the statistical significance of the differences of quantitative variables among individuals with different genotypes was analysed by analysis of variance (ANOVA)/Kruskal–Wallis or Student's *t* tests/Mann–Whitney test, as appropriate. For categorical data, Fisher's exact test or Pearson's  $\chi^2$  were used instead. SNPStats software [17] was utilized to calculate linkage disequilibrium (LD) and to estimate the effect of haplotypes on quantitative variables through linear regression

modelling, assuming an additive mode of inheritance. For binary traits, the logistic regression model was employed, and the regression parameters related to the log odds ratios (OR).

Differences were considered to be significant at  $p<0.05$ . Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 15.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL).

### Results

Sixty-eight renal transplant recipients participated in the study. Pathologies leading to renal failure were glomerulonephritis (41.3 %), chronic interstitial nephritis (13.2 %), polycystic kidney disease (11.7 %) and uncertain (27.9 %). Other causes (5.9 %) included diabetic nephropathy, obstructive uropathic and cystic medular disease. Additional clinical characteristics of the patients at the four time points considered in the study are shown in Table 1.

The distribution of allelic and genotypic frequencies of the studied polymorphisms (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3* and *ABCB1* C3435T, G2677T/A and C1236T) is depicted in Table 2. All genotype frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium (data not shown). One *CYP3A5\*1/\*1* subject was identified who was later included in the *CYP3A5\*1/\*3* group for statistical purposes, as it is assumed that only one *CYP3A5\*1* allele is sufficient to express the protein [3]. LD data showed partial associations between the following *ABCB1* SNPs: *ABCB1* G2677T and C3435T, ( $D'=0.92$ ,  $r^2=0.68$ ), *ABCB1* G2677T and C1236T ( $D'=0.84$ ,  $r^2=0.63$ ) and *ABCB1* C3435T and C1236T ( $D'=0.87$ ,  $r^2=0.53$ ). With regard to the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*1* polymorphisms, the LD observed ( $D'=0.99$ ,  $r^2=0.23$ ) resulted in all subjects carrying the *CYP3A4\*1B* variant also having the *CYP3A5\*1* allele. No further significant linkage was found between other combinations of SNPs ( $r^2<0.1$ ).

### Effect of *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes on CsA trough blood concentrations and dose requirements

Subjects carrying the *CYP3A5\*1* allele (expressing CYP3A5 protein) displayed significantly lower dose-corrected  $C_0$  concentrations at 1 week after transplantation but not at the later time points considered (Table 3). The *CYP3A4\*1B* SNP or the different *CYP3A4*–*CYP3A5* haplotypes did not show any significant association with dose-adjusted  $C_0$  values throughout the study (Table 3).

With regard to dose requirements, carriers of the *CYP3A4\*1B*–*CYP3A5\*3* haplotype showed higher values than patients carrying the common *CYP3A4\*1B*–*CYP3A5\*1* combination at 1 week and 1 and 5 months after grafting ( $12.2\pm 1.5$  vs.  $8.1\pm 1.9$ ,  $p=0.04$ ;  $9.6\pm 3.0$  vs.  $6.5\pm 1.7$ ,  $p=$

**Table 1** Pharmacokinetic parameters and clinical characteristics of renal transplant recipient ( $n=68$ ) at the four time points considered in the study

Parameter	Values retrieved	One week post-transplant	One month post-transplant	5 months post-transplant	12 months post-transplant
Gender (male/female)	41/27				
Age (years)	42.8±13.2				
Duration of dialysis before transplantation (months)	36.2±27.8				
Transplant number (1/2/3)	59/3/1				
Cold ischaemia time (h)	18.4±6				
Mismatch HLA-A (mean)	0.82±0.72				
Mismatch HLA-B (mean)	1.05±0.65				
Mismatch HLA-DR (mean)	0.67±0.57				
PRA activity max. (%)	12.05 (5.87±18.23)				
PRA activity max. >50 %	6 (8.8)				
Delayed graft function	16 (26.2)				
<sup>a</sup> C <sub>0</sub> (ng/ml)		416.4±202.6	380.9±187.0	272.1±145.6	212.7±124.3
Dose (mg/kg)		8.1±2.0	6.5±1.9	4.5±1.5	3.6±1.2
Weight (kg)		67.2±11.8	65.8±11.3	69.7±11.3	71.2±11.9
C <sub>0</sub> /Dose (ng/ml per mg/day per kilogram body weight)		52.6±26.7	60.7±26.5	63.2±35.8	62.4±37.6
Serum creatinine (mg/dl)		3.0±2.6	1.7±0.7	1.5±0.6	1.4±0.5
Creatinine clearance (ml/min)		53.5±19.6	55.2±19.9	67.6±21.1	69.9±22.3

PRA, Panel reactive antibody

Data are presented as the mean ± standard deviation (SD) values or as percentages (in parentheses)

Target concentration range was 150–400 ng/ml during the first 2 months and 100–200 ng/ml from the third month onwards

<sup>a</sup>C<sub>0</sub>, Predose concentration

0.015; 6.7±1.5 vs. 4.3±1.2,  $p=0.009$ , respectively) (Table 4).

Effect of *ABCB1* genotypes/haplotypes on CsA trough blood concentrations and dose requirements

*ABCB1* polymorphisms were not associated with pharmacokinetic parameters in the whole study population, nor were there significant differences between the major *ABCB1* wild-type CGC (positions 1236–2677–3435; frequency=0.50) and the mutant TTT (frequency=0.32) haplotypes (data not shown). When data were re-analysed in a subgroup of 58 CYP3A5 non-expressers (*CYP3A5*\*3/\*3 carriers), it was observed that patients homozygous for the *ABCB1* C3435T SNP and those carrying four to six variants in the three *ABCB1* loci had significantly lower C<sub>0</sub>/dose values than

carriers of the *ABCB1* 3435CC genotype (39.1±12.0 vs. 65.5±29.5, respectively;  $p=0.04$ ) and those with zero to three variants (41.7±14.0 vs. 59.3±26.2, respectively;  $p=0.01$ ) (Table 5). In addition, in this subgroup of CYP3A5 non-expressers, two haplotypes were associated with lower C<sub>0</sub>/dose, as compared to the wild-type CGC haplotype, namely, the CGT haplotype, at the 1 week and 1 and 5 months time points ( $p=0.013$ , 0.041 and 0.017 vs. CGC, respectively), and the mutant TTT haplotype at 1 week after transplantation ( $p<0.001$  vs. CGC).

Associations with clinical outcomes

Twenty-three patients (33.8 %) suffered DGF, which was not associated with the presence of any genetic variant. Likewise, renal function, measured as creatinine clearance,

**Table 2** Distribution of allelic and genotypic frequencies in the 68 renal transplant recipients

Polymorphism	wt/wt, $n$ (%)	wt/m, $n$ (%)	m/m, $n$ (%)	MAF
<i>CYP3A4</i> *1/*1B	66 (97.1)	2 (2.9)	0 (0)	0.02
<i>CYP3A5</i> *1/*3	1 (1.5)	9 (13.2)	58 (85.3)	0.08
<i>ABCB1</i> C3435T	20 (29.4)	32 (47.1)	16 (23.5)	0.47
<i>ABCB1</i> G2677T/A	24 (35.3)	32 (47.1) <sup>a</sup>	12 (17.6)	0.41
<i>ABCB1</i> C1236T	26 (38.2)	32 (47.1)	10 (14.7)	0.38

$n$ , Number of subjects; wt, wild type; m, mutant; MAF, minor allele frequency

<sup>a</sup>One subject carried one *ABCB1* 2677A allele



**Table 3** Effect of *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes on cyclosporine trough blood levels at the four different time points considered

Genotype	Trough blood concentrations (ng/ml per mg/day per kilogram body weight)				
	<i>n</i>	One week post-transplant	One month post-transplant	5 months post-transplant	12 months post-transplant
All	68	52.6±26.7	60.7±26.5	63.2±35.8	62.4±37.6
<i>CYP3A4*1/*1</i>	66	53.3±26.5	61.4±26.3	63.6±35.9	68.3±46.2
<i>CYP3A5</i> expressers	10	32.5±14.7*	52.6±27.0	51.1±42.9	54.8±44.7
<i>3A4*1/3A5*3</i> <sup>a</sup>	58	55.1±3.8	64.2±4.6	67.6±5.9	64.5±6.3
<i>3A4*1/3A5*1</i>	8	35.8±6.1	56.1±10.2	50.5±17.4	58.9±17.6
<i>3A4*1B/3A5*1</i> <sup>a</sup>	2	24.2±11.7	40.3±17.6	53.3±31.3	40.3±20.1

\* $p < 0.05$  vs. *CYP3A5* non-expressers (*CYP3A5\*3/\*3* or *CYP3A4\*1-CYP3A5\*3*)

Data are presented as the mean ± SD

<sup>a</sup> Because of the existing linkage disequilibrium (LD), values for *CYP3A5* non-expressers are identical to those shown by the *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3* haplotype. In the same manner, all of the patients carrying the *CYP3A4\*1B* variant were also carriers of the *CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1* haplotype

was not statistically significantly different between the genotypes or haplotypes studied (data not shown).

