

**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

Desarrollo de modelos farmacocinéticos de Tacrolimus en distintas poblaciones de pacientes trasplantados hepáticos: caracterización de variables clínicas y genéticas asociadas a la variabilidad farmacocinética/farmacodinámica.

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

***Médico Pediatra: Jefferson Antonio Buendía Rodríguez***

***Director de Tesis: Prof. Guillermo Bramuglia.***

**2014**

## **Agradecimientos.**

A mis padres por apoyarme incondicionalmente, por haber estado siempre allí escuchando, alentando y dando todo con amor en sus hijos.

A mi esposa, por amarme y estar a mi lado brindándome cariño, paz y tranquilidad.

A mis hijos, Juan y Nicolas, por ser los motores que me incentivan a ser mejor padre, hermano, hijo, médico y maestro.

A Guillermo Bramuglia por su enorme capacidad en abrir caminos, generar oportunidades y creer en las personas.

A la Universidad de Antioquia, Colfuturo y Andrés Felipe Zuluaga por apostar por en el talento de mi país.

A la Fundación Investigar, Argenomics y Lucas Alterman por todo el apoyo y colaboración recibida en este proyecto

A Maria Teresa Garcia de Davila, Paula Schaiquevich , Paulo Caceres, Natalia Riva, Andrea Bosaleh , Esteban Halac y el equipo de trasplante hepático pediátrico por su interés y enorme colaboración en la realización de parte de este trabajo en el Hospital de Pediatría J.P Garrahan,

A Federico Villamil, Fernando Cairo y el equipo de trasplante del hospital Británico por el apoyo brindado durante la realización del trabajo en población adulta.

**Los resultados expuestos en la presente tesis doctoral, han sido parcialmente publicados en los artículos citados a continuación:**

Buendia JA, Bramuglia G, Staatz CE . Effects of combinational CYP3A5 6986A>G polymorphism in graft liver and native intestine on the pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients: a meta-analysis. Ther Drug Monit. 2014 Aug;36:442-7

Jefferson Buendia, Esteban Halac, Andrea Bosaleh, Paula Schaiquevich, María de Davila, Guillermo Bramuglia, Oscar Inventarza. Concentraciones plasmáticas del Tacrolimus y rechazo agudo temprano en el trasplante hepático pediátrico. XXII Congreso Latinoamericano y del Caribe de la Sociedad de Trasplante de America Latina y del Caribe, Buenos Aires, Argentina; Dic 5,2013

Jefferson Antonio Buendía, Esteban Otamendi, Fernando Cairo, Andres Ruf, Maria de Davila, Paula Schaiquevich, Yanina Powazniak, Julieta Nafissi, Alberto Lazarowski, Guillermo Bramuglia, and Federico Villamil. Effect of the CYP3A5 genotype of recipients and donors on Tacrolimus Pharmacokinetics in Liver Transplant Recipients in Argentinean patients. 13<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology. Salt Lake City, USA, Sept 22-26,2013

Buendia JA, Bramuglia G, Staatz CE . Effect of the CYP3A5 6986A>G polymorphism on Tacrolimus pharmacokinetics in liver transplant recipients: A Metanalysis. 13<sup>th</sup> International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology. Salt Lake City, USA, Sept 22-26,2013

Jefferson Buendia, Natalia Riva, Esteban Halac, Andrea Bosaleh, Paula Schaiquevich, María de Davila, Guillermo Bramuglia, Oscar Inventarza. Effect of the CYP3A5 6986A>G polymorphism on Tacrolimus pharmacokinetics in pediatrics liver transplant recipients. Liver Transplantation 2014. ( actualmente en revision)

**Abreviaturas.**

TAC: Tacrolimus

TAC XL: Tacrolimus de liberación lenta

Co: Concentración de valle

Co/dosis: Concentración ajustada por dosis

MTM: Monitoreo terapéutico de medicamentos.

**Firma del Director de Tesis:**

**Firma del doctorando:**

## Contenido

<b>Antecedentes del tema .....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>10</b>
<b>Generalidades del Tacrolimus .....</b>	<b>11</b>
<b>Vías de administración .....</b>	<b>13</b>
<b>Farmacocinética: absorción, metabolismo, distribución y eliminación .....</b>	<b>14</b>
<b>Factores que afectan la farmacocinética del Tacrolimus .....</b>	<b>17</b>
<b>Complejo enzimático CYP3A5 .....</b>	<b>20</b>
<b>Polimorfismos genéticos del CYP3A5 y PGP .....</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo General.....</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos específicos: .....</b>	<b>27</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>Evaluación, mediante técnicas de metaanalíticas, de la evidencia publicada respecto al efecto combinacional del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos.....</b>	<b>28</b>
<b>Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A, polimorfismos en el exón 21 (2677G T,A) y 26 (C3435T) del gen MDR1 de donantes y/o receptores y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.....</b>	<b>31</b>
<b>Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos.....</b>	<b>36</b>
<b>Resultados. ....</b>	<b>41</b>
<b>Evaluación, mediante técnicas de metaanalíticas, de la evidencia publicada respecto al efecto combinacional del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos.....</b>	<b>41</b>
<b>Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A, polimorfismos en el exón 21 (2677G T,A) y 26</b>	

<b>(C3435T) del gen MDR1 de donantes y/o receptores y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.....</b>	<b>50</b>
<b>Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G&gt;A y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos.....</b>	<b>57</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>73</b>

## Resumen

**Introducción:** El balance entre el efecto inmunosupresor y el riesgo de eventos adversos en la terapia inmunosupresora es el principal reto en el manejo del trasplante de órganos. La individualización terapéutica ofrece una oportunidad de ajustar los esquemas de dosificación a características genéticas y clínicas particulares maximizando los beneficios de la terapia inmunosupresora de medicamentos como el Tacrolimus. Existe escasa evidencia de modelos farmacocinéticos-farmacogenéticos que evalúen el efecto combinatorio y a largo plazo en población latina, que permitan optimizar la terapia inmunosupresora con Tacrolimus. El objetivo de este trabajo fue caracterizar distintas variables genéticas y clínicas asociadas a la variabilidad farmacocinética/farmacodinámica del Tacrolimus que permitan optimizar e individualizar la terapia inmunosupresora en pacientes postrasplante hepático en población argentina.

**Métodos:** En primera instancia, se evaluó mediante técnicas metaanalíticas la evidencia publicada respecto al efecto combinacional del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos. Posteriormente se estudió la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A, exón 21 (2677G TA) y 26 (C3435T) del gen MDR1 y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de 24 pacientes adultos trasplantados hepáticos estables . Luego se evaluó la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre de 77 pacientes pediátricos trasplantados hepáticos durante un periodo de 2 años.

**Resultados:** Se encontró una frecuencia de expresores (CYP3A5\*1) entre el 17% (receptores adultos) al 37% (receptores pediátricos). El genotipo CYP3A5 del **receptor** juega un papel más importante que el genotipo del **donante** en etapas tempranas tanto en población adulta como en pediátrica , mientras la importancia genotipo del **donante** en la cinética del TAC se incrementa con el tiempo postrasplante. Existe poca influencia de los polimorfismos en los alelos del ABCB1



1236C<T y 2677G>T en las concentraciones, dosis y Co/dosis de TAC y TAC-XL. La presencia de CYP3A5 reduce las Co/dosis, siendo este efecto es diferencial con el tiempo, y segun distintas variables (edad , co-medicación con Fluconazol y días postrasplante) influyen en la manera en que dicha expresión modifica las concentraciones ajustadas por dosis en el tiempo.

Conclusión: En pacientes luego del trasplante hepático, tanto polimorfismos del CYP3A5 del donante como del receptor son asociados con cambios en la farmacocinética del TAC. Sin embargo, el papel que juega cada polimorfismo es distinto según avanzan los días luego del trasplante y deben ser tenidos en cuenta con el fin de optimizar los beneficios del TAC durante la fase de inducción y mantenimiento postrasplante.

## **Antecedentes del tema**

### **Introducción**

El trasplante hepático se ha convertido en una alternativa terapéutica cada vez más exitosa en pacientes con enfermedad hepática terminal. Este éxito en gran medida se debe al uso de adecuados regímenes de inmunosupresión. Una apropiada terapia inmunosupresora puede reducir el rechazo, evitar reacciones adversas y mejorar los resultados luego del trasplante de órganos (Undre 1999) . El Tacrolimus (TAC) es un inhibidor de la calcineurina ampliamente utilizado , que actúa interrumpiendo la señalización en linfocitos T (Olivera-Martinez 2005). Sin embargo , dado su estrecho margen terapéutico (5 a 15 ng/mL) y gran variabilidad intra e interindividual (Undre 1999), su dosificación es un reto en la práctica clínica haciendo necesario el monitoreo terapéutico de sus concentraciones para optimizar el balance entre eficacia y seguridad (Wallemacq, Armstrong et al. 2009). A pesar del este monitoreo, la incidencia de rechazo y reacciones adversas continua siendo un problema luego del trasplante (Statz CE 2004). Existe un interés creciente en desarrollar marcadores que permitan individualizar el tratamiento del TAC durante en el seguimiento post-trasplante; lo cual ha permitido volcar la atención en el estudio de marcadores farmacogenéticos relacionados con el metabolismo de los distintos inmunosupresores (Wang, McLeod et al. 2011).

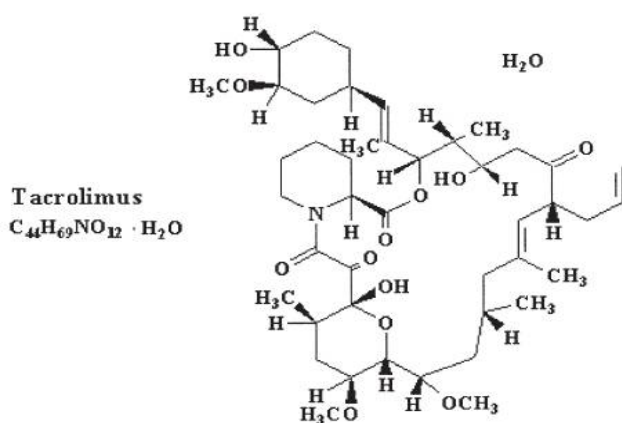
Dentro de estos potenciales marcadores genéticos , se destaca la presencia de polimorfismos de nucleótidos simples o SNPs en enzimas que participan en el metabolismo del TAC , y los cuales se han relacionados con la variabilidad farmacocinética del TAC (Hesselink DA 2003;, Statz CE 2004) . El TAC es principalmente metabolizado por la glicoproteína intestinal P y el complejo enzimático del CYP3A5; este último es miembro de la subfamilia del citocromo CYP3A. Se ha demostrado que un polimorfismo de nucleótido simple en el intron 3 del gen del CYP3A5 (rs776746), en el cual ocurre un cambio de una base de Adenina por una de Guanina (A6989G), es un marcador asociado a la variabilidad

farmacocinética del TAC. Los portadores del genotipo GG producen una enzima CYP3A5 truncada, no funcional debido a un defecto en empalme o *splicing* durante su síntesis (Hesselink DA 2003;, Goto M 2004). Aquellos portadores AG o AA (CYP3A5\*3) expresan grandes cantidades de CYP3A5. Adicionalmente, dado que en pacientes trasplantados hepáticos, conviven dos grupos o *sets* de genotipos, uno proveniente del donante y otro del receptor (Haufrond V 2004, Thervet E 2008) ; tanto polimorfismos del donante como del receptor, y su efecto combinacional, deben ser considerados en el momento de explicar la variabilidad farmacocinética del TAC.

### **Generalidades del Tacrolimus**

El Tacrolimus es un inhibidor de la calcineurina desarrollado en los años ochenta, producido por el hongo *Streptomyces tsukubaensis* , con una acción inmunosupresora entre 10 a 100 veces más potente que la Ciclosporina ; el primer inhibidor de la calcineurina aprobado en 1983 por la *Food and Drug Administration* (FDA) (Olivera-Martinez 2005). En 1987 se publicaron los primeros resultados de ensayos in-vitro y en modelos animales con este medicamento, pero fue hasta Abril de 1994 cuando la FDA lo aprobó inicialmente para la prevención del rechazo en trasplante hepático. Años después fue aprobado también para prevenir el rechazo post-trasplante en receptores de corazón, intestino delgado, páncreas, medula ósea, pulmón, hígado y riñón (Kapturczak M.H 2004). Su mayor potencia inmunosupresora y menor riesgo de toxicidad relativa le ha permitido constituirse en uno de los inmunosupresores más utilizados en la práctica clínica tanto en esquemas de inducción como de mantenimiento(Varela G 2005).

Se trata de un antibiótico macrolido tipo lactona con formula molecular  $C_{44}H_{69}NO_{12} \cdot H_2O$ , ver **figura 1**, peso molecular de 804mmol, y apariencia cristalina blanca. Es insoluble al agua, altamente soluble en hidrocarburos saturados, y altamente soluble en lípidos y otros solventes orgánicos(Kapturczak M.H 2004). El mecanismo de acción se basa en la supresión de la respuesta inmune mediada por la Calceneurina. Los inhibidores de la calcineurina como el TAC suprimen la respuesta inmune previniendo la producción de IL-2 en los linfocitos T. El TAC se une intracelularmente a la FKBP-12, inhibiendo la acción fosfatasa de la calcineurina, la cual es requerida para el movimiento de factores nucleares en linfocitos T activados durante la síntesis de citoquinas inflamatorias. La reducción en la secreción de IL-2 previene la proliferación de la respuesta inflamatoria vía linfocitos T y B. El TAC interfiere no solo en las vías calcineurina /NFAT sino también bloquea las terminales Jun N kinasa y la vía de señalización mediada por la proteína p38. La interferencia de estos dos mecanismos de las células T activadas contribuye a una inmunosupresión altamente específica. Esta atenuación en la respuesta inflamatoria reduce la respuesta global del sistema inmune frente al injerto



**Figura 1.** Estructura química del Tacrolimus.

## Vías de administración

El TAC está disponible tanto en formulación intravenosa (5mg/mL) como en capsulas (0.5, 1 y 5 mg). La gran variabilidad farmacocinética del Tacrolimus dificulta predecir que concentración será alcanzada con determinada dosis o cambio en la dosificación; haciendo que los rango terapéuticos no sean basados en aproximaciones estadísticas si no en observaciones empíricas en pequeñas poblaciones de pacientes (Venkataramanan R 1995). Un resumen de las dosis recomendadas en cada vía de administración se puede ver en la **tabla 1** y concentraciones en sangre total deseadas en la **tabla 2**.