With regard to CsA-induced adverse effects, 18 patients (26.5 %) had CsA-related nephrotoxicity during the study period, eight (11.8 %) showed neurotoxicity and 22 (32.3 %) developed GH. Thirteen patients (19.1 %) experienced acute rejection according to diagnostic criteria described in the **Patients and methods** section.

Several associations were found between *ABCB1* SNPs and CsA-induced side effects. The *ABCB1 3435TT* genotype was observed to increase the risk for nephrotoxic events [OR 4.2, 95 % confidence interval (CI) 1.3–13.9,  $p = 0.02$ ] in analyses carried out considering a recessive model of inheritance (*3435CC + CT* vs. *TT* carriers). Those patients carrying four to six variants in the three *ABCB1* loci were also found to be at moderately higher of nephrotoxicity than patients carrying only zero to three variants (OR 3.6, 95 % CI 1.1–11.8,  $p = 0.05$ ; Table 6).

With regard to the development of GH, a trend towards higher susceptibility was observed in carriers of *ABCB1* homozygous mutant genotypes (Table 7). Furthermore, subjects with four to six variants in the three positions studied were at significantly higher risk for this adverse effect (OR 3.29, 95 % CI 1.1–10.3,  $p = 0.04$ ; Table 7).

No associations were found between any of the SNPs or their combinations and the occurrence of neurotoxicity or acute rejection in the population of study (data not shown).

## Discussion

One of the goals of pharmacogenetics is to help identify individuals whose genetic background makes them either more prone to develop toxicity by drugs with narrow therapeutic indexes or to suffer lack of efficacy in any given therapy. The aim of our study was to identify genetic

**Table 4** Effect of *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes on cyclosporine dose requirements at the four different time points considered

Genotype	<i>n</i>	Dose requirements (mg/kg)			
		One week post-transplant	One month post-transplant	5 months post-transplant	12 months post-transplant
All	68	8.1±2.0	6.5±1.9	4.5 ±1.5	3.6±1.2
<i>CYP3A4*1/*1</i>	66	8.0±2.0* <sup>b</sup>	6.4±1.7* <sup>b</sup>	4.5 ±1.5* <sup>b</sup>	3.4±1.2
<i>CYP3A5</i> expressers	10	8.2±2.8	7.1±2.7	5.8±2.4	4.3±1.8
<i>3A4*1/3A5*3</i> <sup>a</sup>	58	8.1±1.9	6.5±1.7	4.3±1.2	3.5±1.0
<i>3A4*1/3A5*1</i>	8	7.6±2.5	6.5±2.4	5.5±2.6	4.3±1.8
<i>3A4*1B/3A5*1</i> <sup>a</sup>	2	12.2±1.5* <sup>c</sup>	9.6±3.0* <sup>c</sup>	6.7±1.5* <sup>***c</sup>	4.3±2.1

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

<sup>a</sup> Because of the existing LD, values for *CYP3A5* non-expressers are identical to those shown by the *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3* haplotype. In the same manner, all patients carrying the *CYP3A4\*1B* variant were also carriers of the *CYP3A4\*1B/CYP3A5\*1* haplotype

<sup>b</sup>  $p$  values vs. *CYP3A4\*1B* carriers

<sup>c</sup>  $p$  values vs. the most common haplotype *CYP3A4\*1/CYP3A5\*3*

**Table 5** Effect of the different *ABCB1* genotypes on dose-adjusted cyclosporine predose concentrations in CYP3A5 non-expressers ( $n=58$ )

<i>ABCB1</i> genotype	<i>n</i>	One week post-transplant	One month post-transplant	5 months post-transplant	12 months post-transplant
3435CC	16	65.5±29.5	68.6±26.4	87.5±50.1	82.2±52.5
3435CT	28	55.6±23.1	65.6±30.8	55.6±21.6	47.6±18.8
3435TT	14	39.1±12.0* <sup>a</sup>	56.2±1.7	62.3±23.0	65.2±28.7
2677GG	20	63.3±27.8	62.1±27.3	78.7±49.0	76.3±50.8
2677GT	27	52.4±24.9	70.1±30.3	57.5±23.9	49.1±19.4
2677TT	11	43.5±9.3	52.9±11.5	68.4±22.2	69.4±30.4
1236CC	22	63.0±27.1	61.2±27.1	78.4±48.2	75.0±49.7
1236CT	26	51.3±26.0	71.4±30.3	54.5±21.8	48.5±19.1
1236TT	10	46.2±11.6	52.9±11.5	70.2±21.2	69.4±30.4
Three loci					
0–3 variants	43	59.3±26.2	66.7±28.7	68.8±39.9	64.2±41.9
4–6 variants	15	41.7±14.0*	56.2±19.7	64.4±22.7	65.2±28.7

\* $p < 0.05$ 

Data are presented as the mean ± SD

<sup>a</sup> $p$  value vs. *ABCB1* 3435CC

variants in genes that are presumed to affect CsA biodisposition and evaluate their associations with pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters in renal transplant recipients.

Our results show that carriers of the *CYP3A5\*1* allele did show dose-corrected  $C_0$  values that were 60 % of those shown by non-expressers in the first week after grafting. However, although concentrations continued to be slightly lower through the rest of the study, differences were not significant at any of the three later time points. Previous reports on renal transplant recipients have shown a similar effect of the *CYP3A5\*1* wild-type allele [5], even up to 1 year after grafting [6], whilst other authors have not observed a relevant effect of this allele on CsA pharmacokinetics [4, 8, 18]. Ethnicity [19], different pharmacokinetic parameters measured [18] or different target concentrations and initial doses [20] have been pointed out among the reasons that could explain these discrepancies. In addition, Yates et al. [21] suggested that a putative linkage between *CYP3A5\*3* and *ABCB1* polymorphisms could bias those findings based only on the determination of *CYP3A5\*3*.

We also found that the *CYP3A4* genotype was associated with lower CsA dose requirements in our patients, but it did

not affect  $C_0$ /dose values. It has been hypothesized that because the *CYP3A4\*1B* SNP is located in the 5'-untranslated region, it would be more likely to cause changes in protein expression than affect activity; hence, the impact on blood concentrations would not be as noticeable [22]. In any case, the putative confounding factor due to existing LD with *CYP3A5\*3* [23] and the fact that only two subjects were carriers of the *CYP3A4\*1B* allele in our sample population limit the significance of this finding.

We could not confirm a significant role of any *ABCB1* SNP or haplotype on CsA pharmacokinetics. However, when the analysis was confined to CYP3A5 non-expressers to eliminate the confounding effect resulting from the observed trend towards lower  $C_0$ /dose in carriers of the *CYP3A5\*1* allele, we did find that subjects with a higher number of variant alleles in the three *ABCB1* loci, as well as those with the 3435TT genotype, displayed significantly lower CsA levels in the first week after grafting. Available evidence on the impact of *ABCB1* genetic variants on CsA biodisposition is highly contradictory. Our results are consistent with those of a previous study which found that additional T alleles correlated with a progressive decrease in drug exposure in the immediate

**Table 6** Effect of *ABCB1* allelic variants on the incidence of CsA-related nephrotoxicity (yes/no)

<i>ABCB1</i> genotype	Yes, <i>n</i> (%)	No, <i>n</i> (%)	Odds ratio <sup>a</sup>	<i>p</i>
1236CC+CT	14 (77.8)	44 (88)	Reference	
1236TT	4 (22.2)	6 (12)	2.09 (0.5–8.5)	0.24
2677GG+GT	13 (72.2)	43 (86)	Reference	
2677TT	5 (27.8)	7 (14)	2.36 (0.6–8.7)	0.17
3435CC+CT	10 (55.6)	42 (84.0)	Reference	
3435TT	8 (44.4)	8 (16.0)	4.2 (1.3–13.9)	0.02
Three loci				
0–3 variants	10 (55.6)	41 (82.0)	Reference	
4–6 variants	8 (44.4)	9 (18.0)	3.6 (1.1–11.8)	0.05

<sup>a</sup>Odds ratio values are presented with 95 % confidence intervals (in parenthesis)

**Table 7** Effect of *CYP3A4/5* haplotypes and *ABCB1* allelic variants on the incidence of cyclosporine-related gingival hyperplasia (yes /no)