Órgano	Vía oral	Infusión Intravenosa
Corazón	0.05-0.15 mg/kg/día dividida en dos dosis cada 12 horas.	
Corazón – pulmón	0.1 mg/kg/día dividida en dos dosis cada 12 horas	0.01- 0.02 mg/kg/día
Riñón	0.15-0.3 mg/kg/día dividida en dos dosis cada 12 horas	0.025- 0.1 mg/kg/día
Hígado	0.1-0.2 mg/kg/día dividida en dos dosis cada 12 horas Pobre función del injerto: 0.05-0.075 mg/kg/día Pobre función renal : suspender hasta gasto urinario >60 mL/h o reducción de creatinina Paciente en coma con encefalopatía III –IV : suspender hasta que recupere conciencia	0.01- 0.05 mg/kg/día
Pulmón	0.1-0.15 mg/kg/día dividida en dos dosis cada 12 horas	0.01- 0.05 mg/kg/día
Páncreas/ Riñón	0.05-0.2 mg/kg/día	1 mg en 24 hrs ; pasar a vía oral el segundo día

**Tabla 1.** Recomendaciones de dosificación de Tacrolimus para diferentes tipos de trasplante: dosis típicas de inicio (Staatz CE 2004)

Órgano	Periodo	Adulto (ug/L)	Pediátrico (ug/L)
Riñón	0-1 mes	15-20	15-25
	1- 3 mes	10-15	10-15
	más de 3 meses	5-12	<5-9
Hígado	0-1 mes	10-20	10-15
	1- 3 mes	5-15	8-12
	mas de 3 meses	5-10	5-10

**Tabla 2.** Rangos de concentraciones valle de Tacrolimus recomendadas durante la inmunosupresión según periodo y edad del paciente(Staatz CE 2004)

### **Farmacocinética: absorción, metabolismo, distribución y eliminación**

La **absorción** del TAC es rápida por vía oral , presentando variabilidad en la tasa de absorción y biodisponibilidad absoluta en formulaciones orales (Kapturczak M.H 2004). Una dosis oral de 0.15 mg/kg cada 12 horas logra un tiempo medio al pico de concentración (Tmax) de 1,5 horas (Staatz CE 2004). La pobre solubilidad en agua y alteración en la motilidad intestinal puede ser parcialmente responsable de la absorción errática en algunos pacientes. La biodisponibilidad es pobre (aproximadamente de 25%) con un rango entre 5 a 93%(Staatz CE 2004). La reducida biodisponibilidad ha sido reportada en población afroamericana, caucásica y no caucásica (Fitzsimmons WE 1998, Mancinelli LM 2001), pacientes diabéticos(van Duijnhoven E 1998) y luego de la administración de alimentos con moderado contenido de grasas(Bekersky I 2001). El grado de variabilidad inter-paciente hace que se requiera de un ajuste individualizado del régimen de dosificación para alcanzar la exposición sistémica deseada. La eficacia del TAC para prevenir el rechazo del injerto ha sido extensamente validada en distintos modelos de trasplante experimental y humano (Johnson C 2000, Vincenti F 2002;, Florman S 2005).

La forma farmacéutica de TAC para una sola toma diaria (TAC XL) es una nueva formulación oral para evitar administrar dos veces al día con resultados clínicos similares (First MR 2008). Estudios recientes han mostrado que las formulaciones de liberación prolongada de TAC tienen un perfil similar de seguridad a la formulación de liberación inmediata (Webster AC 2005). En un estudio abierto y multicéntrico 69 pacientes adultos trasplantados hepáticos en fase de mantenimiento fueron convertidos de Prograf dos veces por día a Prograf-XL una vez al día. La incidencia de rechazo agudo a los dos años fue del 5.8% y la supervivencia del órgano 98.6% (Heffron TG 2007). Otro estudio, en 70 trasplantados hepáticos en fase de mantenimiento - convertidos de Prograf a Prograf-XL en una relación de dosis mg:mg - el AUC<sub>0-24</sub> y C<sub>min</sub> no difirieron significativamente entre ambos grupos. La formulación de liberación prolongada fue bien tolerada, con un perfil de seguridad comparable al del TAC de liberación rápida (First MR 2008).

Existe un extenso metabolismo intestinal, pre-sistémico del TAC por parte del citocromo P450 (CYP) y de la glicoproteína transportadora P (Lampen A 1995). La CYP3A en el intestino delgado sirve como sitio de metabolismo de primer paso en el intestino delgado; enzima la cual tiene una concentración del 10-50% menor respecto a la encontrada en el hígado del mismo individuo (de Waziers I 1990). La glicoproteína P reduce la concentración intracelular de TAC bombeando la droga hacia el lumen intestinal. Regula el acceso del medicamento al CYP3A previniendo la saturación a altas concentraciones de Tacrolimus en el intestino (de Waziers I 1990). Dado que el TAC es repetidamente transportado fuera de la mucosa intestinal y pasivamente reabsorbido, la exposición continua lleva a un metabolismo más eficiente (Benet LZ 1999). La glicoproteína P, la cual pertenece a la Multifamilia ABC (adenosine triphosphate-binding cassette), presenta una significativa variabilidad interindividual; con variaciones entre 2 a 8 veces en la concentración interindividual en biopsias intestinales entre pacientes post-trasplante renal y voluntarios sanos (Lown KS 1997). La bilis no es esencial para la absorción del Tacrolimus, así como la administración simultánea de alimentación enteral no parece interferir con la biodisponibilidad de TAC (Murray M 1998).

Respecto a su **distribución**, el TAC, se une fuertemente a eritrocitos en la circulación sistémica, resultando en concentraciones sanguíneas significativamente más altas (promedio 15 veces) que las plasmáticas(Staatz CE 2004) debido a la captación –concentración/dependiente de Tacrolimus por parte del eritrocito. En el estado estacionario, el volumen de distribución en plasma total es mayor de 1,000 L y en sangre total de aproximadamente 50 L (Martin SR 2004). Esto indica que en estado estacionario la mayor cantidad de la droga reside fuera del compartimento sanguíneo. (Undre 1999). En el plasma, la droga está altamente unida a proteínas plasmáticas (más del 98%), principalmente a la albumina sérica, no saturable a concentraciones fisiológicas, y a la glicoproteína alfa-uno acida. La distribución del TAC eritrocito/plasma depende del hematocrito, concentración del medicamento, temperatura de la muestra y concentración plasmática de proteínas(Beysens AJ 1991). El TAC pasa a la placenta y a la leche materna. En pacientes pediátricos, el volumen de distribución es 1.8 veces mayor que en pacientes adultos posiblemente debido al incremento en la permeabilidad de la membrana del eritrocito y a la reducida afinidad a las proteínas plasmática favoreciendo que la droga entre en otros compartimentos(Wallemacq PE 2001).

El TAC sistémicamente disponible es depurado principalmente por **metabolismo** hepático; la eliminación renal da cuenta de solo del 2.4% del TAC eliminado. El citocromo P450 es la principal enzima responsable de su metabolismo. En el hombre, enzimas CYP3A son expresadas en el tracto gastrointestinal alto (Wilkinson 1996). Se han aislado más de 15 metabolitos en plasma, orina, bilis. Entre ellos solo el 13- O- demetiltacrolimus, tiene un décimo de la actividad farmacológica del Tacrolimus(Christians U 1992). Todos aquellos medicamentos o compuestos que inhiben o inducen la isoenzima CYP3A pueden incrementar o reducir los niveles de tacrolimus en sangre respectivamente. Ejemplos de fuertes inhibidores incluyen el ketoconazol, itraconazol y fluconazol(Kapturczak M.H 2004).



La administración oral concomitante de estos medicamentos hace necesario una reducción del 50% en su dosis oral para mantener los niveles terapéuticos de tacrolimus en sangre (Undre 1999). Mientras que administración de fuertes inductores tales como rifampicina y fenitoina requieren doblar la dosis de tacrolimus para mantener los niveles en sangre. El TAC es por sí mismo, un inhibidor de las enzimas CYP3A, y clínicamente se ha demostrado que incrementa los niveles en sangre de fenitoina y ciclosporina. También potencialmente puede inhibir el metabolismo de corticoesteroides por este mecanismo. (Kapturczak M.H 2004).

Cuando el TAC es administrado en combinación con el mofetil micofenolato, las concentraciones plasmáticas de ácido micofenólico son aproximadamente dos veces mayores que las observadas cuando este mismo medicamento es administrado con ciclosporina (Undre 2003). Entonces bajas dosis de mofetil micofenolato son requeridas cuando es co-administrado con tacrolimus. El área bajo la curva del ácido micofenólico (metabolito activo del mofetil micofenolato) en combinación con TAC también se incrementa en aproximadamente un 20 al 30% durante los primeros meses post-trasplante (Kapturczak M.H 2004). Estos datos sugieren que la dosis del micofenolato necesita ser reducida con el tiempo post-trasplante para mantener la misma exposición sistémica al mofetil micofenolato.

### **Factores que afectan la farmacocinética del Tacrolimus**

**Tipo de población estudiada** : pacientes adultos luego de trasplante renal han mostrado mayor depuración comparados con aquellos receptores hepáticos o voluntarios sanos especialmente por valores de hematocrito y albumina más bajos así como diferencias en la corticoterapia (Statz CE 2004). Así mismo se observa en pacientes diabéticos una reducción del 38% en el Área bajo la curva explicada por alteraciones en la motilidad gastrointestinal que pueden tener esta población. Los pacientes con **fibrosis quística** receptores de corazón o pulmón requieren un 39% más dosis de Tacrolimus dada la posible insuficiencia pancreática que reduce la absorción del Tacrolimus. (Statz CE 2004)

**Insuficiencia hepática:** la pobre función hepática reduce la depuración del Tacrolimus incrementando hasta 3 veces la vida media (Jain AB 1993). Se ha encontrado poca correlación entre el nivel de bilirrubinas séricas y las concentraciones plasmáticas en adultos receptores de hígado en el postquirúrgico inmediato considerándose. La depuración de Tacrolimus ha sido reportada similar en pacientes con insuficiencia hepática moderada y voluntarios sanos(Bekersky I 2001)

**Hepatitis C:** pacientes con Hepatitis C requieren significativamente menor cantidad de dosis de Tacrolimus que pacientes seronegativos para este virus (van den Berg AP 2001). Se ha propuesto que la replicación del virus en los hepatocitos altera el sistema CYP resultando en una reducción del metabolismo del Tacrolimus.(Statz CE 2004)

**Función renal :** No existe al parecer una relación entre concentraciones de creatinina y depuración del Tacrolimus (  $r=0.36$ ) (Gruber SA 1994) ; incluso en pacientes con difusión renal severa previa al trasplante tienen depuración de tacrolimus similar a voluntarios sanos.

**Tiempo después del trasplante:** A medida que se incrementa el tiempo post-trasplante existe una disminución del 50% a dos años en los requerimientos de Tacrolimus (Christiaans M 1998). Se ha postulado que esto puede obedecer a reducción de las dosis concomitantes de corticoides, incremento del hematocrito y de la albumina plasmática (Undre NA 1998). Sin embargo en niños esta reducción no es tan clara existiendo evidencia que ha encontrado tanto reducciones en la dosis como mantenimiento de las mismas a 3 años(Statz CE 2001)

**Características del donante hepático :** Se ha documentado que la edad del donante ( entre más edad menor requerimiento de Tacrolimus en el receptor) (Staatz CE 2004), peso del hígado trasplantado ( receptores de hígados parciales requieren menores dosis que receptores de hígado total)(Taber DJ 2002), razón peso del injerto/ volumen hepático estándar , actividad metabólica in vitro del hígado del donador ( a mayor actividad in vitro mayor depuración del Tacrolimus en el receptor) (Nakazawa Y 1998)

**Sexo :** No existen al parecer diferencias farmacocinéticas entre hombres y mujeres en ensayos clínicos fase II ya sea en voluntarios sanos, pre y post trasplante renal o receptores de medula osea.(Staatz CE 2004)

**Raza:** Afroamericanos requieren en general mayores dosis y tienen menor biodisponibilidad que pacientes Caucasicos para alcanzar similares concentraciones(Fitzsimmons WE 1998). Asi mismo se han encontrado diferencias entre Latinoamericanos, afroamericanos y caucasicos en parámetros farmacocinéticos (Fitzsimmons WE 1998)Estas diferencias pueden ser originadas por diferencias en la actividad de la CYP3A y Glicoproteína p (Staatz CE 2004)

**Hematocrito y albumina:** Existe una correlación entre el Depuración del Tacrolimus y el hematocrito (  $r=0.81$ ) y la albumina (  $r=0.74$ ) (Undre NA 1998). Esto es debido a la fuerte unión de este medicamento con los glóbulos rojos y la albumina sérica. El hematocrito y la alfa glicoproteína 1 tienen bajas concentraciones durante el post-quirúrgico del trasplante renal y dado que el Tacrolimus se mide en sangre total ; en estos pacientes se observan bajas concentraciones aparentemente incrementándose la depuración(Huang ML 1988)

**Variaciones diurnas:** se ha reportado incrementos en el área bajo la curva después de una dosis diurna respecto a la nocturna, con reducciones de  $T_{max}$  e incrementos en el  $C_{max}$  (Sato S 2001). Así mismo en pacientes receptores de riñón el Depuración diurna fue mayor que el nocturno (Sato S 2001). Posiblemente diferencias en el tiempo de vaciamiento gástrico sea la razón de diferencias diurnas y nocturnas en la absorción del Tacrolimus.(Staatz CE 2004)

**Interacción con la comida :** el efecto con la comida es dependiente del contenido de grasas y el tiempo de su administración; mientras dieta con alto y moderado contenido en grasa puede reducir la biodisponibilidad en un 27% (Mekki Q 1993) pero sin influencia en la vida media (Bekersky I 2001) Así mismo se observa una reducción en el área bajo la curva con la administración del Tacrolimus 1 hora antes respecto a 1 hora después de la comida (Bekersky I 2001)

**Dosis de Corticoides:** Los corticoides pueden inducir las isoenzimas CYP3A. Estudios en receptores de trasplante renal se revela una correlación significativa ( $r=0.94$ ) hasta los 12 meses post-trasplante entre la dosis media oral de corticoides y el Depuración, de esta manera incrementando el metabolismo del Tacrolimus(Undre NA 1998)

### **Complejo enzimático CYP3A5**

El TAC es sujeto al metabolismo y depuración hepática por parte enzimas del complejo del citocromo P-450 como el CYP3. La subfamilia del complejo enzimático CYP3A tiene 4 isoformas en humanos: CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7 y CYP3A43 (Gellner KR 2001). Esta subfamilia participa en el metabolismo de una gran cantidad de compuestos endógenos, toxinas y medicamentos incluyendo el TAC. Se encuentran altas concentraciones de esta enzima en el hígado e intestino reduciendo así la biodisponibilidad del TAC. Diferencias en la expresión del CYP3A5, PGP y CYP3A4 causan variabilidad en la absorción, metabolismo y distribución del TAC.

Esta expresión diferencial puede ser resultado de mutaciones en genes que codifican dichas enzimas y transportadores de medicamentos, las cuales pueden llevar a diferentes concentraciones de medicamentos dentro del sistema circulatorio, sitio de acción; influenciando la eficacia y susceptibilidad individual a interacciones o efectos adversos (Thervet, Anglicheau et al. 2008). Se estima que estos factores genéticos pueden explicar entre el 20 al 95% de la variabilidad farmacocinética y farmacodinámica de este tipo de medicamentos (Evans and McLeod 2003).

En adultos, CYP3A4 se expresa con mayor frecuencia, aproximadamente 30-40% del total de contenido de hepático e intestinal de CYP. CYP3A4 es altamente variable entre individuos, con diferencias de 10 a 100 veces en el hígado y superior a 30 veces respecto a su expresión en intestino delgado (Statz CE 2004) CYP3A7 es la mayor isoforma detectada en embriones humanos e hígado neonatal mientras que en adultos es muy baja excepto en sub-poblaciones Japonesas(Lamba JK 2002). CYP3A5 es expresada en niveles más bajos que la CYP3A4 en el hígado. CYP3A5 es encontrada en hígado, intestino y riñón en los expresores. La expresión de CYP3A5 es polimórfica con individuos con alta y baja expresión (Lamba JK 2002). Algunos individuos expresan altos niveles de proteína funcional CYP3A5 (llamados expresores en este documento). La glucoproteína P es una proteína de membrana, producto del gen MDR-1, que actúa como bomba expulsora de diversos fármacos localizada en la membrana externa de varios tipos de células como la superficie canalicular de los hepatocitos, membrana apical de los túbulos proximales y distales, epitelio columnar de enterocitos, superficie luminal de endotelio capilar de células cerebrales y superficie de linfocitos. Esta variedad de localizaciones anatómicas protegen al cuerpo contra la acción tóxica de xenobioticos mediante la excreción activa de los mismos fuera de las células hacia el lumen intestinal, urinario, biliar; previniendo de esta manera que alcancen el torrente sanguíneo.

Las enzimas CYP3A5 y PGP forman una barrera cooperativa contra la absorción de inhibidores de calcineurina en el intestino delgado (Cummins, Jacobsen et al. 2002, Christians, Strom et al. 2006). El TAC es repetidamente bombeado al exterior del enterocito por PGP. La exposición repetida del TAC al CYPA dentro de la célula incrementa la probabilidad que este medicamento a su vez sea metabolizado(Christians and Sewing 1995) . La PGP mantiene las concentraciones intracelulares dentro de un rango que le permiten metabolizar al CYP3A 19 y puede facilitar o limitar el acceso del TAC a los órganos y compartimentos la barrera hematoencefalica, testículos, placenta, hígado y riñones(Fromm 2003) .

Los metabolitos del TAC también son potenciales sustratos del PGP llevándolos al lumen intestinal. Una vez entra el TAC al torrente sanguíneo es metabolizado extensamente por las enzimas CYP3A4 y A5 del hígado y riñon. Todos sus metabolitos identificados son considerablemente menos activos los cuales son eliminados principalmente por vía biliar. La CYP3A4 juega un papel más importante en el metabolismo, mientras que la CYP3A5 lo es en el TAC. La depuración intrínseca de TAC es aproximadamente dos veces mayor para CYP3A5 que para CYP3A4 (Dai, Hebert et al. 2006). Cuatro metabolitos primarios, M1,M2,M3 y M6 son producidos durante la biotransformación del TAC. Las tasas de formación de M1, M2,M3,M6 son en promedio 1.7 más altas en microsomas hepáticos de individuos CYP3A5 expresores respecto a los no expresores

En edad pediátrica es aún más necesario el entendimiento de la farmacocinética de los inmunosupresores debido a las alteraciones relacionadas con la edad que los lleva a mayores niveles de exposición. Las variaciones entre e intraindividual en los requerimientos de dosis son mayores en niños que en adultos, como resultado de variaciones en la maduración biológica. En general los niños menores de 5 años presentan mayores tasas de depuración de TAC (Staatz CE 2004) .

Cambios en parámetros fisiológicos como el pH gástrico, vaciamiento gástrico, tiempo de tránsito intestinal, proporción de grasa corporal y niveles de proteínas plasmáticas pueden impactar en la biodisponibilidad del medicamento (Staatz CE 2004). La actividad por ejemplo del CYP3A4 en niños entre 1 a 10 años es mayor que la de los adultos y es extremadamente débil desde el nacimiento hasta alcanzar un 30-40% de la actividad del adulto después del primer mes. Los pacientes pediátricos requieren 2 a 4 veces mayores dosis que adultos para mantener similares concentraciones. Esto ha sido atribuido a diferencias en CYP3A, longitud del intestino, flujo sanguíneo hepático y expresión de glicoproteína P (Mittal N 2001). Así mismo existen diferencias en la expresión de CYP3A4 y 3A5. La CYP3A4 del hepatocito es baja en feto, pero incrementa rápidamente al nacimiento hasta un 120% después del primer año.

### **Polimorfismos genéticos del CYP3A5 y PGP**

Los inhibidores de la calcineurina son inmunosupresores altamente eficaces para el trasplante de órganos sólidos, pero debido a su rango terapéutico estrecho y alta variabilidad cinética como se expuso anteriormente generan desafíos para el mantenimiento de dichos niveles durante las fases de inducción y mantenimiento postrasplante. Esta variabilidad cinética aun es poco entendida (Utecht, Hiles et al. 2006). La farmacogenética examina la relación entre polimorfismos de nucleótidos simples y los efectos tanto en la cinética como en la farmacodinámica de los medicamentos; permitiendo la racionalización e individualización terapéutica.

Un polimorfismo de nucleótido simple (PNS) es una variación en la secuencia de DNA de un solo nucleótido (adenina [A], timina [T], citosina [C], guanina [G]), el cual ocurre con una frecuencia mayor del 1% dentro de la población general. Un PNS puede ocurrir dentro de una secuencia de genes codificantes, dentro de regiones no codificantes o entre regiones inter-genicas entre genes.

Los polimorfismos genéticos en enzimas metabolizadoras de medicamentos y bombas de flujo de los mismos al exterior, son sitios potenciales para el desarrollo de estrategias farmacogenéticas en la individualización de la inmunosupresión permitiendo identificar la combinación óptima para un paciente, predecir la dosis de inicio y mantenimiento, y ayudar a identificar pacientes con a riesgo de problemas de efectividad terapéutica o efectos adversos.

CYP3A5 es polimórficamente expresada, con al menos 11 PNS (Staatz CE 2004). El más estudiado involucra la transición de Adenina a Guanina en la posición 6986 dentro del intron 3 del gen del CYP3A5 (rs 776746). Este PNS (CYP3A5 6986A>G) denominado, también como CYP3A5\*1, se asocia con altos niveles de mRNA-CYP3A5 completo, proteína CYP3A5 funcional. mayores tasas de depuración, dosis y baja biodisponibilidad de TAC (Kuehl P 2001, Lamba JK 2002). El PNS CYP3A5\*1 es expresado entre un 10-40% en población caucásica, 33% japoneses y 55% afroamericanos. Una revisión sistemática de 5 estudios evaluó la asociación entre el CYP3A5\*3 y las dosis de TAC en pacientes trasplantados hepáticos (Rojas, Herrero et al. 2013). En este estudio se evidencio que los portadores de CYP3A5\*1 requieren 0.024 mg/kg más dosis diarias de TAC frente aquellos no portadores (CYP3A5\*3). Adicionalmente, en el análisis de subgrupos se evidencio que estas diferencias en los requerimientos eran crecientes según el tiempo desde el trasplante hepático (desde 0.019 mg/kg a la segunda semana hasta 0.030 mg/kg a los 12 meses). En este mismo estudio se evaluó el impacto que tienen dicho polimorfismo en el riesgo de rechazo, encontrando que los portadores frecuentemente fallan en alcanzar concentraciones de TAC deseadas con tres veces más riesgo de rechazo agudo dentro del primer mes que los no portadores del polimorfismo (OR, 3.27; 95% IC 1.57–6.81; P=0.002).



También se evidenciaron diferencias según la raza, encontrando que portadores asiáticos requieren mayores dosis que portadores caucásicos, fenómeno (diferencia de medias estandarizadas de mg/kg/día de TAC entre portadores y no portadores Japoneses 0.074 vs chinos 0.037 vs caucásicos 0.023 . $p < 0.001$ ) explicado por la mayor proporción de CYP3A5\*3 en población asiática que en población caucásica. Así mismo se presenta una mayor contribución del genotipo del donante (CYP3A5 hepática) que del receptor (CYP3A5 intestinal) en las diferencias de requerimientos de TAC (diferencia de medias estandarizadas de mg/kg/día de TAC entre portadores y no portadores de 0.024 según genotipo del donante vs. 0.012 según genotipo del receptor,  $p < 0.001$ ).

La principal bomba que transporta el TAC del interior del enterocito hacia el exterior es la glicoproteína-P (PGP), la cual es codificada por el gen ABCB1. La PGP es codificada por el gen de multiresistencia a drogas conocido como ABCB1. El ABCB1 es polimórfico, con al menos 50 PNS identificados. Ningún PNS lleva a la pérdida total de la expresión o función de la PGP. Los más estudiados incluyen la transición de citosina a timina en la posición 3435 dentro del exón 26 (rs1045642), transición de citosina a timina en la posición 1236 dentro del exón 12 (rs1128503) y transición de guanina a timina o adenina en la posición 2677 dentro del exón 21 (rs2032582) (Kroetz, Pauli-Magnus et al. 2003). En este documento nos vamos a referir a estos PNS como ABCB1 3435C>T, 1236C>T y 2677G>T, respectivamente, como variantes *wild-type* como ABCB1 3435C, 1236C y 2677G respectivamente y a la variante alélica como ABCB1 3435T, 1236T y 2677T/A, respectivamente. La presencia de las variantes alélicas del ABCB1 1236T-2677T-3435T se encuentra en aproximadamente el 32% de caucásicos, 5% de afroamericanos, 27% de asiáticoamericanos y 35% de mexico-americanos. Dichas variantes alélicas reducen la actividad de la PGP hasta un 28% comparado con ABCB1 *wild-type* (Staatz CE 2004).

Sin embargo la significancia funcional de dichos PNS es aun controversial. ABCB1 3435TT se ha asociado con reducción en la actividad de la PGP in vitro (Hoffmeyer, Burk et al. 2000, Tanabe, Ieiri et al. 2001). Esto debería reflejarse en un transporte ineficiente del TAC fuera de las células, llevando a un incremento en la absorción intestinal con mayores concentraciones sistémicas.

**Objetivo General**

Caracterizar distintas variables genéticas y clínicas asociadas a la variabilidad farmacocinética/farmacodinámica del Tacrolimus.

**Objetivos específicos:**

Evaluar, mediante técnicas de meta-análisis, la evidencia publicada respecto al efecto combinacional del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos.

Estudiar la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.

Estudiar la correlación entre polimorfismos en el exón 21 (2677G TA) y 26 (C3435T) del gen MDR1 de donantes y/o receptores y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.

Estudiar la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos.

Determinar la asociación entre características clínicas y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos.

## **Materiales y métodos**

### **Evaluación, mediante técnicas de metaanalíticas, de la evidencia publicada respecto al efecto combinatorio del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos**

#### *Estrategia de búsqueda y selección de estudios:*

Se realizó una búsqueda estructurada de estudios que evaluaran la asociación entre el genotipo CYP3A5 6986A>G y parámetros farmacocinéticos del tacrolimus en pacientes trasplantados. Las búsquedas fueron realizadas en EMBASE (desde 1974 a Noviembre 2012) y Medline (desde 1966 a Noviembre del 2012). Búsquedas adicionales fueron llevadas a cabo cruzando referencias de cada uno de los artículos identificados y revisiones publicadas. Se utilizaron los siguientes términos de búsqueda adaptados para cada base de datos: “tacrolimus” or “FK506” and “CYP3A5”. Fueron incluidas en el meta análisis las publicaciones que cumplieran todos los siguientes criterios de elegibilidad: 1. Estudios de cohorte o con diseño trasversal conducidos en pacientes adultos trasplantados hepáticos, 2. Estudios donde en todos los pacientes se realizara y correlacionara con la farmacocinética del TAC el genotipo CYP3A5 6986A>G, 3. Estudios que presentaran la media, desvío estándar de dosis diaria de TAC, Co, Co/Dosis por separado según el genotipo CYP3A5 6986A>G para al menos 1 de los siguientes grupos genotípicos CYP3A5\*1/\*1 and/o \*1/\*3. Todos los estudios identificados en la literatura fueron evaluados separada, enmascarada e independientemente por dos revisores (Jefferson Antonio Buendía y Christine E. Staats) para determinar el cumplimiento de los criterios de inclusión.