<i>ABCB1</i> genotype	Yes, <i>n</i> (%)	No, <i>n</i> (%)	Odds ratio <sup>a</sup>	<i>p</i>
<i>1236CC+CT</i>	17 (73.9)	41 (91.1)		
<i>1236TT</i>	6 (26.1)	4 (8.9)	3.30 (0.7–14.1)	0.11
<i>2677GG+GT</i>	16 (66.7)	38 (86.4)		
<i>2677TT</i>	8 (33.3)	6 (13.6)	3.23 (0.8–12.4)	0.08
<i>3435CC+CT</i>	15 (65.2)	37 (82.2)		
<i>3435TT</i>	8 (34.8)	8 (17.8)	2.83 (0.8–9.8)	0.10
Three loci				
0–3 alleles variants	13 (59.1)	38 (82.6)	Reference	
4–6 alleles variants	9 (40.9)	8 (17.4)	3.29 (1.1–10.3)	0.04

NC, Non-calculable

<sup>a</sup>Odds ratio values with 95 % confidence intervals

postoperative period [24]. Furthermore, other authors have also observed a trend towards lower  $C_0$ /dose values in 3435TT carriers [5, 22]. On the other hand, there are also studies arguing against a significant effect of the 3435T allele or even studies that observed an association with higher blood levels [10]. Differences in the degree of P-gp inhibition between studies due to differences in CsA blood concentrations may limit or obscure the direction of effects and explain these conflicting results [10], as it would, for instance, the possible role of CsA as a P-gp inhibitor [25, 26].

The main finding of this study is that *ABCB1* SNPs showed a significant impact on CsA-related toxicity. Indeed, a large recent study that assessed 2,724 SNPs in 945 kidney recipients has demonstrated that genetic polymorphisms may predispose to CsA-induced nephrotoxicity [27]. In this regard, we found that both the 3435TT genotype and the presence of four or more variants in the three *ABCB1* loci analysed were strongly associated with increased risk for nephrotoxicity. This is in line with previous results by our group showing that haplotypes containing the *ABCB1* 3435T variant are more frequently found amongst renal transplant recipients who experience nephrotoxicity related to tacrolimus, another widely used CNI [15]. These findings would seem to indicate an accumulation of the drug because of reduced transporting capacity of P-gp; however, blood trough concentrations of CsA did not correlate with *ABCB1* variants in this study. It should be considered that P-gp is also expressed in the lymphocytes [28], which are the drug targets; it is therefore possible that the concentration of CsA in the T-cells might also contribute to the drug-induced toxicity. In addition, an intrinsic difficulty of genetic association studies in the renal transplant setting is that the nephrotoxicity caused by these CNIs is produced in the transplanted organ, thus incorporating the donor's genotype as an additional variable. Taking this into consideration, Hauser et al. [29] have suggested that the *ABCB1* genotype of the donor would be more revealing than that of the recipient in terms of its influence on CsA-related nephrotoxicity. Unfortunately, we did not have direct access to genetic material from the donors in this study. In addition,

the number of biopsies available for use as a source of information on the donor's genetics was insufficient to obtain a significant number of genotypes to perform statistical associations with the clinical data.

*ABCB1* polymorphisms also played a significant role in CsA-induced GH, as a higher number of allelic variants in the three *ABCB1* loci analysed were associated with an elevated risk for this side effect. To date, only three studies have analysed the influence of CsA pharmacogenetics in the development of GH in renal transplant recipients. Similar to our results, De Iudicibus et al. [30] found that the 3435 T variant increased the risk for GH in transplant patients, whilst an earlier study by Drozdik only found a marginal effect in C3435T heterozygotes, but not for carriers of the other genotypes [31]. In a later study, another Polish group failed to reproduce the results regarding the C3435T SNP [32]. It should be noted, however, that none of these three studies analysed all three major *ABCB1* SNPs, and hence potential associations could have gone unnoticed. There is no consensus on the role of high CsA blood concentrations as a risk factor for GH, but a considerable number of reports indicate that there seems to be no correlation [30, 33–35]. This would explain why *ABCB1* SNPs may increase the susceptibility to GH without having a marked effect on CsA pharmacokinetics, as we have also shown our study. Most likely the syndrome would depend on the *ABCB1* local status. P-gp is expressed in the endothelial layers of blood vessels in the gingiva [36]; therefore, functional polymorphisms in the *ABCB1* gene could result in the accumulation of CsA in this tissue and, consequently, in increased hypertrophy. It is noteworthy that *ABCB1* genetic variants, such as 3435 T, have been shown to play a role in the induction of inflammatory processes [37]. It has also been suggested that different *ABCB1* genotypes may induce a modified inflammatory response to the drugs in the gingiva, which may explain the individual differences in susceptibility to GH induced by CsA [36].

In agreement with our results, previous association studies have failed to find a correlation between the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*1* alleles and the rate of acute rejection in renal

transplant recipients treated with CsA [7, 8, 38, 39]. More controversy surrounds the few studies that have analysed the role of *ABCB1* SNPs, with various data sets arguing either in favour [38, 40] or against [7, 8] this association. In any case, the implication of the *ABCB1* variants in the mechanisms leading to acute rejection is, at the very least, uncertain. It should be stated that in one of the studies reporting positive results there was no correlation between the *ABCB1* gene status and CsA blood levels [40], whilst pharmacokinetic parameters were not measured in the second study [38]. Moreover, the first study by Bandur et al. [40] included both tacrolimus- and CsA-treated patients, and the authors acknowledged that the relative contribution of *ABCB1* haplotypes to acute rejection was small [40].

A limitation of our study was its relatively low sample size which, together with the low frequencies of some of the assessed minor alleles in Caucasians, especially those in the *CYP3A* genes, yielded a number of small genotype/haplotype groups. Consequently, the reported associations for these variants should be extrapolated cautiously.

In summary, we have shown that *ABCB1* variants may be helpful in predicting CsA-induced side effects, such as nephrotoxicity or gingival hyperplasia in renal transplant recipients. The results also suggest that the mechanisms underlying these genetic associations are most likely to be independent of the drug's trough blood concentrations. Information on the impact of polymorphisms in *ABCB1* and other genes on CsA-related toxicity is still scarce and contradictory. Recent research efforts have focused on analysing new allelic variants in these and other genes that could explain some of the current uncertainties [27, 41]. Further studies with access to donor's genetic material and/or protein expression levels in the allograft will likely shed some light on the clinical impact of CsA pharmacogenetics.

**Acknowledgements** This work has been supported in part by grant GR10022 from Junta de Extremadura, Consejería de Economía, Comercio e Innovación, Mérida, Spain and grant PRIS11003 from FUNDESALUD, Mérida, Spain.

**Conflict of interest statement** None.

## References

- Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Burckart GJ (1986) Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* 11(2):107–132
- Kronbach T, Fischer V, Meyer UA (1988) Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther* 43(6):630–635
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E (2001) Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic *CYP3A5* expression. *Nat Genet* 27(4):383–391
- Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, Hurault De Ligny B, Le Meur Y, Touchard G, Buchler M, Laurent-Puig P, Tregouet D, Beaune P, Daly A, Legendre C, Marquet P (2004) *CYP3A5* and *MDR1* genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 75(5):422–433
- Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, Wawrzyniak J, De Meyer M, Eddour DC, Malaise J, Lison D, Squifflet JP, Wallemacq P (2004) The effect of *CYP3A5* and *MDR1* (*ABCB1*) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 14(3):147–154
- Crettol S, Venetz JP, Fontana M, Aubert JD, Pascual M, Eap CB (2008) *CYP3A7*, *CYP3A5*, *CYP3A4*, and *ABCB1* genetic polymorphisms, cyclosporine concentration, and dose requirement in transplant recipients. *Ther Drug Monit* 30(6):689–699
- von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW (2001) No influence of the *MDR-1* C3435T polymorphism or a *CYP3A4* promoter polymorphism (*CYP3A4-V* allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 47(6):1048–1052
- Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, Macphee IA, de Fijter JW, van Gelder T (2011) Polymorphisms in *CYP3A5*, *CYP3A4*, and *ABCB1* are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit* 33(2):178–184
- Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* 268(9):6077–6080
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE (2010) Effect of *CYP3A* and *ABCB1* single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet* 49(3):141–175
- Staatz CE, Goodman LK, Tett SE (2010) Effect of *CYP3A* and *ABCB1* single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet* 49(4):207–221
- Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD (2001) Detection of *MboII* polymorphism at the 5' promoter region of *CYP3A4*. *Clin Chem* 47(2):348–351
- van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J (2002) *CYP3A5* variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem* 48(10):1668–1671
- Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E (2003) Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 14(7):1889–1896
- Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J (2012) Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int* 25(4):471–480
- Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M (2006) *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *MDR-1* genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 16(9):659–665
- Sole X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22(15):1928–1929
- Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot RA (2004) Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and