#### *Extracción de la información:*

La información relevante de los artículos incluidos fue extraída por dos revisores (Jefferson Antonio Buendía y Christine E. Staats) de forma independiente y enmascarada; siendo las discrepancias entre la información extraída consensuadas por un tercer revisor (Guillermo Bramuglia). Las siguientes variables fueron recolectadas en cada estudio: datos demográficos (edad, sexo, raza), genotipo del CYP3A5 6986A>G para el donante y receptor, dosis diaria de TAC, Co, Co/Dosis. En caso de información faltante se contactó a cada autor para mayor detalle. La consistencia en el reporte de cada estudio dentro del meta-análisis fue valorada pareada e independientemente utilizando la lista de chequeo STROBE(von Elm, Altman et al. 2007).

#### *Análisis estadístico:*

El metaanálisis produce un estadístico general (junto con su intervalo de confianza) que resume el efecto de una intervención o exposición (ej: CYP3A5\*1) comparada con una intervención control (ej: CYP3A5\*3). El metaanálisis es típicamente un proceso de dos estadios. En el primer estadio se calcula un estadístico resumen para cada estudio para describir el efecto de la exposición observada. Por ejemplo, el estadístico resumen en nuestra revisión fue la diferencia de medias entre expuestos y no expuestos dado que nuestros datos a analizar son de naturaleza continua (ej: medias de concentraciones, dosis, Co/dosis). En el segundo estadio se calcula una estimación resumen (combinada) del efecto de cada exposición como un promedio ponderado de las estimaciones de los efectos de cada exposición en los estudios individuales.

Cada estudio es ponderado por un factor que refleja la cantidad de información que aporta al metaanálisis en función de su precisión esto es su tamaño de muestra (método del inverso de la varianza). La combinación de las estimaciones del efecto de cada exposición entre los estudios puede incorporar una hipótesis respecto a estas las diferencias.

Se puede asumir que la magnitud del efecto de los estudios individuales se debe tan solo al hecho que los estudios utilizan muestras de sujetos diferentes (modelo de efectos fijos); es decir este modelo asume que la única variabilidad entre los estudios individuales es debida a error de muestreo aleatorio cuantificada en forma de varianza intra-estudio.

El otro modelo, que fue el utilizado en nuestro trabajo, es el modelo de efectos aleatorios. Este contempla no solo la variabilidad debida al error de muestreo o intra-estudio, si no que incluye la variabilidad entre-estudios dado que asume que cada tamaño de efecto individual, estima un tamaño de efecto poblacional diferente a diferencia de modelo de efectos fijos que asume que los estudios incluidos estima un mismo y único tamaño de efecto poblacional (Higgins JPT 2011).

El error estándar del efecto resumen (combinado) de la exposición (CYP3A5) se puede utilizar para derivar un intervalo de confianza, el cual informa la precisión (o incertidumbre) de la estimación resumen, el cual informa la solidez de las pruebas contra la hipótesis nula de ningún efecto de la intervención.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATA 11.0©. Se calcularon diferencias de medias ponderadas con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, usando un modelo de efectos aleatorios según las recomendaciones de la Colaboración Cochrane (Higgins JPT 2011), entre las dosis diarias de TAC, Co y Co/dosis según las distintas combinaciones de expresión o no del alelo CYP3A5\*1 entre donantes y receptores, a distintos momentos de tiempo postquirúrgico. El test de  $I^2$  fue utilizado para evaluar el porcentaje de variación total entre los estudios debido a heterogeneidad. Los datos extraídos fueron además estratificados. En caso de heterogeneidad substancial ( $I^2 < 80$ ), se realizó meta-regresión para explorar las causas de heterogeneidad. Si no se identificaban predictores significativos ( $p < 0.05$ ), los resultados fueron expresados acorde al tiempo de seguimiento y raza.

**Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A, polimorfismos en el exón 21 (2677G T,A) y 26 (C3435T) del gen MDR1 de donantes y/o receptores y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.**

*Diseño del estudio:*

Estudio prospectivo, en un solo centro y abierto (open-label) en el cual se evaluó la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos estables después de la conversión miligramo a miligramo de una formulación de Tacrolimus administrada cada 12 horas (Prograf ; AstellasPharma, Gador, Argentina) a una formulación de liberación lenta administrada una vez al día (Prograf XL; AstellasPharma, Gador, Argentina)

Se realizó monitoreo de los niveles de TAC en sangre utilizando una estrategia de muestreo limitado (Balss, Avedisian et al.). Incluyendo muestras pre-dosis y a distintos tiempos post-dosis. Una fracción de las muestras de sangre obtenidas se utilizó para la determinación de las variantes alélicas en receptores de la isoforma CYP3A5 6986G>A y de los polimorfismos en el exón 21 (2677G T,A) y 26 (C3435T) del gen. El estudio de las variantes alélicas de los donantes se investigó en tejido de biopsias hepáticas postrasplante.

*Pacientes:*

Se incluyeron 24 pacientes mayores de 18 años con una dosis estable de TAC administrada por no menos de 6 meses después del trasplante hepático, en quienes se planeaba realizar por parte del médico tratante su conversión a la formulación de TAC-XL. A continuación se detallan los criterios de inclusión y exclusión:

*Criterios de inclusión:*

- ✓ Receptores de un trasplante hepático primario con donantes vivos a cadavéricos y con injerto completo o reducido
- ✓ Seguimiento post-trasplante mayor a 6 meses
- ✓ Función estable del injerto (AST, ALT  $\leq 3$  veces el valor de referencia, FAL  $\leq 5$  veces el valor de referencia, Bilirrubina  $< 3$  mg/dl)
- ✓ No complicaciones biliares u otras complicaciones quirúrgicas en los 6 meses previos al estudio
- ✓ No historia de rechazo en los 6 meses previos al estudio
- ✓ Inmunosupresión con TAC con o sin esteroides, con o sin micofenolato de mofetilo
- ✓ Deseo de participar del estudio y capacidad para firmar un consentimiento informado y para adherir al régimen de tratamiento

*Criterios de exclusión:*

- ✓ Receptores de un trasplante multiorgánico o de más de un injerto hepático
- ✓ Infección por HIV
- ✓ Ingesta de fármacos que puedan alterar el metabolismo o farmacocinética del TAC
- ✓ Diagnóstico de cáncer post-trasplante con excepción de carcinomas basocelulares de piel que fueron tratados
- ✓ Creatinina sérica  $>3$  mg/dL
- ✓ Mujeres embarazadas o amamantando. Las mujeres en edad fértil deben usar un método anticonceptivo
- ✓ Existencia de cualquier complicación médica o quirúrgica que a juicio del investigador puede interferir con los objetivos del estudio

*Dosificación y esquema de tratamiento:*



Todos los pacientes se encontraban en fase de mantenimiento medicados con TAC como inmunosupresor y recibieron un tratamiento inmunosupresor inicial basado en TAC, Mofetil-micofenolato y Esteroides. Recibieron 1500 mg/d de micofenolato/día y dividido en dos dosis diarias. El régimen de esteroides consistió en 1gr i.v de metilprednisolona al momento de la cirugía y 500 mg/d en los siguientes dos días. Este esquema fue seguido de 80mg/d de prednisona oral, progresivamente reducido a 10 mg/d a 20 mg/día hasta el 3 mes post-trasplante luego del cual se bajó a 5 mg/día o se suspendió según criterio clínico.

El ajuste del esquema de dosificación de TAC los pacientes se realizó buscando alcanzar una  $C_0$  entre 10 y 15 ng/mL en los 3 primeros meses, entre 8 y 12 ng/mL dentro del primer año, y luego subsecuentemente entre 5 y 7 ng/mL. Sin embargo, la dosis diaria de TAC era ajustada también acorde al estado clínico del paciente, especialmente en casos de toxicidad. Los pacientes con dosis estables de TAC fueron rotados a la formulación de TAC-XL con una conversión miligramo a miligramo.

#### *Monitoreo plasmático de tacrolimus:*

Siguiendo una técnica de muestreo limitado (Balss, Avedisian et al.) , se obtuvieron muestras de sangre previas a la dosis matutina ( $C_0$ ) y a las 2 horas ( $C_2$ ) de la dosis matinal de TAC. A las 4 semanas de la conversión se repitió el estudio obteniéndose muestras de sangre a los tiempos  $C_0$ ,  $C_2$ ,  $C_4$  y  $C_6$  luego de la ingesta de TAC-XL. En todos los casos se registró la hora de administración del TAC y la hora de la extracción de las muestras de sangre.

#### *Cuantificación de tacrolimus en sangre:*

La cuantificación de TAC se realizó mediante inmunoensayo (Dimension, SIEMENS) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los ensayos de calibración del equipo fueron establecidos usando calibradores a 0, 3, 6, 12, 20 and 30 ng/mL evaluados en duplicado.

El límite inferior de cuantificación fue de 1,2ng/mL. Un análisis de validación cruzada fue realizado utilizando metodología de HPLC/MS/MS ( $r=0.89$ )

#### *Evaluaciones basales:*

En todos los casos se obtuvo información demográfica (fecha de nacimiento, género), datos antropométricos (peso, talla), tiempo de seguimiento post-trasplante, medicación actual y posología, medicaciones concomitantes que recibían los pacientes en las 2 semanas previas al inicio del estudio y durante el estudio. Información del trasplante como tipo de donante, cantidad de órgano trasplantado, etiología o causa que motivo a realizar el trasplante en el receptor. También se registró laboratorio clínico incluyendo hematología (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, RIN) y química serológica (creatinina, nitrógeno ureico, bilirrubina total y directa, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (GPT-ALT), aspartato aminotransferasa (GOT-AST), gama glutamil transpeptidasa (GGT), albúmina)

#### *Aislamiento de ADN y genotipificación:*

Las genotipificaciones de CYP3A5 (CYP3A5\*1/\*3 o \*3/\*3) y MDR1 (exon 26, C3435T, exon 21 G2677T) fueron realizadas en biopsias de hígado del donante luego del trasplante hepático, y en muestras de sangre -a partir de leucocitos - en el caso de los receptores. El DNA del hígado del donante fue obtenido a partir de 10 cortes, con micrótopo, de un grosor de 10 embebidos en biopsias de hígado en parafina-formaledido almacenadas y conservadas desde el momento de la cirugía de cada paciente.

La extracción del ADN fue llevada a cabo utilizando los kits comerciales QIAamp DNA Blood y QIAamp DNA FFPE Tissue Kit siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso obteniendo entre 20 a 100 ng de DNA en cada caso. Los polimorfismos MDR1 C3435T (rs1045642) y G2677T (rs2032582) fueron detectados usando PCR-RFLP con enzimas de restricción MboI and RsaI respectivamente.

El polimorfismo CYP3A5\*3 (rs776746) fue detectado por PCR y directamente secuenciado. Pacientes portadores de las variantes (CYP3A5\*1/\*1 or CYP3A5\*1/\*3) fueron denominados “expresadores”, mientras aquellos del portadores genotipo CYP3A5\*3/\*3 fueron llamados “no expresadores”.

*Aspectos éticos:*

En todos los casos se obtuvo consentimiento informado firmado por los participantes antes de iniciar cualquiera de las evaluaciones del estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética del CIPREC (Centro de Investigación y Prevención Cardiovascular) y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

*Análisis estadístico:*

Se estimaron dosis diarias de TAC, Co y Co/dosis según la expresión o no del alelo CYP3A5\*1 entre donantes y receptores así como entre los polimorfismos MDR1. Todos los valores fueron expresados como medias  $\pm$  desvío estándar. Se utilizó el test de U Mann-Whitney para determinar diferencias entre las variables continuas entre los grupos. El test de chi-cuadrado fue utilizado para analizar diferencias entre variables discretas. Se realizaron modelos de regresión lineal múltiples para evaluar el efecto sinérgico de variables clínicas y genotipo de CYP3A5 en el logaritmo de la concentración ajustada por dosis.

El nivel de significancia estadística fue fijado en 5%. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa STATA 11.0©.

## **Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos**

### *Diseño del estudio:*

Estudio longitudinal de cohorte retrospectivo con un seguimiento de 2 años en el cual se evaluó la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre en pacientes pediátricos trasplantados luego de trasplante hepático. Los niveles de TAC en sangre fueron obtenidos a partir del monitoreo terapéutico rutinario de medicamentos luego del trasplante hepático en el Hospital Prof. J.P. Garrahan. El estudio de las variantes alélicas de los donantes y receptores se investigó en tejido de biopsias hepáticas postrasplante.

### *Pacientes:*

Se incluyeron 77 pacientes menores de 18 años trasplantados hepáticos durante el periodo 2009-2012 en el Hospital pediátrico J. P Garrahan medicados con Tacrolimus. A continuación se detallan los criterios de inclusión y exclusión:

### *Criterios de inclusión:*

- ✓ Pacientes menores de 18 años
- ✓ Receptores de un trasplante hepático primario con donantes vivos, cadavéricos, con injerto completo o reducido.
- ✓ Inmunosupresión con TAC con o sin esteroides, con o sin micofenolato de mofetilo.

### *Criterios de exclusión:*

- ✓ Infección por HIV.
- ✓ Muerte temprana ocurrida antes de recibir esquema inmunosupresor con TAC en el postquirúrgico inmediato
- ✓ Pérdida parcial o total de registros clínicos en las historias clínicas

### *Dosificación y esquema de tratamiento:*

Se recolectó información de los pacientes desde su postquirúrgico inmediato. A continuación se describe el esquema de inmunosupresión utilizado en los pacientes según las guías de práctica clínica del Hospital Prof. J.P. Garrahan para pacientes luego de trasplante hepático. En fase de inducción todos los pacientes recibieron Basiliximab utilizando en menores de 30 kg, 10 mg/dosis; y en mayores 30 kg, 20 mg/dosis. Administraron dos dosis endovenosas en bolo, la primera dentro de las 8 hs postreperfusion del injerto y la segunda al cuarto día posoperatorio. En fase de mantenimiento utilizaban TAC comenzando 24 hs después de la reperfusión. La dosis inicial fue 0,1 mg/kg/día administrada cada 12 hs por vía oral. Luego la dosis se ajustó de acuerdo a los niveles plasmáticos, la función hepática y renal, y a la carga viral de Virus Epstein Barr (Lefebvre, Cardona et al.). En pacientes sin actividad infecciosa (carga viral menor a 4000 copias/ug DNA) y buena funcionalidad renal los niveles sanguíneos iniciales deseados era de: 8-12 ng/ml durante el primer mes postrasplante, y luego 5-8 ng/ml hasta cumplido el año postrasplante. En pacientes con carga viral superior a 4000 copias/ug DNA en 2 muestras consecutivas o con evidencias clínicas de infección por EBV procedieron a una rápida reducción de la inmunosupresión, buscando niveles de FK de 4-6 ng/ml. No se administrará terapia antiviral. En los pacientes que desarrollaban toxicidad renal, independientemente de la carga viral, disminuían los dosajes sanguíneos de FK en 25 % y agregando Micofenolato Mofetil (MMF) como terapia de rescate. La dosis inicial de MMF fue de 20 mg/kg/día y se podrá incrementar hasta 40 mg/kg/día luego de una semana de tratamiento

### *Monitoreo plasmático y cuantificación de tacrolimus en sangre:*

Se obtuvieron a partir de los registros de monitoreo terapéutico de TAC rutinarios del hospital todos los niveles de TAC a partir del 5 día hasta el 2 año post-trasplante. Todos los valores de monitoreo registrados corresponden dosificaciones hechas en muestras de sangre previas a la dosis matutina (Co).

La cuantificación de TAC es realizada en el hospital mediante inmunoensayo por quimioluminiscencia en Architect i1000 Abbott de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este equipo es sometido a ensayos de calibración en el Hospital usando calibradores Abbott a 0, 3, 6, 12, 20 and 30 ng/mL evaluados en duplicado cuando se cambia de lote o cuando uno de los tres niveles de controles evaluados por las multirreglas de Westgard dan fuera de rango. Se usan controles internos, Biorad que tienen Peer group y controles externos Holt. El límite inferior de cuantificación fue de 2.0 ng/ ml.

*Información recolectada:*

En todos los casos se obtuvo información demográfica (fecha de nacimiento, género), datos antropométricos (peso, talla), indicación del trasplante, tiempo de seguimiento post-trasplante, medicación actual y posología, medicaciones concomitantes. Información del trasplante como tipo de donante, cantidad de órgano trasplantado, etiología o causa que motivo a realizar el trasplante en el receptor, cantidad de días post-quirúrgicos: días luego del trasplante. También se registró laboratorio clínico incluyendo hematología (hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas, RIN) y química serológica (creatinina, nitrógeno ureico, bilirrubina total y directa, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa (GPT-ALT), aspartato aminotransferasa (GOT-AST), gama glutamil transpeptidasa (GGT), albúmina).

*Aislamiento de ADN y genotipificación:*

La genotipificaciones de CYP3A5 (CYP3A5\*1/\*3 o \*3/\*3) y MDR1 (exon 26, C3435T, exon 21 G2677T) fueron realizadas en biopsias de hígado del donante luego del trasplante y en muestras de sangre, a partir de leucocitos, en el caso de los receptores. El DNA del hígado del donante fue obtenido a partir de 10 cortes, con micrótopo, de un grosor de 10 embebidos en biopsias de hígado en parafina-formaldehído almacenadas y conservadas desde el momento de la cirugía de cada paciente.

La extracción del ADN fue llevada a cabo utilizando los kits comerciales QIAamp DNA Blood y QIAamp DNA FFPE Tissue Kit siguiendo las instrucciones del fabricante en cada caso obteniendo entre 20 a 100 ng de DNA en cada caso. Los polimorfismos MDR1 C3435T (rs1045642) y G2677T (rs2032582) fueron detectados usando PCR-RFLP con enzimas de restricción MboI and RsaI respectivamente. El polimorfismo CYP3A5\*3 (rs776746) fue detectado por PCR y directamente secuenciado. Pacientes portadores de las variantes (CYP3A5\*1/\*1 or CYP3A5\*1/\*3) fueron denominados “expresadores”, mientras aquellos del portadores genotipo CYP3A5\*3/\*3 fueron llamados “no expresadores”.

#### *Aspectos éticos:*

En todos los casos se obtuvo un consentimiento Informado firmado por los participantes antes de iniciar cualquiera de las evaluaciones específicas del estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética e investigaciones del Hospital Prof. J.P. Garrahan y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

#### *Análisis estadístico:*

Se estimaron dosis diarias de TAC, Co y Co/dosis según la expresión o no del alelo CYP3A5\*1 entre donantes y receptores así como entre los polimorfismos MDR1. Todos los valores fueron expresados como medias  $\pm$  desvío estándar. Se utilizó el test de U Mann-Whitney para determinar diferencias entre las variables continuas entre los grupos. El test de chi-cuadrado fue utilizado para analizar diferencias entre variables discretas.

Para evaluar la relación longitudinal, entre el las Co/dosis, dosis y Co y otras variables clínicas y genéticas se utilizó un modelo de ecuaciones de estimación generalizadas (Generalized estimating equations) (Zeger and Liang 1986, Nagashima, Sato et al. 2013) utilizando una distribución log-gamma, según las recomendaciones de Chen y col, para el modelamiento de datos de concentraciones repetidos (Chen and Lin 2013)

Se utilizó la técnica *backward* que incluye una variable por vez en el modelo, con la eliminación de aquellas que no alcanzaban el valor de p menor del 20%. Para permanencia en el modelo, se adoptó como criterio el nivel de significancia menor o igual al 5%. Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa STATA 11.0©.



## Resultados.

### **Evaluación, mediante técnicas meta-analíticas, de la evidencia publicada respecto al efecto combinatorio del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en la farmacocinética del TAC en pacientes trasplantados hepáticos**

Un total de 205 publicaciones fueron identificadas durante la búsqueda, de las cuales 197 quedaron excluidas por falta de cumplimiento de los criterios de inclusión o duplicación. Ocho estudios, que involucran un total de 694 pacientes adultos postrasplante hepático fueron incluidos en el meta-análisis (Wei-lin, Jing et al. 2006, Yu, Wu et al. 2006, Barrera-Pulido, Aguilera-Garcia et al. 2008, Fukudo, Yano et al. 2008, Jun, Lee et al. 2009, Provenzani, Notarbartolo et al. 2009, Muraki, Usui et al. 2011, Rahsaz, Azarpira et al. 2012).

En la **tabla 3** se muestran las características de los estudios incluidos. Todos los estudios eran estudios de cohorte retrospectiva. De los 8 estudios, 2 fueron realizados en población caucásica (Barrera-Pulido, Aguilera-Garcia et al. 2008, Provenzani, Notarbartolo et al. 2009), 5 en población asiática (Wei-lin, Jing et al. 2006, Yu, Wu et al. 2006, Fukudo, Yano et al. 2008, Jun, Lee et al. 2009, Muraki, Usui et al. 2011) y 1 en población iraní (Rahsaz, Azarpira et al. 2012). El porcentaje de expresadores CYP3A5 (genotipos \*1/\*1 y \*1/\*3) fue mayor en población asiática que en la caucásica, tanto en donantes como en receptores.

Autor	n	Edad (media±DS)	Mujeres (%)	Dosis inicial (mg/kg/day)	Rango de C0 esperado (ng/mL)	Metodo de medicion	Raza receptor (%)	Receptor *1/*1 or *1/*3 (%)	Donante *1/*1 or *1/*3 (%)
Provenzani	32	54±12	25%	0.3	5 a 12	Inmunoensayo , EMIT 2000®	Caucasico -100%	9.3%	15.6%
Barrera-Pulido	53	53±11	40%	0.1	10 a 15	Inmunoensayo , EMIT 2000®	Caucasico -100%	11.3%	9.40%
Fukudo	31	55±12	6%	0.15	10 a 15	Inmunoensayo , IMx®	Japones -100%	33.3%	40.0%
Jun	321	53±13	25%	ND	ND	Inmunoensayo , IMx®	Coreano -100%	40.4%	44.6%
Rahsaz	100	35±11	30%	0.15	7 a 10	Inmunoensayo , EMIT 2000®	Irani -100%	5.0%	ND
Wei-lin	50	44±9	4%	0.08	7 a 10	Inmunoensayo , IMx®	Chinese -100%	66.0%	60.0%
Yu-S	51	45±9	ND	4 mg/day	7 a 10	Inmunoensayo , IMx®	Chinese -100%	62.2%	56.6%
Muraki	56	54	36%	2 mg/day	10 a 15	Inmunoensayo , IMx®	Japones -100%	28.6%	37.5%

**Tabla 3.** Características demográficas de los pacientes incluidos en el meta-análisis.

La **tabla 4** presenta los resultados del meta-análisis en términos de concentraciones Co de tacrolimus durante el primer mes postrasplante. Las diferencia de las concentraciones Co **en los estudios** que compararon receptores **expresores** versus receptores **no expresores** (DME: diferencia de medias estandarizadas, diferencia de medias de cada estudio dividida por la desviación estándar combinada como un método para estandarizar dicha diferencia en una escala única y evitar el posible sesgo por la utilización de escalas de medición distinta entre los estudios) fue negativa especialmente hasta el día 14 (los intervalos de confianza de las diferencias no incluyen el 0, si el intervalo de confianza de la diferencia incluye el 0 quiere decir que esta diferencia no es estadísticamente significativa dado que existe una probabilidad mayor del 5% (IC 95%) que dicha diferencia sea igual a 0). El estadístico resumen o diferencia de medias estandarizadas resumen al meta analizar todos los estudios fue de -0.335 (IC 95% -0.474 a -0.197) lo que evidencia de forma significativa la menor concentración en forma global, esto es: en los estudios incluidos la Co fue menor en aquellos receptores expresores frente a no expresores.

Por otra parte, la diferencia media (DME) de las concentraciones Co en los estudios que compararon donantes expresores versus donantes no expresores fue menor en forma global –DME 0.325 (IC 95%-0.423 a -0.227) – siendo estas diferencias presentes de forma significativa tanto en los primeros dos meses como luego del 6 mes postrasplante.

Subgrupo	Estudios incluidos	n	DME	(IC 95%)		I <sub>2</sub>
<i>Efecto del genotipo del receptor</i>						
3 día	1	58	-0.941	<b>-1.804</b>	<b>-0.079</b>	NA
7 día	4	269	-0.713	<b>-1.076</b>	<b>-0.349</b>	91%
14 día	3	169	-0.725	<b>-1.115</b>	<b>-0.336</b>	92%
1 mes	6	303	-0.081	-0.402	0.241	62%
2 mes	3	169	-0.253	-0.618	0.113	39%
3 mes	3	143	-0.331	-0.769	0.106	0%
6 mes	3	145	-0.519	-0.907	-0.131	89%
12 mes	2	111	0.274	-0.134	0.682	NA
	Total		<b>-0.335</b>	<b>-0.474</b>	<b>-0.197</b>	78%
<i>Efecto del genotipo del donante</i>						
3 día	1	58	0.454	-0.466	1.375	NA
7 día	3	169	-0.341	<b>-0.593</b>	<b>-0.089</b>	0%
14 día	3	169	-0.587	<b>-0.855</b>	<b>-0.320</b>	88%
1 mes	4	201	-0.312	<b>-0.548</b>	<b>-0.077</b>	84%
2 mes	3	169	-0.364	<b>-0.620</b>	<b>-0.107</b>	72%
3 mes	3	141	-0.272	-0.580	0.035	61%
6 mes	3	143	-0.273	<b>-0.534</b>	<b>-0.012</b>	0%
12 mes	2	111	-0.692	<b>-1.145</b>	<b>-0.239</b>	NA
	Total		<b>-0.325</b>	<b>-0.423</b>	<b>-0.227</b>	81%
<i>Según raza</i>						
Caucásica	3		-0.325	<b>-0.423</b>	<b>-0.227</b>	0%
Asiática	3		-0.403	<b>-0.517</b>	<b>-0.289</b>	88%

**DME:** diferencia de medias estandarizada

**Tabla 4.** Diferencias en la Co de TAC entre expresores CYP3A5 comparados con no expresores en pacientes trasplantados hepáticos

En la **tabla 5** se presenta el resultado en términos de dosis diaria de TAC en el primer año luego del trasplante. Se puede observar que los pacientes receptores expresores incluidos en los estudios, en forma global al meta analizar todos los estudios, requieren mayores dosis que los no expresores (DME 0.559, IC 95% 0.392 a 0.725; al igual que el párrafo anterior si el IC 95% de la DME incluye el 0 significa que no existen diferencias estadísticamente significativas en las dosis entre ambos grupos, en este caso el IC 95% no incluyó el 0).

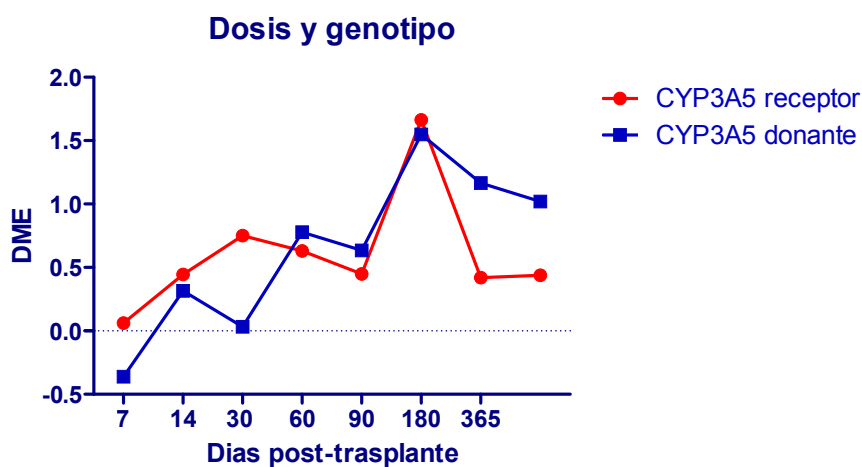
Al observar el comportamiento de dichas diferencias según el tiempo postrasplante se puede evidenciar que las mismas fueron estadísticamente significativas especialmente en los primeros 14 días postrasplante. Así mismo al comparar la diferencia en las dosis entre según el genotipo del donante, en forma global al meta analizar todos los estudios, aquellos que recibieron un órgano expresor también requieren mayores dosis que los no expresores, (DME 0.534, IC 95% 0.208 0.861). Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas especialmente después del primer mes post-trasplante.