- genetic polymorphisms in the *MDR-1*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* genes. *Clin Pharmacol Ther* 76(6):545–556
19. Tang HL, Ma LL, Xie HG, Zhang T, Hu YF (2010) Effects of the *CYP3A5*\*3 variant on cyclosporine exposure and acute rejection rate in renal transplant patients: a meta-analysis. *Pharmacogenet Genomics* 20(9):525–531
  20. Azarpira N, Aghdaie MH, Behzad-Behbahanie A, Geramizadeh B, Behzadi S, Malekhoseinie SA, Raisjalal GH, Rahsaz M, Pourgholami A, Sagheb F (2006) Association between cyclosporine concentration and genetic polymorphisms of *CYP3A5* and *MDR1* during the early stage after renal transplantation. *Exp Clin Transplant* 4(1):416–419
  21. Yates CR, Zhang W, Song P, Li S, Gaber AO, Kotb M, Honaker MR, Alloway RR, Meibohm B (2003) The effect of *CYP3A5* and *MDR1* polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. *J Clin Pharmacol* 43(6):555–564
  22. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T (2003) Genetic polymorphisms of the *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *MDR-1* genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 74(3):245–254
  23. Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA, van Hooff JP, van Diejen-Visser MP, Bekers O (2007) Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (*ABCB1*) and cytochrome (*CYP*) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 21(4):427–435
  24. Foote CJ, Greer W, Kiberd BA, Fraser A, Lawen J, Nashan B, Belitsky P (2006) *MDR1* C3435T polymorphisms correlate with cyclosporine levels in de novo renal recipients. *Transplant Proc* 38(9):2847–2849
  25. Lum BL, Kaubisch S, Fisher GA, Brown BW, Sikic BI (2000) Effect of high-dose cyclosporine on etoposide pharmacodynamics in a trial to reverse P-glycoprotein (*MDR1* gene) mediated drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 45(4):305–311
  26. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, Dorr R, Karanes C, Hynes HE, Doroshow JH, Shurafa M, Appelbaum FR (2001) Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 98(12):3212–3220
  27. Jacobson PA, Schladt D, Israni A, Oetting WS, Lin YC, Leduc R, Guan W, Lamba V, Matas AJ (2012) Genetic and clinical determinants of early, acute calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity: results from a kidney transplant consortium. *Transplantation* 93(6):624–631
  28. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, Dalton WS (1994) P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 83(9):2451–2458
  29. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, Ackermann H, Seidl C, Hocher B, Zanger UM, Geiger H, Eichelbaum M, Schwab M (2005) *ABCB1* genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 16(5):1501–1511
  30. De Iudicibus S, Castronovo G, Gigante A, Stocco G, Decorti G, Di Lenarda R, Bartoli F (2008) Role of *MDR1* gene polymorphisms in gingival overgrowth induced by cyclosporine in transplant patients. *J Periodontol Res* 43(6):665–672
  31. Drozdziak M, Mysliwiec K, Lewinska-Chelstowska M, Banach J, Drozdziak A, Grabarek J (2004) P-glycoprotein drug transporter *MDR1* gene polymorphism in renal transplant patients with and without gingival overgrowth. *J Clin Periodontol* 31(9):758–763
  32. Grenda R, Prokurat S, Ciechanowicz A, Piatosa B, Kalicinski P (2009) Evaluation of the genetic background of standard-immunosuppressant-related toxicity in a cohort of 200 paediatric renal allograft recipients—a retrospective study. *Ann Transplant* 14(3):18–24
  33. Montebugnoli L, Servidio D, Bernardi F (2000) The role of time in reducing gingival overgrowth in heart-transplanted patients following cyclosporin therapy. *J Clin Periodontol* 27(8):611–614
  34. Hassell TM, Hefti AF (1991) Drug-induced gingival overgrowth: old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med* 2(1):103–137
  35. Lowry LY, Welbury RR, Seymour RA, Waterhouse PJ, Hamilton JR (1995) Gingival overgrowth in paediatric cardiac transplant patients: a study of 19 patients aged between 2 and 16 years. *Int J Paediatr Dent* 5(4):217–222
  36. Meisel P, Giebel J, Kunert-Keil C, Dazert P, Kroemer HK, Kocher T (2006) *MDR1* gene polymorphisms and risk of gingival hyperplasia induced by calcium antagonists. *Clin Pharmacol Ther* 79(1):62–71
  37. Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A (2006) Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 12(23):3636–3644
  38. Grinyo J, Vanrenterghem Y, Nashan B, Vincenti F, Ekberg H, Lindpaintner K, Rashford M, Nasmyth-Miller C, Voulgari A, Spleiss O, Truman M, Essioux L (2008) Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl Int* 21(9):879–891
  39. Eng HS, Mohamed Z, Calne R, Lang CC, Mohd MA, Seet WT, Tan SY (2006) The influence of *CYP3A* gene polymorphisms on cyclosporine dose requirement in renal allograft recipients. *Kidney Int* 69(10):1858–1864
  40. Bandur S, Petrasek J, Hribova P, Novotna E, Brabcova I, Viklicky O (2008) Haplotypic structure of *ABCB1/MDR1* gene modifies the risk of the acute allograft rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 86(9):1206–1213
  41. Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van Gelder T, van Schaik RH (2012) The new *CYP3A4* intron 6C>T polymorphism (*CYP3A4*\*22) is associated with an increased risk of delayed graft function and worse renal function in cyclosporine-treated kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics* 22(5):373–380

# CYP2C8\*3 Polymorphism and Donor Age are Associated With Allograft Dysfunction in Kidney Transplant Recipients Treated With Calcineurin Inhibitors

The Journal of Clinical Pharmacology  
 53(4) 427–434  
 © The Author(s) 2013  
 DOI: 10.1002/jcph.15

Guillermo Gervasini, PhD<sup>1</sup>, Montserrat Garcia, BSc<sup>1</sup>, Rosa María Macias, MD<sup>2</sup>, Julio Benitez, MD, PhD<sup>1</sup>, Francisco Caravaca, MD, PhD<sup>2</sup>, and Juan Jose Cubero, MD, PhD<sup>2</sup>

## Abstract

Epoxieicosatrienoic acids (EETs) play a protective role against damaging processes in the kidney. We have assessed the effect of polymorphisms in EETs-producing enzymes (CYP2C8 and CYP2J2) and other proteins involved in calcineurin inhibitors (CNIs) disposition (CYP3A4, CYP3A5, and ABCB1) on graft function and clinical outcome in 166 renal transplant recipients treated with CNIs. Both CYP2C8\*3 and donor age greater than 48 years were associated to a higher incidence of delayed graft function (DGF) [OR = 2.01 (1.1–4.1),  $P = .04$  and 5.14 (2.4–10.9),  $P < .0001$ ; respectively] and worse creatinine clearance 1 year after grafting ( $P < .05$  and  $P < .001$ , respectively). In addition, carrying 4–6 variants in the 3 ABCB1 loci and older donor age were individually associated to higher incidence of calcineurin-inhibitor-induced nephrotoxicity [OR = 2.38 (1.1–5.4),  $P = .03$  and OR = 1.03 (1.01–1.06),  $P = .038$ ]. Regression analyses confirmed the relevant effect of both CYP2C8\*3 and donor age on graft dysfunction. Carrying the 2C8\*3 allele and having a donor older than 48 years was defined as a *high-risk* status and observed to be highly related to DGF [OR = 3.91 (1.46–10.48),  $P < .01$ ] and worse creatinine clearance ( $P = .033$ ). Our results show that genetic and clinical parameters can be combined to identify risk factors for allograft dysfunction in renal transplant recipients.