Subgrupo	Estudios incluidos	n	DME	(IC 95%)		I <sub>2</sub>
<i>Efecto del genotipo del receptor</i>						
3 día	1	58	0.062	-0.783	0.907	NA
7 día	3	168	<b>0.444</b>	<b>0.086</b>	<b>0.802</b>	0%
14 día	3	168	<b>0.750</b>	<b>0.384</b>	<b>1.116</b>	0%
1 mes	3	144	<b>0.630</b>	<b>0.261</b>	<b>0.998</b>	0%
2 mes	1	60	0.450	-0.093	0.993	NA
3 mes	1	34	1.663	0.630	2.696	0%
6 mes	2	94	0.419	-0.052	0.891	0%
12 mes	1	60	0.438	-0.104	0.981	NA
Total			<b>0.559</b>	<b>0.392</b>	<b>0.725</b>	0%
<i>Efecto del genotipo del donante</i>						
3 día	1	58	-0.361	-1.281	0.558	NA
7 día	2	118	0.316	-0.645	1.277	70%
14 día	2	118	0.033	-0.866	0.933	66%
1 mes	3	144	<b>0.779</b>	<b>0.307</b>	<b>1.251</b>	0%
2 mes	1	112	<b>0.634</b>	<b>0.105</b>	<b>1.163</b>	NA
3 mes	1	84	<b>1.550</b>	<b>0.519</b>	<b>2.582</b>	NA
6 mes	2	92	<b>1.166</b>	<b>0.679</b>	<b>1.652</b>	0%
12 mes	1	60	<b>1.020</b>	<b>0.471</b>	<b>1.569</b>	NA
Total			<b>0.534</b>	<b>0.208</b>	<b>0.861</b>	64%
<i>Según raza</i>						
Caucásica	2		0.383	-0.022	0.788	59%
Asiática	2		0.569	0.406	0.732	0.0%

**DME:** diferencia de dosis media estandarizada

**Tabla 5.** Diferencias en la dosis de TAC entre expresores CYP3A5 comparados con no expresores en pacientes trasplantados hepáticos

En la **figura 2**, se grafica las diferencias media de dosis (DME) tanto de **expresores receptores** como **donantes**; con el objeto, de si bien como se demostró anteriormente tanto la expresión en el receptor como en el donante se asoció a mayores dosis entre los estudios, poder comparar la magnitud de dichas diferencias entre solo expresores receptores y donantes según el tiempo. Se puede evidenciar gráficamente que la magnitud de las DME en las dosis es mayor en receptores expresores respecto a donantes expresores en los primeros 60 días postrasplante. Es decir, se presentaron mayores diferencias en las dosis según el genotipo del receptor que según el genotipo del donante en los primeros 60 días postrasplante. Así mismo las diferencias (DME) en las dosis fueron mayores en los donantes expresores respecto a los receptores expresores luego de los 180 días postrasplante; es decir se presentaron mayores diferencias en las dosis según genotipo del donante que según genotipo del receptor luego de los 180 días postrasplante.



**Figura 2.** Diferencia media de dosis (DME) según expresión de CYP3A5 en donante y receptor en el tiempo.

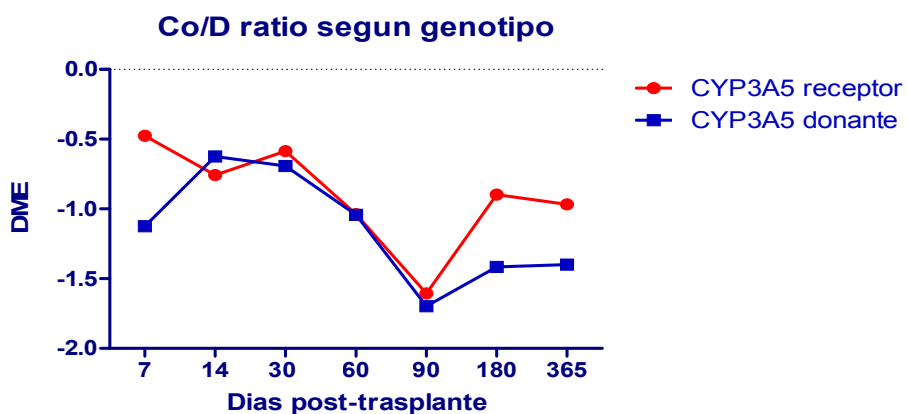
La **tabla 6** presenta el resultado del meta-análisis en términos de concentraciones ajustadas por dosis durante el primer año postrasplante. En forma global en los estudios al comparar receptores expresores frente a receptores no expresores, los receptores expresores presentaron una menor Co/D que los no expresores (DME -0.799, IC 95% -0.887 -0.710) y esta diferencia fue además significativa en todos los puntos de tiempo analizados (todos los IC 95% según el tiempo postrasplante no incluyen el 0). De igual manera, en forma global al meta analizar los estudios según el genotipo del donante, aquellos expresores presentaron una menor Co/D que los no expresores (DME -0.981, IC 95% -1.120 -0.842) siendo esta diferencia significativa además en todos los puntos de tiempo postrasplante analizados.

Subgrupo	Estudios incluidos	n	DME	(IC 95%)		I <sub>2</sub>
<i>Efecto del genotipo del receptor</i>						
7 día	5	314	-0.475	<b>-0.748</b>	<b>-0.203</b>	0.0%
14 día	4	214	-0.757	<b>-0.979</b>	<b>-0.535</b>	89.2%
1 mes	6	348	-0.586	<b>-0.855</b>	<b>-0.316</b>	80%
2 mes	2	111	-1.037	<b>-1.336</b>	<b>-0.738</b>	94%
3 mes	2	85	-1.606	<b>-2.017</b>	<b>-1.196</b>	88%
6 mes	3	145	-0.897	<b>-1.309</b>	<b>-0.485</b>	94%
12 mes	1	111	-0.967	<b>-1.403</b>	<b>-0.532</b>	NA
Total			-0.799	<b>-0.887</b>	<b>-0.710</b>	84%
<i>Efecto del genotipo del donante</i>						
7 día	3	164	-1.125	<b>-1.468</b>	<b>-0.782</b>	86.80%
14 día	3	164	-0.624	<b>-0.949</b>	<b>-0.299</b>	83.3%
1 mes	4	196	-0.692	<b>-0.997</b>	<b>-0.387</b>	0%
2 mes	2	111	-1.043	<b>-1.451</b>	<b>-0.635</b>	76.2%
3 mes	2	83	-1.698	<b>-2.273</b>	<b>-1.122</b>	85.5%
6 mes	3	143	-1.416	<b>-1.827</b>	<b>-1.004</b>	90.6%
12 mes	2	111	-1.399	<b>-1.863</b>	<b>-0.935</b>	NA
Total			<b>-0.981</b>	<b>-1.120</b>	<b>-0.842</b>	85%
<i>Según raza</i>						
Caucásica	2		-0.482	-0.816	-0.148	0%
Asiática	5		-0.799	-0.887	-0.710	87.1%

**DME:** diferencia de Co/dosis media estandarizada

**Tabla 6.** Diferencias en la Co/dosis de TAC entre expresores CYP3A5 comparados con no expresores en pacientes trasplantados hepáticos.

Al igual que en la gráfica 2, en la **gráfica 3** comparamos las diferencias en la Co/D según el genotipo del receptor y donante en los estudios incluidos. Se puede evidenciar en términos globales que las diferencias en la Co/D fueron muy similares tanto según el genotipo del receptor como del donante hasta los 90 días postrasplante. Luego de este periodo las diferencias entre donantes expresores y no expresores son mayores que entre receptores expresores y no expresores.



**Figura 3.** Diferencia de Concentraciones ajustadas por dosis media (DME) según expresión de CYP3A5 en donante y receptor en el tiempo

Tres estudios incluidos (Yu, Wu et al. 2006, Barrera-Pulido, Aguilera-Garcia et al. 2008, Muraki, Usui et al. 2011) presentaron datos pareados según genotipo donante receptor y fue factible estimar diferencias (DME) en la Co/dosis entre diferentes combinaciones de genotipo donante/receptor y donante/receptor no expresores, **ver tabla 7**. Se puede observar en forma global al meta analizar los estudios que comparaban las Co/dosis entre **pacientes receptores no expresores que recibieron un órgano expresor**, frente a **pacientes que eran no expresores y recibieron un órgano no expresor**, este primer grupo presentaban menores Co/dosis de forma significativa (DME -1.933, IC95%-2.573,-1.293), y estas diferencias fueron significativas en todos los tiempos postrasplante evaluados.

Así mismo la Co/dosis entre **receptores expresores que recibieron un órgano no expresor** fue menor de forma significativa (DME -1.942, IC95% -2.724, -1.161) frente a el par donante-receptor no expresor. Como era de esperar también aquellos **pacientes receptores expresores que recibieron un órgano expresor** presentaron menores Co/dosis y de mayor magnitud que los anteriores grupos (DME -2.544 IC 95% -3.342, -1.747).

Tiempo	Par expresor (Donante;Receptor)	Par no-expresor (Donante;Receptor)	Estudios incluidos	n	DME	(IC 95% )	I <sub>2</sub>
7 día	AA/AG ; GG	GG : GG	2	56	-1.968	-4.283 0.347	91%
14 día	AA/AG ; GG	GG : GG	2	56	-1.133	-1.861 -0.405	33%
1 mes	AA/AG ; GG	GG : GG	2	56	-1.076	-1.659 -0.493	0%
2 mes	AA/AG ; GG	GG : GG	1	36	-2.124	-2.981 -1.266	NA
3 mes	AA/AG ; GG	GG : GG	1	36	-2.394	-3.291 -1.497	NA
6 mes	AA/AG ; GG	GG : GG	1	36	-3.688	-4.806 -2.571	NA
12 mes	AA/AG ; GG	GG : GG	1	36	-3.266	-4.307 -2.226	NA
<b>Sub total</b>					<b>-1.933</b>	<b>-2.573</b> <b>-1.293</b>	80%
7 día	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	2	61	-1.841	-3.232 -0.451	78%
14 día	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	2	61	-2.343	-4.944 0.258	92%
1 mes	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	2	61	-1.618	-3.305 0.068	86%
2 mes	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	1	30	-2.815	-3.853 -1.777	NA
3 mes	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	1	30	-2.592	-3.593 -1.590	NA
6 mes	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	1	30	-4.677	-6.071 -3.284	NA
12 mes	AA/AG ; AA/AG	GG : GG	1	30	-4.382	-5.715 -3.049	NA
<b>Sub total</b>					<b>-2.544</b>	<b>-3.342</b> <b>-1.747</b>	84%
7 día	GG; AA/AG	GG : GG	2	53	-0.866	-1.546 -0.186	12%
14 día	GG; AA/AG	GG : GG	2	53	-1.840	-4.506 0.826	92%
1 mes	GG; AA/AG	GG : GG	2	53	-1.337	-3.330 0.656	88%
2 mes	GG; AA/AG	GG : GG	1	30	-2.789	-3.943 -1.634	NA
3 mes	GG; AA/AG	GG : GG	1	30	-2.247	-3.318 -1.177	NA
6 mes	GG; AA/AG	GG : GG	1	30	-4.306	-5.746 -2.867	NA
12 mes	GG; AA/AG	GG : GG	1	30	-2.574	-3.694 -1.454	NA
<b>Sub total</b>					<b>-1.942</b>	<b>-2.724</b> <b>-1.161</b>	83%

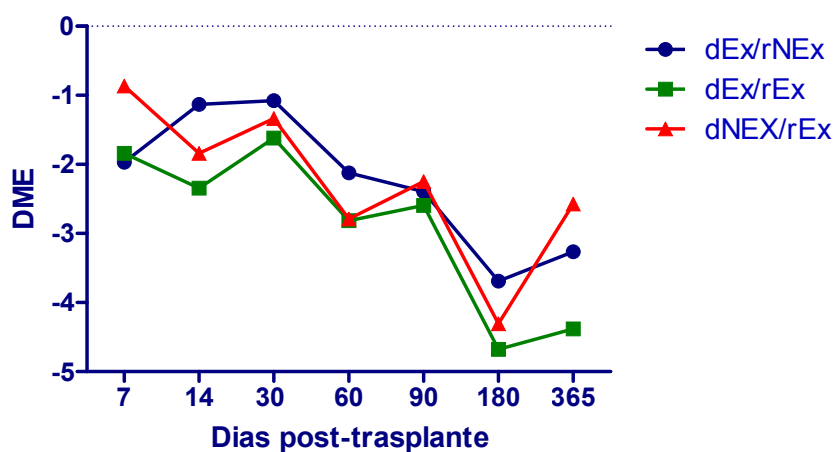
**DME:** diferencia de medias estandarizada

**Tabla 7.** Diferencias en la Co/dosis media de TAC entre par donante-receptor expresores CYP3A5 comparados con par donante-receptor no expresores en pacientes trasplantados hepáticos



Al graficar las diferencias en la Co/dosis de los estudios entre las tres posibles combinaciones genotípicas donante-receptor y el genotipo donante-receptor no expresor, se puede evidenciar que en todos los puntos de tiempo la magnitud de la diferencia entre el par donante/receptor expresor (línea verde) vs par donante/receptor no expresor fue mayor respecto a las demás combinaciones genotípicas.