## Keywords

ABCB1, anticalcineurin inhibitors, CYP2C8, polymorphisms, renal transplant

Epoxieicosatrienoic acids (EETs) are arachidonic acid (AA) metabolites that have been shown to regulate vascular homeostasis, by modulating the intracellular transport of electrolytes, maintaining vascular smooth muscle tone, and presenting anti-inflammatory properties.<sup>1,2</sup> *In vitro* and animal studies have suggested that the EETs are vasodilatory and that can play a protective role against damaging processes that may occur in solid organ transplantation.<sup>3–5</sup> Several CYP450 isoforms are known to mediate the biosynthesis of EETs, albeit with different efficacies.<sup>6,7</sup> In humans, CYP2J2 and CYP2C8 appear to be mostly responsible for this metabolism in several organs, namely heart, liver, brain, vessels endothelium, and also in kidney.<sup>3,6,8–10</sup> Indeed, endothelial expression of these two enzymes has been shown to lower blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice.<sup>11</sup> Both CYP2J2 and CYP2C8 enzymes are subject to polymorphisms, with CYP2J2\*7 (rs890293) and CYP2C8\*3 (rs10509681) being the most common variants in Caucasians that affect enzymatic activity.<sup>12,13</sup> CYP2C8\*3 has a frequency of 17% in Spaniards,<sup>14</sup> whilst CYP2J2\*7 reported frequencies in Caucasians are lower than 10%.<sup>15</sup>

Since the introduction of calcineurin inhibitors (CNIs), acute rejection rates in renal transplantation have been

significantly reduced to roughly 15%.<sup>16</sup> However, the incidence of delayed graft function (DGF) in kidneys from deceased donors has increased over time to more than 20%.<sup>17</sup> Tacrolimus and cyclosporine, the two major CNIs, are known to cause nephrotoxicity, which occurs in 30% of the so-called troubled transplants.<sup>18</sup> It has been suggested that recipients carrying allelic variants in EETs-synthesizing enzymes would be more prone to develop CNI-induced nephrotoxicity when challenged with these drugs.<sup>19</sup> In addition, both tacrolimus and cyclosporine are metabolized by CYP3A4 and

<sup>1</sup>Division of Pharmacology, Department of Medical and Surgical Therapeutics, Medical School, University of Extremadura, Badajoz, Spain

<sup>2</sup>Service of Nephrology, Infanta Cristina University Hospital, Badajoz, Spain

Submitted for publication 9 May 2012; accepted 9 July 2012.

## Corresponding Author:

Guillermo Gervasini, PhD, Department of Medical and Surgical Therapeutics Division of Pharmacology, Medical School University of Extremadura Av. Elvas s/n 06071, Badajoz, Spain  
 Email: ggervasi@unex.es

CYP3A5.<sup>20,21</sup> Two common polymorphisms in these enzymes, *CYP3A4\*1B* (rs2740574) and especially *CYP3A5\*3* (rs776746), have been shown to affect CNIs pharmacokinetics. Most notably, patients expressing CYP3A5 (*CYP3A5\*1* allele) have lower tacrolimus concentrations and higher dose requirements than non-expressers (*CYP3A5\*3/\*3* genotype).<sup>22</sup> However, the impact of these polymorphisms on cyclosporine pharmacokinetics or in the clinical outcome of the transplant remains controversial.<sup>23,24</sup> Finally, these two drugs are also substrates for P-glycoprotein,<sup>25</sup> an efflux transporter whose major polymorphisms (C1236T, G2677T/A, and C3435T) have also been assessed in relation to the outcome of renal transplant, although no definitive conclusions have as yet been reported.<sup>24</sup>

Given the allegedly protective role that EETs play against inflammatory and vascular processes that lead to complications after renal transplant, we hypothesized that polymorphisms in EETs-producing enzymes (CYP2C8 and CYP2J2) may be related to clinical parameters and outcomes in kidney transplant recipients treated with CNIs. Additionally, we retrospectively assessed whether polymorphisms in enzymes and transporters involved in CNIs disposition may also impact clinical variables recorded up to 1 year after renal transplantation.

## Patients and Methods

A total of 166 consecutive adult renal transplant recipients were included in the study. The patients were all of Caucasian origin and received a single kidney at the Infanta Cristina Hospital (Badajoz, Spain). All transplants were carried out from deceased donors.

The patients received triple immunosuppressive therapy with mycophenolate mofetil (2 g/day), a tapering schedule of corticoids (500 mg IV methylprednisolone at the time of surgery, 125 mg intravenously (IV) the following day and then 20 mg of oral prednisone daily, progressively tapered to 5 mg daily at 2 months after transplantation) and either cyclosporine (n = 63) or tacrolimus (n = 103). Cyclosporine was the traditional CNI used in these patients since the implementation of the transplant program in our Hospital until it was later replaced by tacrolimus. Tacrolimus starting dose was set to 0.1 mg/kg administered twice a day. Initial dosage of cyclosporine was 4–10 mg/kg/day divided into two administrations. The first dose was administered orally shortly before transplantation or IV in the perioperative period when the patient's condition did not support the enteral route. The amount of drug administered IV was one-third of the oral dose. Further doses of immunosuppressants were subsequently adjusted according to blood concentrations. Subjects with a chronic use of substances known to interfere with tacrolimus or cyclosporine disposition were excluded from the study.

Renal function was assessed by creatinine clearance values (mL/min) that were retrieved from medical records at 1 week, 1 month, 5 months, and 1 year after grafting. DGF was defined as the need for dialysis within the first week after transplantation and/or creatinine clearance <10 mL/min during the first postoperative 3 days.

CNI-induced nephrotoxicity was clinically diagnosed on the basis of (i) impairment of renal function defined by elevated serum creatinine values (25% increase from basal figures) coinciding with high CNI plasma levels with subsequent decrease following dose reduction and/or (ii) exclusion of renal impairment as a result of an acute rejection episode (ARE) either proved by biopsy and/or judged by clinical evaluation (see below). No protocol biopsies were performed in individuals with stable graft function in this study. Acute allograft rejection was established by histological findings in renal biopsies according to the 1997 Banff classification and/or by clinical evaluation when patients presented with a rise  $\geq 0.30$  mg/dL in serum creatinine not coincidental with supratherapeutic CNI predose concentrations, fever without signs of infection, graft swelling or tenderness, oliguria, increased resistive index on Doppler ultrasonography, or clinical response to steroid treatment consistent with rejection. Diagnosis was confirmed by biopsy in all corticoid-resistant patients.

All participants gave oral and written consent for their participation. The study was approved by the Ethics Committee of the Infanta Cristina University Hospital and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and its subsequent revisions.

## Genotype Analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes in 2 mL whole blood samples using a QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

The determination of the CYP450 polymorphisms (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C8\*3*, and *CYP2J2\*7*) was carried out by PCR—restriction fragment length polymorphism techniques described elsewhere.<sup>12,13,26,27</sup> The three *ABCB1* polymorphisms assessed (C3435T, G2177T/A, and C1236T) were identified by direct sequencing using an ABI 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using previously reported oligonucleotides and PCR conditions.<sup>28</sup>

## Statistical Analyses

The statistical power of the sample size was evaluated with a genetic model analyzing the frequency for carriers of the variant alleles with arbitrarily established effect size at 2.0 ( $\alpha = 0.05$ ). With the available sample size, the power for unilateral associations with efficacy and safety parameters was 0.835. Power calculations were made with the program G\*Power version 3.1.3. Student's *t*-test or Mann–Whitney tests were used to compare means

between groups with different genotypes. ANOVA-Bonferroni or Kruskal–Wallis tests were used when more than two groups were present. For the univariate analysis of the associations between categorical data, Fisher's exact test or Pearson's  $X^2$  were used as appropriate. Regression analyses were performed to collectively assess the impact of categorical and numerical variables. Genotypes previously identified as risk factors were included in the different models together with demographic and clinical covariates (gender, recipient and donor age, cold ischemia time, time in dialysis, DGF, CNI-induced nephrotoxicity, ARE, total HLA mismatches, or panel-reactive antibodies—PRA—levels) with the potential to affect a given outcome. Clinical covariates incorporated in each model were chosen according to the dependent variable (DGF, creatinine clearance, CNI-induced nephrotoxicity, and ARE). The median donor age (48 years) was used as cut-point to stratify kidney recipients according to this parameter. In all instances, differences were considered to be significant when  $P$  values were under 0.05.

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 15.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

Clinical characteristics of the 166 transplant recipients enrolled in the study are presented in Table 1. No differences were observed in the different outcomes

**Table 1.** Characteristics of Patients and Transplantation-Related Parameters

Sex (male/female)	98/68
Recipient age (years)	45.7 ± 17.1
Primary kidney disease	
Glomerulonephritis	61 (36.7)
Chronic interstitial nephritis	21 (12.7)
Polycystic kidney disease	18 (10.8)
Uncertain	48 (28.9)
Other <sup>a</sup>	18 (10.8)
Type of dialysis (hemodialysis/peritoneal)	115 (69.3)/51 (30.7)
Duration of dialysis before transplantation (months)	39.9 ± 33.3
Donor age (years)	43.8 ± 18.4
Number of transplants (first/second/third)	156 (94.0)/9 (5.4)/1 (0.6)
Cold ischemia time (h)	17.4 ± 5.6
Total HLA mismatches	2.93 ± 1.08
Panel reactive antibodies greater than 50%	12 (7.2)
Induction therapy <sup>b</sup>	38 (22.9)

Data are shown as number (percentage) or mean ± standard deviation.

<sup>a</sup>Other causes included diabetic nephropathy, Alport's syndrome, hemolytic uremic syndrome, nephroangiosclerosis, nephronophtisis, and ischemic nephropathy.