**DME entre combinaciones de genotipo donante/receptor y combinación donante/receptor no expresor**



**Figura 4.** Diferencias en la Co/dosis media de TAC entre par donante-receptor expresores CYP3A5 comparados con par donante-receptor no expresores en pacientes trasplantados hepáticos

**Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A, polimorfismos en el exón 21 (2677G T,A) y 26 (C3435T) del gen MDR1 de donantes y/o receptores y los niveles de TAC y TAC XL en sangre de pacientes adultos trasplantados hepáticos.**

Se estudiaron 24 pacientes mayores de 18 años con una dosis estable de TAC administrada por no menos de 6 meses después del trasplante hepático, en quienes se planeaba realizar por parte del médico tratante su conversión a la formulación de TAC-XL. En la **tabla 8** se pueden visualizar las características de dicha población. Se puede evidenciar que se trató de pacientes en su mayoría hombres, mayores de 50 años, todos argentinos, medicados con TAC por más de 8 meses luego de trasplante hepático, más de la mitad medicados además de TAC con MMF y más de la mitad con infección por virus de hepatitis C asociada a hepatocarcinoma o cirrosis alcohólica como enfermedad de base. Respecto a los parámetros cinéticos del TAC y TAC-XL no se evidenciaron diferencias clínicamente significativas en las dosis, concentraciones y Co/dosis entre las formulaciones de TAC y TAC-XL.

<b>Variable</b>	<b>Total</b>
Hombres n(%)	15(62.5%)
Edad años, mediana (rango)	57(32-67)
Peso (kg), mediana (rango)	79.5(50-95)
Meses luego del trasplante , Mediana (rango)	8 (6-192)
Inmunosupresión	
FK/MMF/Pred	11(57.8%)
FK/Pred	6(31.5%)
<b>Enfermedad de base</b>	
VHC +HCC	10(41.6%)
VHC + Cirrosis Alcohólica	6(25%)
Cirrosis criptogénica	3(12.5%)
Otras*	5(20.83%)
<b>Parámetros cinéticos</b>	
Mediana de concentración de TAC (ng/ml), (rango)	6.2(0.6-10)
Mediana de concentración de TAC-XL (ng/ml), (rango)	6.1 (1.9-12)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/day)	119.0 (26.2-425)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/day)	116.3(16.6-370.5)
Mediana de dosis de TAC (mg/kg/day)	0.047 (0.12-0.3)
Mediana de dosis de TAC-XL (mg/kg/day)	0.05(0.12-0.3)

**VHC : Virus de hepatitis C , HCC : Hepatocarcinoma , MMF : Mofetilmicofenolato , \*Otros: hemocromatosis (n=1;4.1%) , hepatitis autoimmune (n=2; 8.3%), Síndrome Budd-Chiari (n=1; 4.1%) , cirrosis alcohólica (n=1; 4.17%)**

**Tabla 8.** Características de los pacientes del estudio

La frecuencia del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en los receptores fue de 16.6% y en los donantes del 25%, **ver tabla 9**. No se evidenciaron desviaciones estadísticamente significativas en la distribución de los polimorfismos según la ley de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ). Entre aquellos receptores no expresores el 80% recibió un hígado no expresor del polimorfismo del CYP3A5, mientras en los receptores con el polimorfismo la mitad recibió un órgano no expresor.

Entre los receptores la frecuencia de polimorfismos del exón 21 en el gen MDR1 (variantes alélicas C/T o TT) fue del 58.3%, mientras para el exón 26 (variantes alélicas: G/T, G/A, TT, T/A) fue del 59.1%, **ver tabla 10**.

<b>Genotipo del receptor</b>	<b>Alelo</b>	<b>n (%)</b>
CYP3A5	G/G (*3)	20 (83.3)
	A/G (*1)	4 (16.6)
<b>Genotipo del donante</b>		
CYP3A5	G/G (*3)	18 (75)
	A/G (*1)	6 (25)
<b>Genotipo del receptor</b>	<b>Genotipo del donante</b>	
A/G	A/G	2 (50)
	G/G	2 (50)
G/G	A/G	4(20)
	G/G	16(80)

**Tabla 9.** Distribución de genotipos de CYP3A5 según receptor, donante y combinación receptor-donante.

<b>Genotipo del receptor</b>	<b>Alelo</b>	<b>n (%)</b>
ABCB1 1236C<T	C/T	11 (45.8%)
	C/C	10 (41.6%)
	T/T	3 (12.5%)
ABCB1 2677G>T	G/G	9 (40.9%)
	G/T	9 (40.9%)
	G/A & T/A	2 (9.0%)
	T/T	2 (9.0%)

**Tabla 10.** Distribución de genotipos de PGP según receptor, donante.

Al comparar los parámetros cinéticos entre aquellos pacientes **receptores expresores** versus **receptores no expresores** según el genotipo del receptor, se observa mayores requerimientos de TAC y TAC-XL en expresores frente a no expresores, **ver tabla 11**. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones y Co/dosis entre ambos grupos tanto para TAC como TAC XL.

Variable	Genotipo del receptor	
	G/G	A/G
Hombres n(%)	12(60%)	3(75%)
Edad, mediana (rango)	55.0(32-67)	61.5(59-64)
Peso (kg), mediana (rango)	77.5(50-95)	82 (70-85)
Meses luego del trasplante , Mediana (rango)	8(6-192)	7(6-10)
Inmunosupresión		
FK/MMF/Prednisona	9(56.2%)	2(66.6%)
FK/Prednisona	5(31.2%)	1(33.3%)
<b>Enfermedad de base</b>		
HCV (HCC), n(%)	8(40%)	2(50%)
HCV + Cirrosis Alcohólica, n(%)	6(30%)	0
Cirrosis criptogénica, n(%)	2(10%)	0
Otras, n(%)	4(20%)	1 (25%)
<b>Parámetros cinéticos</b>		
Mediana de concentración de TAC (ng/ml), (rango)	5.8 (0.6-10)	7.45 (6-9.7)
Mediana de concentración de TAC-XL (ng/ml), (rango)	5.5 (1.9-12)	8.15 (6.7-10.3)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	129.2(26.2-425)	97.3(42-134.1)
Mediana de Co/dosis de TAC-XL (ng/mL) (mg/kg/día)	139.2(16.6-370.5)	104.1(56.7-119.1)
Mediana de dosis de TAC (mg/kg/día)	0.045 (0.01-0.3)	<b>0.079 (0.07-0.14)*</b>
Mediana de dosis de TAC-XL (mg/kg/día)	0.045(0.01-0.3)	<b>0.079(0.07-0.14)*</b>

\*p<0.05

**Tabla 11.** Características demográficas y cinéticas según genotipo CYP3A5 del receptor.

Respecto a los parámetros cinéticos según el **genotipo del donante**, se evidencia una menor Co/dosis y mayores requerimientos de dosis en pacientes que recibieron un hígado expresor frente a los que recibieron uno no expresor, **Ver tabla 12.**

La expresión de CYP3A5 por parte de hígado del donante explicó el 40.46% ( $p=0.001$ ) de la variabilidad en los niveles de TAC y el 37.56% ( $p=0.001$ ) en los de TAC-XL, ninguna otra variable clínica, genética o sociodemográfica demostró alcanzar significancia estadística en el modelo de regresión lineal múltiple entre el logaritmo de la Co o logaritmo de la Co/dosis o dosis y cada covariable.

Variable	Genotipo del donante	
	G/G	A/G
Hombres, n(%)	13(72)	2(33)
Edad, mediana (rango)	57(32-67)	59(36-70)
Peso (kg), mediana (rango)	84(59-95)	73 (50-81)
Meses luego del trasplante , Mediana (rango)	10(7-192)	8(6-117)
Inmunosupresión		
FK/MMF/Prednisona, n(%)	9(56.2%)	2(66.6%)
FK/Prednisona, n(%)	5(31.2%)	1(33.3%)
<b>Enfermedad de base</b>		
HCV (HCC), n(%)	9(50.0)	1(16.6)
HCV + Cirrosis Alcohólica, n(%)	4(22.2)	2(33.3)
Cirrosis criptogénica, n(%)	2(11.1)	1(16.6)
Otras, n(%)	3(16.6)	2(33.3)
<b>Parámetros cinéticos</b>		
Mediana de concentración de TAC (ng/ml), (rango)	5.5 (0.6-10)	5.75 (2.3-9.1)
Mediana de concentración de TAC-XL (ng/ml), (rango)	5.4 (1.9-12)	5.6 (2.7-10.3)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	140.2(26.2-425)	<b>43 (30-72.9)*</b>
Mediana de Co/dosis de TAC-XL (ng/mL) (mg/kg/ día)	150.7(48.1-370.5)	<b>52.6(16.5-119.1)*</b>
Mediana de dosis de TAC (mg/kg/ día)	0.039 (0.01-0.1)	<b>0.105 (0.05-0.3)*</b>
Mediana de dosis de TAC-XL (mg/kg/ día )	0.039(0.01-0.1)	<b>0.105(0.05-0.3)*</b>

**\*p<0.05**

**Tabla 12.** Características demográficas y cinéticas según genotipo CYP3A5 del donante

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones, dosis y Co/dosis entre pacientes con los distintos alelos del ABCB1 1236C<T y 2677G>T, ver **tabla 13** y **14**. La expresión de ABCB1 1236CC/T o T/T por parte de hígado del donante explico solo el 9.34% (p=0.085) de la variabilidad en los niveles de TAC y el 6.53% (p=0.212) en los de TAC-XL. La expresión de ABCB1 2677G>T por parte de hígado del donante solo explico el 3.5% (p=0.347) de la variabilidad en los niveles de TAC y el 1.84% (p=0.244) en los de TAC-XL.

Variable	Genotipo ABCB1 1236C<T		
	C/T	C/C "wild type"	T/T
Hombres, n(%)	8(72.7%)	6(60%)	1(33.33%)
Edad, mediana (rango)	60(32-67)	51 (35-67)	46.5(36-57)
Peso (kg), mediana (rango)	81(59-89)	77.5(60-95)	74(50-90)
Meses luego del trasplante , Mediana (rango)	8(6-192)	29(7-172)	6.5(6-7)
Inmunosupresión			
FK/MMF/Prednisona, n(%)	8(80%)	2(28.5%)	1(50%)
FK/Prednisona, n(%)	2(20%)	3(42.8%)	1(50%)
<b>Enfermedad de base</b>			
HCV (HCC), n(%)	6(54.5%)	3(30%)	1(33.3%)
HCV + Cirrosis Alcohólica, n(%)	3(27.2%)	3(30%)	0
Cirrosis criptogénica, n(%)	0	2(20%)	1(33.3%)
Otras, n(%)	2(18.1%)	2(20%)	1(33.3%)
<b>Parámetros cinéticos</b>			
Mediana de concentración de TAC (ng/ml), (rango)	6 (0.6-8.7)	8.5 (2.1-10)	5.7(4.2-9.1)
Mediana de concentración de TAC-XL (ng/ml), (rango)	6.3(1.9-10.3)	6.2(2.7-11.7)	5.3(5-12)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	110.9(26.2-369.7)	134.1 (41.4-425)	51.8(30.3-171)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	107.1(47.2-340)	187.9(48.6-370.5)	65.3(16.6-360)
Mediana de dosis de TAC (mg/kg/día)	0.04(0.02-0.14)	0.04(0.01-0.07)	0.08(0.03-0.3)
Mediana de dosis de TAC-XL (mg/kg/día)	0.04(0.02-0.14)	0.04(0.01-0.07)	0.08(0.03-0.3)

**Tabla 13.** Características demográficas y cinéticas según Genotipo ABCB1 1236C<T

<b>Variable</b>	<b>G/G "wild type"</b>	<b>G/T</b>	<b>G/A &amp; T/A</b>	<b>T/T</b>
Hombres, n(%)	5(55.56%)	5(55.56%)	2(100%)	1(50%)
Edad, mediana (rango)	46.5(32-64)	60(55-67)	67(67-67)	43.5(36-51)
Peso (kg), mediana (rango)	79 (60-90)	81(59-89)	76 (72-80)	72.5(50-95)
Meses luego del trasplante , Mediana (rango)	8(7-172)	10(6-192)	18-5(8-29)	22.5(6-39)
<b>Inmunosupresión</b>				
FK/MMF/Prednisona, n(%)	3(50%)	6(85.7%)	1(50%)	1(50%)
FK/Prednisona, n(%)	2(33.3%)	1(14.2%)	1(50%)	1(50%)
<b>Enfermedad de base</b>				
HCV (HCC), n(%)	4(44.4%)	4(44.4%)	1(50%)	0
HCV + Cirrosis Alcohólica, n(%)	2(22.2%)	2(22.2%)	1(50%)	1(50%)
Cirrosis criptogénica, n(%)	2(22.2%)	1(11.1%)	0	0
Otras, n(%)	1(11.1%)	2(22.2%)	0	1(50%)
<b>Parámetros cinéticos</b>				
Mediana de concentración de TAC (ng/ml), (rango)	5.9(2.1-9.7)	6(0.6-8.7)	7.3 (5.5-9.1)	7.4(5.8-9.1)
Mediana de concentración de TAC- XL (ng/ml), (rango)	6.6 (2.7-12)	5.3(1.9-10.3)	6.25(5.9-6.6)	8.3(5-11.7)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	128.6(41.1-171)	72.9(26.2-369.7)	185.8(44-327.6)	107(30.3-183.6)
Mediana de Co/dosis de TAC (ng/mL) (mg/kg/día)	140.2(48.6-360)	100.1(48.1-340)	142.4(47.2-237.6)	193.5(16.6-360.5)
Mediana de dosis de TAC (mg/kg/día)	0.47 (0.01-0.07)	0.04(0.02-0.14)	0.076(0.02-0.125)	0.16(0.31-0.3)
Mediana de dosis de TAC-XL (mg/kg/día)	0.47 (0.01-0.07)	0.04(0.02-0.14)	0.076(0.02-0.125)	0.16(0.31-0.3)

**Tabla 14.** Características demográficas y cinéticas según Genotipo ABCB1 2677G>T



**Evaluación de la correlación entre el polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A y los niveles de TAC en sangre de pacientes pediátricos trasplantados hepáticos**

Se evaluaron 77 pacientes pediátricos, menores de 18 años, medicados con TAC durante los primeros 2 años postrasplante. En la **tabla 15** se presentan las características de dicha población y en la **tabla 16** se presentan los principales desenlaces clínicos en la población estudiada.