<sup>b</sup>Patients were treated with antibodies against interleukin-2 receptor. No induction therapy with antithymocyte globulin was implemented in these subjects.

**Table 2.** Distribution of Assessed Genotypes in the 166 Patients

Polymorphism	N (%)	MAF
<i>CYP2C8*3</i>		
1*/1*	113 (67.8)	0.17
1*/3*	50 (30.4)	
3*/3*	3 (1.8)	
<i>CYP2J2*7</i>		
*1/*1	160 (96.5)	0.02
*1/*7	5 (2.9)	
*7/*7	1 (0.6)	
<i>CYP3A4*1B</i>		
*1A/*1A	159 (95.9)	0.02
*1A/*1B	6 (3.5)	
*1B/*1B	1 (0.6)	
<i>CYP3A5*3</i>		
*1/*1	2 (1.2)	0.07
*1/*3	18 (10.9)	
*3/*3	146 (87.9)	
<i>C3435T</i>		
CC	49 (29.8)	0.46
CT	80 (48)	
TT	37 (22.2)	
<i>G2677T/A</i>		
GG	63 (37.9)	0.38
GT/GA	77 (46.4)	
TT	26 (15.7)	
<i>C1236T</i>		
CC	58 (35.1)	0.40
CT	82 (49.1)	
TT	26 (15.8)	

N, number of subjects; MAF, minor allele frequency.

measured with regard to the immunosuppressant utilized (data not shown).

Table 2 shows the frequency of the seven studied polymorphisms (*CYP3A4\*1B*, *CYP3A5\*3*, *CYP2C8\*3*, *CYP2J2\*7*, and *ABCBI* C3435T, G2677T/A, and C1236T). Allele frequencies in the population of study were all in Hardy–Weinberg equilibrium (data not shown). Partial linkage disequilibrium ( $D' = 0.99$ ,  $r^2 = 0.35$ ) between the *CYP3A4\*1B* and *CYP3A5\*3* polymorphisms resulted in all subjects carrying the *CYP3A4\*1B* variant also harboring at least one *CYP3A5\*1* wild type allele.

### Graft Function

DGF occurred in 49 of the 166 patients (29.5%) and was found to be associated with the presence of the *CYP2C8\*3* variant allele [odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI): OR = 2.01, CI (1.1–4.1),  $P = .04$ ; vs. *CYP2C8\*1/\*1* carriers]. With regard to non-genetic factors, an older age of both the recipient and the donor was found to be strongly associated to higher incidence of DGF. Mean age of recipients with and without DGF were, respectively  $51.6 \pm 13.2$  and  $43.0 \pm 14.3$  years ( $P < .001$ ). Mean donor age in the groups of patients with



and without DGF were, respectively  $53.7 \pm 13.9$  and  $39.8 \pm 18.5$  years [OR for having a donor over 48 years of age = 5.14 (2.41–10.96),  $P < .0001$ ]. When regression analysis was carried out introducing additional covariates (see Patients and Methods Section), the effect of the *CYP2C8\*3* was increased [OR = 2.42 (1.09–5.37),  $P = .03$ ], whilst only donor age greater than 48 years retained its significance as a non-genetic risk factor [OR = 4.29 (1.82–10.12),  $P = .001$ ].

In the whole population of patients, mean creatinine clearance increased from  $55.7 \pm 25.1$  mL/min on the first week to  $76.2 \pm 33.5$  mL/min 1 year after grafting. Subjects carrying the *CYP2C8\*3* variant (*\*1/\*3* or *\*3/\*3* genotypes) consistently showed lower creatinine clearance values than *CYP2C8\*1/\*1* carriers in the period of study, with differences at 1 month, 5 months, and 1 year after transplantation reaching statistical significance (Table 3). Creatinine clearance was also lower in carriers of the *CYP2J2\*7* allele throughout the study, but the association was not statistically significant at any time-point. In addition, carriers of at least one *CYP3A5\*1* allele displayed lower clearance as compared to *CYP3A5\*3/\*3* subjects, with differences increasing at the later stages of the study (Table 3). None of the different *ABCB1* polymorphisms studied showed a significant impact on renal function (data not shown).

As in the case of DGF, older donor and recipient age correlated significantly with lower creatinine clearance throughout the whole period of study (Pearson's  $P < .001$  at all time points for both variables, except at 1 year for recipient age,  $P = .08$ ). However, a statistical model including *CYP2C8*, *CYP3A5*, and *CYP2J2* genotypes as genetic covariates and gender, donor and recipient age, time in dialysis, DGF, ARE, and CNI-induced nephrotoxicity as clinical covariates, revealed that 1 year after grafting only donor age was still highly related to lower creatinine clearance ( $P < .001$ ) whilst the effect of

*CYP2C8\*3* was close to the border of statistical significance ( $P = .06$ ).

#### Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity

Out of the 166 kidney transplant recipients, 35 (21.1%) developed CNI-induced nephrotoxicity during the period of study. None of the *CYP450* polymorphisms were associated with nephrotoxicity. In contrast, the analysis of *ABCB1* polymorphisms revealed that 3435TT carriers were at moderate higher risk of developing nephrotoxicity in comparison with 3435CC homozygous wild type subjects [OR = 2.26 (0.9–6.0)] (Table 4). After re-analyzing the data using a recessive model, that is, TT versus CC+CT carriers, the statistical significance of the association was increased [OR = 2.70 (1.2–6.13),  $P = .02$ ]. In order to collectively assess the effect of the *ABCB1* polymorphisms, we compared the total number of allelic variants harbored in the three loci studied (1236, 32177, and 3435) and found that patients carrying 4–6 variants were significantly overrepresented in the nephrotoxicity group, as compared to patients carrying only 0–3 minor alleles [OR = 2.38 (1.1–5.4),  $P = .03$ ] (Table 4). Among non-genetic parameters, only older donor age was associated with a higher incidence of CNI-induced nephrotoxicity (mean age  $\pm$  SD for patients with and without nephrotoxicity was, respectively  $52.0 \pm 14.7$  versus  $41.4 \pm 18.8$  years;  $P = .001$ ).

The number of *ABCB1* variants harbored was included in a binary logistic regression model along with demographic and clinical parameters (see Patients and Methods Section) to evaluate the potential of these variables as risk factors. Older donor age was weakly associated with nephrotoxicity [OR = 1.03 (1.01–1.06),  $P = .038$ ], whilst the effect of *ABCB1* variant alleles became non-significant [OR = 2.31 (.92–5.81),  $P = .07$ ]. DGF was identified as the most significant risk factor for

**Table 3.** Associations of *CYP450* Polymorphisms With Creatinine Clearance at Four Different Time Points After Transplantation

Polymorphism	N (%)	1 Week	1 Month	5 Months	1 Year
<i>CYP2C8*3</i>					
<i>1*1*</i>	113 (68.1)	56.5 $\pm$ 25.8	61.9 $\pm$ 26.7	73.6 $\pm$ 30.6	79.6 $\pm$ 36.2
<i>1*3*+3*3*</i>	53 (31.9)	53.8 $\pm$ 23.4	53.1 $\pm$ 23.3*	63.5 $\pm$ 22.2*	68.3 $\pm$ 24.7*
<i>CYP2J2*7</i>					
<i>*1/*1</i>	160 (96.5)	56.1 $\pm$ 24.8	59.5 $\pm$ 26.0	71.3 $\pm$ 28.5	76.8 $\pm$ 33.7
<i>*1/*7+*7/*7</i>	6 (3.5)	45.4 $\pm$ 35.7	48.1 $\pm$ 24.2	48.4 $\pm$ 21.3	58.8 $\pm$ 21.9
<i>CYP3A5*3</i>					
<i>*3/*3</i>	146 (87.9)	55.3 $\pm$ 25.9	50.61 $\pm$ 23.6	56.1 $\pm$ 26.5	59.1 $\pm$ 24.1
<i>*1/*1+*1/*3</i>	20 (12.1)	55.7 $\pm$ 25.2	60.6 $\pm$ 26.2	72.6 $\pm$ 28.6*	79.2 $\pm$ 34.3**
<i>CYP3A4*1B</i>					
<i>*1A/*1A</i>	159 (95.9)	55.4 $\pm$ 25.1	59.7 $\pm$ 48.4	71.1 $\pm$ 28.1	77.2 $\pm$ 33.7
<i>*1A/*1B+*1B/*1B</i>	7 (4.1)	63.2 $\pm$ 27.4	48.4 $\pm$ 27.5	55.8 $\pm$ 35.5	50.8 $\pm$ 10.7

Mean  $\pm$  standard deviation values (mL/min) are shown.

N, number of subjects.

\* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ .

**Table 4.** Effect of *ABCB1* Genotypes on the Incidence of Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity

Polymorphism	Genotype	Nephrotoxicity, N (%)	No Nephrotoxicity, N (%)	OR (CI)	P-value
C3435T	C/C	11 (29.7)	40 (31.0)	Reference	.05
	C/T	12 (32.4)	66 (51.2)	0.74 (0.3–1.9)	
	T/T	14 (37.8)	23 (17.8)	2.26 (0.9–6.0)	
G2177T <sup>a</sup>	G/G	15 (41.7)	49 (38.3)	Reference	.24
	G/T	13 (36.1)	61 (47.7)	0.63 (0.3–1.5)	
	T/T	8 (22.1)	18 (14.1)	1.51 (0.5–4.2)	
C1236T	C/C	16 (43.2)	44 (34.1)	Reference	.35
	C/T	14 (37.8)	66 (51.2)	0.59 (0.3–1.3)	
	T/T	7 (18.9)	19 (14.7)	1.08 (0.4–3.1)	
3435–2177–1236 <sup>b</sup>	0–3	22 (59.5)	102 (79.1)	Reference	.03
	4–6	15 (40.5)	27 (20.9)	2.38 (1.1–5.4)	

CNI, calcineurin inhibitors; OR, odds ratio with 95% confidence intervals (CI).

<sup>a</sup>Two subjects with the 2177GA genotype were excluded from the analysis.

CNI-induced nephrotoxicity [OR = 4.94 (1.91–12.80),  $P = .001$ ].

#### Acute Rejection

Twenty-nine patients (17.5%) experienced ARE according to diagnostic criteria described in the Patients and Methods Section. A trend was observed towards higher risk in carriers of the *CYP2C8\*3* allele. Twelve patients (42.9%) were carriers of the *CYP2C8\*3* variant in the ARE group as compared to only 29.7% ( $N = 41$ ) of *2C8\*3* carriers in the group of patients without rejection [OR = 1.8 (0.8–4.1),  $P = .103$ ]. In addition, donor age was significantly associated with the incidence of ARE. Mean donor age in the group of patients who underwent ARE was  $49.9 \pm 15.6$  years versus  $42.6 \pm 18.7$  years in the remaining 137 patients ( $P = .04$ ). However, the association with donor age and *CYP2C8\*3* was lost after applying a logistic regression model including other clinical variables (see Patients and Methods Section). Only DGF was identified as a significant risk factor for ARE [OR = 7.75 (2.67–22.47),  $P < .001$ ].

Finally, the population of study was stratified according to the most relevant risk factors for graft dysfunction identified in the former analyses, *CYP2C8\*3* and donor age. Patients were divided into (i) a *high-risk* group comprising those individuals carrying the *CYP2C8\*3* allele who received a kidney from a donor over 48 years of age, and (ii) a *standard-risk* group containing the rest of subjects. In a statistical model including additional genetic and non-genetic covariates, the *high-risk* status was the only variable that showed a significant association ( $P = .035$ ) with lower creatinine clearance values 1 year after grafting (Figure 1).

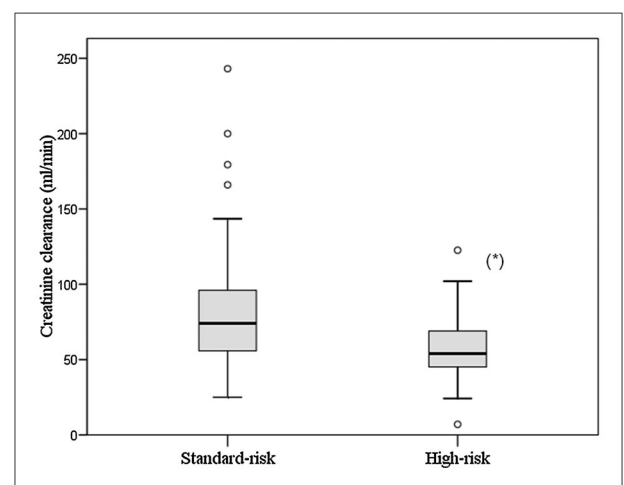
Table 5 shows the OR values obtained by binary logistic regression for the two risk groups with regard to the different clinical outcomes measured. Most notably, the *high-risk* status showed a strong association with DGF [OR = 4.15 (1.53–11.30),  $P < .01$ ]. Associations with

CNI-induced nephrotoxicity and ARE did not reach statistical significance (Table 5).

#### Discussion

The vast majority of studies designed to investigate the impact of genetics on renal function and clinical outcomes in renal transplant recipients have been focused on polymorphisms in the *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *ABCB1* genes, which are involved in CNIs disposition. However, the effect of polymorphisms in enzymes responsible for EETs biosynthesis from AA, such as *CYP2C8* and *CYP2J2*, which play a protective role against vascular and inflammatory processes<sup>4,8</sup> that could result in adverse outcomes have not as yet been tested.

Our results show that the *CYP2C8\*3* allele was associated with the incidence of DGF in our population of study. DGF affects 10–40% of deceased-donor kidney recipients<sup>29</sup> and has multiple causes, including donor and



**Figure 1.** Effect of the *high-risk* status (carrying the *CYP2C8\*3* allele and receiving a kidney from a donor over the age of 48) on creatinine clearance one year after grafting. \* $P = .035$ .

**Table 5.** Associations of Different Clinical Outcomes With the Risk Status Conferred by Donor Age Older Than 48 Years and the CYP2C8\*3 Allele

Group	N	DGF	No DGF	OR (CI) <sup>a</sup>	P-value	CNItoxic	No CNItoxic	OR (CI)	P	ARE	No ARE	OR (CI)	P-value
Standard-risk	142	35 (71.4)	107 (91.5)	Ref.		27 (77.1)	115 (87.8)	Ref.		22 (75.8)	120 (87.6)	Ref.	
High-risk	24	14 (28.6)	10 (8.5)	3.91 (1.5–10.5)	<.01	8 (22.9)	16 (12.2)	1.59 (0.5–4.6) <sup>b</sup>	.397	7 (24.2)	17 (12.4)	1.83 (0.6–5.9)	.316

The number of subjects and percentages (in parentheses) are shown.

N, number of subjects; DGF, delayed graft function; ARE, acute rejection episode; CNItoxic, CNI-induced nephrotoxicity.

<sup>a</sup>Odds ratio values with 95% confidence intervals [OR (CI)] were calculated by binary logistic regression incorporating demographic, clinical and genetic variables mentioned in the Patients and Methods Section.

<sup>b</sup>The model utilized to calculate the OR for CNI-induced nephrotoxicity included the total number of ABCB1 variants (0–3 vs. 4–6) as well as other parameters described in the Patients and Methods Section.

recipient factors and transplantation procedures that produce severe ischemia reperfusion lesions.<sup>30</sup> The observed association with CYP2C8\*3 confirms our working hypothesis, that is, a reduced CYP2C8 activity would lead to low EETs levels and could eventually result in higher susceptibility to renal injury. Indeed, previous *in vitro* data show that the CYP2C8\*3 variant is able to reduce the *in vitro* biotransformation of AA to EETs by 75%.<sup>19</sup> In this regard, our group has recently reported a similar statistical trend for higher risk of DGF in tacrolimus-treated patients carrying the 2C8\*3 allele,<sup>31</sup> although no regression analyses were performed to evaluate the effect of other putative risk factors, as it is the case in the present study.

On the other hand, CYP2J2\*7 did not correlate with the incidence of DGF. This would indicate that CYP2J2 probably plays a lesser role than CYP2C8 in the biosynthesis of EETs involved in maintaining vascular homeostasis in the kidney. In line with this, a much higher rate of EET production *in vitro* for CYP2C8 than for CYP2J2 has been reported.<sup>19</sup> Furthermore, in a study carried out in human normal tissue samples, Enayetallah et al.<sup>32</sup> found a higher expression of CYP2C8 protein than CYP2J2 in the kidney. In any case, there is also the possibility that the low frequency of the CYP2J2\*7 allele in the population sample (2%) may have avoided obtaining statistically significant results. In this regard, the frequency of this polymorphism has not yet been tested in Spaniards. Other studies in Caucasians have reported slightly higher frequencies but always below 10%.<sup>15</sup> As for CYP2C8\*3, the observed frequency (17%) was identical to that found in a previous study with healthy Spanish volunteers.<sup>14</sup>

We have also shown that donor age was a risk factor for DGF, which is consistent with previous reports on renal transplant recipients,<sup>33–35</sup> although contradictory results also exist.<sup>29,36</sup> Interestingly enough, we showed that the combination of both risk factors, that is, harboring the CYP2C8\*3 allele and receiving a kidney from a donor over 48 years of age, strikingly increased the association with DGF to a significant OR of 4.15. To our knowledge this is the first time that these polymorphisms are combined with non-genetic factors to identify risk factors for graft dysfunction in the renal transplant setting.

Mirroring the results for the DGF analysis, CYP2C8\*3 was the polymorphism more significantly associated with impaired creatinine clearance at the four time points of the study, and our results show that it could constitute a useful independent predictor of impaired creatinine clearance when considered along with donor age. The role of other CYP polymorphisms studied seems to be minor or negligible, which is consistent with previous results.<sup>34</sup> In the same manner, we did not observe a modulation of creatinine clearance or the risk for DGF by ABCB1

polymorphisms. In contrast to this and other similar findings,<sup>31,34,37</sup> Cattaneo et al.<sup>38</sup> reported a higher susceptibility to DGF for kidney recipients who were carriers of *ABCB1* allelic variants, suggesting that accumulation of the CNI derived from decreased efflux transport could explain a higher incidence of DGF. In any case, the determination of the *ABCB1* genotype in both recipients and donors would likely be more indicative of CNI accumulation in the graft.<sup>39</sup> Unfortunately, we did not have access to genetic material from donors in this study. The alternative of using biopsied tissue as a source of DNA was not viable. As it is stated in the Patients and Methods Section, our Hospital transplant procedures do not contemplate performing protocol biopsies in subjects with stable graft function or in those with unambiguous clinical data. Therefore, we could not obtain enough biopsies for the determination of an adequate number of genotypes to carry out statistical associations with clinical data.

We did observe an association of *ABCB1* polymorphisms with the occurrence of CNI-induced nephrotoxicity. In particular, the presence of a high number (4–6) of variants in the 3 loci analyzed was identified as a putative risk factor, together with donor age and DGF. Carriers of a higher number of variants would presumably have a decreased P-glycoprotein transporting ability leading to drug accumulation and higher risk of nephrotoxicity, especially in patients with kidneys from older donors. Indeed, donor age has been suggested to play a significant role in determine the kidney susceptibility to CNI-induced nephrotoxicity, as kidneys from older individuals deteriorate more quickly.<sup>40</sup> A limitation of the results presented herein is that not all patients with signs of nephrotoxicity in our center are biopsied, and therefore potential underreporting of the true incidence of CNI-induced nephrotoxicity might have occurred.

Smith et al. have identified *CYP2C8\*3* as a risk factor for chronic kidney disease in liver transplant recipients treated with CNIs,<sup>19</sup> a finding that we failed to reproduce in our study. A reason for this discrepancy could be that the study by Smith et al. had a longer duration (3 years), and therefore they could include patients that developed nephrotoxicity at a later stage. It should be noted that in the study by Smith et al. the association was significant for tacrolimus-treated patients but not for those on cyclosporine.

The same hypothesis sustained for the involvement of *CYP2C8\*3* in worse graft function is valid for ARE, as reduced levels of EETs would compromise endogenous mechanisms of defense against processes leading to graft rejection. However, the level of significance for the association with *2C8\*3* was notably lower in this case. Other clinical parameters seemed to be more relevant for the development of ARE and likely overshadow the effect of genetic variants. In particular, DGF showed a highly

significant OR (7.02,  $P < .001$ ), a finding that has also been observed in previous studies with renal transplant recipients.<sup>35</sup>

In summary, we have shown that the *CYP2C8\*3* variant and donor age are associated with clinical parameters related to worse graft function in renal transplantation. The combinations of these two parameters may be used to obtain an independent risk factor for the incidence of DGF and lower creatinine clearance in kidney recipients. The association of this *high-risk* factor with the occurrence of CNI-induced nephrotoxicity or ARE was not significant, but other genetic variables, such as *ABCB1* polymorphisms, may play a significant role. Further studies including donors' genetic material as well as expression of EETs-producing enzymes in the allograft will help identify additional risk factors for these adverse events.

## Funding

This work has been supported in part by grant GR10022 from "Junta de Extremadura, Consejería de Economía, Comercio e Innovación" and grant PRIS11003 from "Fundación para la formación y la investigación de los profesionales de la salud de Extremadura (FUNDESALUD)," Merida, Spain.

## References

1. Node K, Huo Y, Ruan X, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285:1276–1279.
2. Rahman M, Wright JT, Jr., Douglas JG. The role of the cytochrome P450-dependent metabolites of arachidonic acid in blood pressure regulation and renal function: a review. *Am J Hypertens*. 1997;10:356–365.
3. Alkayed NJ, Goyagi T, Joh HD, et al. Neuroprotection and P450 2C11 upregulation after experimental transient ischemic attack. *Stroke*. 2002;33:1677–1684.
4. Fisslthaler B, Popp R, Michaelis UR, Kiss L, Fleming I, Busse R. Cyclic stretch enhances the expression and activity of coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Hypertension*. 2001;38:1427–1432.
5. Paller MS, Jacob HS. Cytochrome P-450 mediates tissue-damaging hydroxyl radical formation during reoxygenation of the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:7002–7006.
6. Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, et al. Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys*. 1996;330:87–96.
7. Capdevila JH, Falck JR, Harris RC. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res*. 2000;41:163–181.
8. Wu S, Chen W, Murphy E, et al. Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272:12551–12559.
9. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J Biol Chem*. 2001;276:36059–36062.
10. Zeldin DC, DuBois RN, Falck JR, Capdevila JH. Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform. *Arch Biochem Biophys*. 1995;322:76–86.
11. Lee CR, Imig JD, Edin ML, et al. Endothelial expression of human cytochrome P450 epoxygenases lowers blood pressure and attenuates hypertension-induced renal injury in mice. *FASEB J*. 2010;24:3770–3781.

12. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*. 2001;11:597–607.
13. King LM, Ma J, Srettabunjong S, et al. Cloning of CYP2J2 gene and identification of functional polymorphisms. *Mol Pharmacol*. 2002;61:840–852.
14. Martinez C, Garcia-Martin E, Blanco G, Gamito FJ, Ladero JM, Agundez JA. The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:62–69.
15. Berlin DS, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2: CYP2J2. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;21:308–311.
16. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*. 2011;378:1428–1437.
17. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*. 2011;11:2279–2296.
18. Gourishankar S, Leduc R, Connett J, et al. Pathological and clinical characterization of the ‘troubled transplant’: data from the DeKAF study. *Am J Transplant*. 2010;10:324–330.
19. Smith HE, Jones JP III, Kalhorn TF, et al. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18:943–953.
20. Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF. Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos*. 1992;20:753–761.
21. Kronbach T, Fischer V, Meyer UA. Cyclosporine metabolism in human liver: identification of a cytochrome P-450III gene family as the major cyclosporine-metabolizing enzyme explains interactions of cyclosporine with other drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 1988;43:630–635.
22. Thervet E, Anglicheau D, King B, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76:1233–1235.
23. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49:141–175.
24. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49:207–221.
25. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993;268:6077–6080.
26. Cavalli SA, Hirata MH, Hirata RD. Detection of MboII polymorphism at the 5′ promoter region of CYP3A4. *Clin Chem*. 2001;47:348–351.
27. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem*. 2002;48:1668–1671.
28. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1889–1896.
29. Jung GO, Yoon MR, Kim SJ, et al. The risk factors of delayed graft function and comparison of clinical outcomes after deceased donor kidney transplantation: single-center study. *Transplant Proc*. 2010;42:705–709.
30. Marshall R, Ahsan N, Dhillon S, Holman M, Yang HC. Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function. *Surgery*. 1996;120:663–665; discussion 6.
31. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int*. 2012;25:471–480.
32. Enayattallah AE, French RA, Thibodeau MS, Grant DF. Distribution of soluble epoxide hydrolase and of cytochrome P450 2C8, 2C9, and 2J2 in human tissues. *J Histochem Cytochem*. 2004;52:447–454.
33. Krajewska M, Koscielska-Kasprzak K, Weyde W, et al. Impact of donor-dependent genetic factors on long-term renal graft function. *Transplant Proc*. 2009;41:2978–2980.
34. Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, et al. Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation. *Ther Drug Monit*. 2011;33:178–184.
35. Bronzatto EJ, da Silva Quadros KR, Santos RL, Alves-Filho G, Mazzali M. Delayed graft function in renal transplant recipients: risk factors and impact on 1-year graft function: a single center analysis. *Transplant Proc*. 2009;41:849–851.
36. Dominguez J, Lira F, Troncoso P, Aravena C, Ortiz M, Gonzalez R. Factors that predict duration of delayed graft function in cadaveric kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:2668–2669.
37. Glowacki F, Lionet A, Buob D, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26:3046–3050.
38. Cattaneo D, Ruggenenti P, Baldelli S, et al. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1404–1415.
39. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1501–1511.
40. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:2468–2480.