<b>Característica</b>	<b>n(%)</b>
Niñas	46 (59.74)
Edad al trasplante ( años , ± DE)	5.32 (5.42)
Peso ( Kg , ± DE)	21.84(17.89)
Origen	
Argentina	64(83.11)
Bolivia	2(2.60)
Paraguay	9(11.69)
Otro	2(2.59)
<b>Enfermedad primaria</b>	<b>n(%)</b>
Atresia de vías biliares	32(41.55)
Hepatitis Fulminante	16(20.77)
Hepatitis Autoinmune	11(14.28)
Cáncer hepático	8(10.38)
Otros	10(12.98)
<b>Tipo de donante</b>	<b>n(%)</b>
Cadavérico	55(71.42)
Vivo	22(28.57)
<b>Tipo de injerto</b>	<b>n(%)</b>
Entero	26(33.76)
Variante técnica	51(66.23)
<b>PELD</b> , media(ds)	23.54(9,79)

**Tabla 15.** Características de la población de estudio (n=77)

Eventos	n(%)
<b>Resultados clínicos</b>	Eventos adversos asociados al Tacrolimus 45(58.44)
	Rechazo celular agudo n(tasa) 51(66.23)
	Complicaciones quirúrgicas n(tasa) 40 (51.95)
	Mortalidad 8 (10.39)
<b>Grado del severidad de los rechazos</b>	Leve 29 (37.66)
	Moderado 28 (36.36)
	Severo 11 (14.29)
	Crónico 2 (2.60)
<b>Tipo de Complicaciones quirúrgicas</b>	Biliar 20 (25.97)
	Obstruktiva 5 (7.79)
	Vascular 21(27.27)
<b>Eventos adversos asociados a Tacrolimus</b>	Hipomagnesemia 27 (35.06)
	Nefrotoxicidad 13 (16.88)
	PTLD 4(5.19)
	Otros 13 (16.88)

**Tabla 16.** Desenlaces clínicos de la población de estudio ( n=77)

64 muestras de receptores y 62 de donantes fueron recolectadas para genotipificación. Del restante grupo de pacientes no se pudo obtener una cantidad satisfactoria de ADN para genotipificación o correspondían a pacientes en quienes no se logró rescatar muestra o del donante o del receptor durante el trasplante .La frecuencia del polimorfismo en el intrón 3 de la isoforma CYP3A5 6986G>A en los receptores fue de 37.5% y en los donantes del 32.2%, **ver tabla 17.** No se evidenciaron desviaciones estadísticamente significativas en la distribución de los polimorfismos según la ley de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ).

<b>Genotipo del receptor</b>	<b>Alelo</b>	<b>n (%)</b>
CYP3A5	G/G (*3)	40 (62.50)
	A/G (*1)	24 (37.50)
<b>Genotipo del donante</b>		
CYP3A5	G/G (*3)	42 (67.74)
	A/G (*1)	20 (32.25)
<b>Genotipo del receptor</b>	<b>Genotipo del donante</b>	
A/G	A/G	11 (55.00)
	G/G	9 (45.00)
G/G	A/G	5(16.13)
	G/G	26(83.87)

**Tabla 17.** Distribución de genotipos de CYP3A5 según receptor, donante y combinación receptor-donante.

En total se analizaron 3670 muestreos plasmáticos de TAC durante el periodo de estudio, con un promedio de 47.8 muestras por paciente como se puede ver en la **tabla 18**.

<b>Datos farmacocinéticos</b>	<b>n(%)</b>
Numero de muestras	3679
Numero de muestras por paciente	47.8
Dosis(mg/kg/día)	0.13 (0.10)
Concentración de valle ( ng/ml)	6.77 (3.22)

**Tabla 18.** Datos de muestreo de TAC.

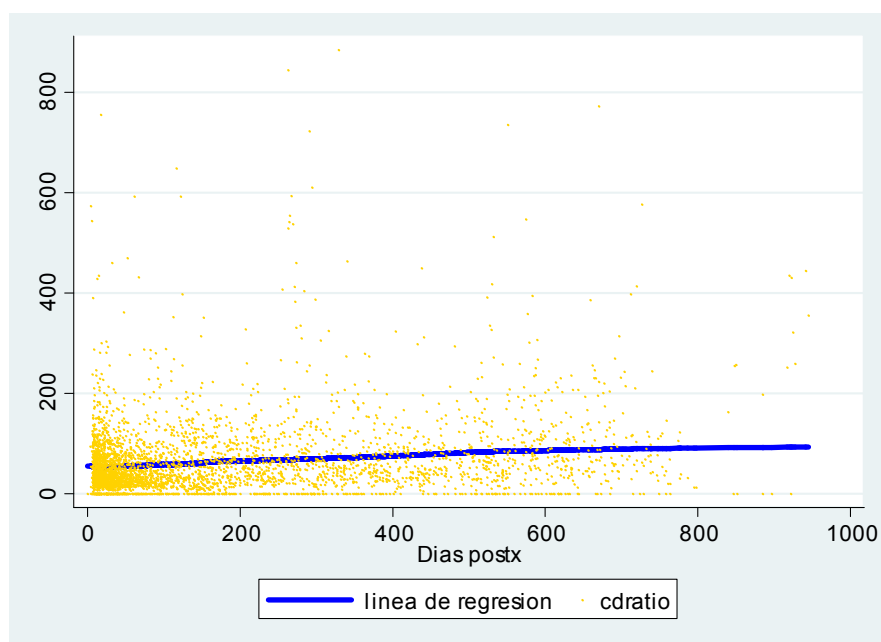
Se puede evidenciar que se presentaron diferencias en la Co/dosis según enfermedad primaria, incidencia de rechazo celular agudo, co-medicación con Fluconazol y genotipo del donante, ver **tabla 19**.

		Co (ng/ml)	Dosis (mg/kg/día)	Co/dosis (ng/mL) (mg/kg/día)
<b>Variable sociodemográficas</b>				
Sexo	Niños	6.89	0.14	57.79
	Niñas	6.69	0.11	74.95
Origen	Argentina	6.79	0.13	65.93
	Bolivia	6.39	0.13	63
	Paraguay	6.43	0.14	51.89
	Otro	8.34	0.09	85.86
	Atresia de vías biliares	6.6	0.13	59.69
Enfermedad primaria	Hepatitis Fulminante	7.03	0.12	<b>78.00 Δ</b>
	Hepatitis Autoinmune	6.95	0.11	<b>75.72 Δ</b>
	Cáncer hepático	6.77	0.09	68.21
	Otros	6.88	0.18	47.76
	Tipo de donante	Cadavérico	6.81	0.13*
Tipo de injerto	Vivo	6.66	0.12	61.29
	Entero	6.78	0.14	68.9
	Variante técnica	6.77	0.13	62.88
<b>Desenlaces clínicos</b>				
Rechazo celular agudo	Si	<b>6.89Δ</b>	0.13	<b>67.77Δ</b>
	No	6.39	0.15	54.4
Complicaciones post-operatorias	No	6.8	0.13	71.69
<b>Infecciones</b>				
CMV	Si	<b>6.63 Δ</b>	0.13	62.63
	No	6.95	0.13	67.03
EBV	Si	6.85	<b>0.14Δ</b>	66.08
	No	6.69	0.12	62.99
Infecciones bacterianas *	Si	<b>7.24 Δ</b>	0.13	<b>65.56 Δ</b>
	No	6.71	0.12	64.41
Fluconazol	Si	<b>6.75Δ</b>	<b>0.12Δ</b>	<b>64.45Δ</b>
	No	7.18	0.13	64.53
CYP3A5 donante	G/G	<b>6.21Δ</b>	<b>0.11 Δ</b>	<b>74.59Δ</b>
	G/A o A/A	7.03	0.17	44.37
CYP3A5 receptor	G/G	6.6	0.12	70.31
	G/A o A/A	6.6	0.15	57.38

Δ p<0.05, \*infección bacteriana: episodio de infección (meningitis, neumonía, infección urinaria, osteomielitis, peritonitis, bacteriemia, colangitis, etc) documentada por aislamiento bacteriológico y/o diagnóstico clínico que requirió manejo antibiótico endovenoso intrahospitalario por al menos 7 días.

**Tabla 19.** Diferencias en parámetros farmacocinéticos según covariables clínicas y genéticas.

La concentración ajustada por la dosis, tiene a aumentar a medida que transcurre los días postrasplante en 0.053 ug/dl/mg/dia, ver **figura 5**. Esto fue también evidenciado en trabajos previos, en pacientes postrasplante hepático, y es explicado por una conducta por parte del médico tratante en la cual tiende a dejar dosis fijas, y por más tiempo, en el paciente ambulatorio debido a la realización de una menor cantidad de monitoreo terapéutico, en comparación con el período de internación.



**Figura 5.** Comportamiento de la Co/dosis de TAC en función del tiempo.

## **Análisis de parámetros farmacocinéticos según genotipo del donante y receptor.**

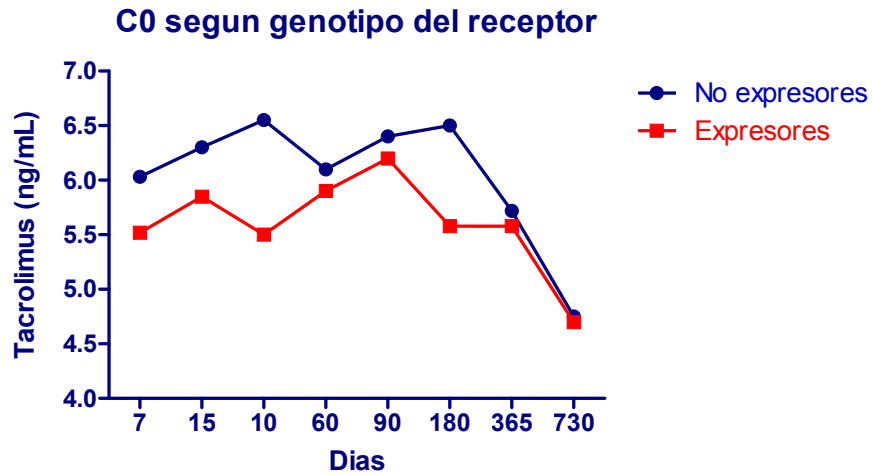
No se presentaron diferencias estadísticamente significativas en las características sociodemográficas y clínicas, según genotipo de CYP3A5 del donante o receptor, como se puede ver en la **tabla 20**.

<b>Variables demográficas</b>	<b>CYP3A5 donante</b>		<b>CYP3A5 receptor</b>	
	<b>G/G</b>	<b>G/A o A/A</b>	<b>G/G</b>	<b>G/A o A/A</b>
Niñas n(%)	24 (57.14)	14 (70.00)	24 (63.16)	12 (52.17)
Edad al trasplante ( años , ± DE)	5.45 (0.86)	4.16(0.96)	4.97(0.88)	6.56(1.15)
Peso ( Kg , ± DE)	22.6 (2.93)	17.3(2.92)	19.4(2.26)	27.3(4.88)
Origen n(%)				
Argentina	34 (80.95)	19 (94.74)	32 (84.21)	18 (78.26)
Bolivia	1 (2.38)	0	2 (5.26)	0
Paraguay	5(11.90)	1 (5.26)	3 (7.89)	4(17.39)
Otro	2 (4.76)	0	1(2.63)	1(4.35)
Enfermedad primaria n(%)				
Atresia de vías biliares	19 (45.24)	8 (40.00)	16 (42.11)	7(30.43)
Hepatitis Fulminante	8 (19.05)	6 (30.00)	6 (17.79)	6(26.09)
Hepatitis Autoinmune	6 (14.29)	1 (5.00)	6(15.79)	4(17.39)
Cáncer hepático	4 (9.52)	1 (5.00)	5(13.16)	2(8.70)
Otros	5 (11.90)	4 (20.00)	5(13.16)	4(17.39)
Tipo de donante n(%)				
Cadavérico	30 (71.43)	15 (75.00)	26 (68.42)	18 (78.26)
Vivo	12 (28.57)	5 (25.00)	12 (31.58)	5 (21.74)
Tipo de injerto n(%)				
Entero	14 (33.33)	5 (25.00)	12 (31,58)	9 (39.13)
Variante técnica	28 (66.67)	15 (78.95)	26 (68.42)	14 (60.87)
PELD (media± DE)	24 (1.72)	25 (3.02)	23.55(1.87)	22.6(1.95)

**Tabla 20.** Datos sociodemográficos y clínicos entre pacientes expresores y no expresores.

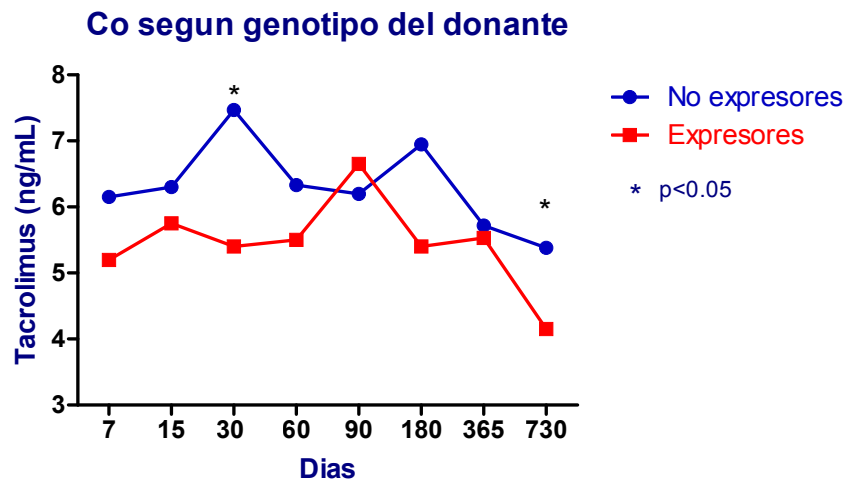
Se puede evidenciar que los pacientes **receptores expresores de CYP3A5** presentaron menores concentraciones plasmáticas de TAC especialmente en los primeros 15 días postoperatorios , periodo luego del cual dicha diferencia respecto

a los receptores no expresores fue disminuyendo, hasta ser mínima después del primer año luego del trasplante, ver **figura 6** .



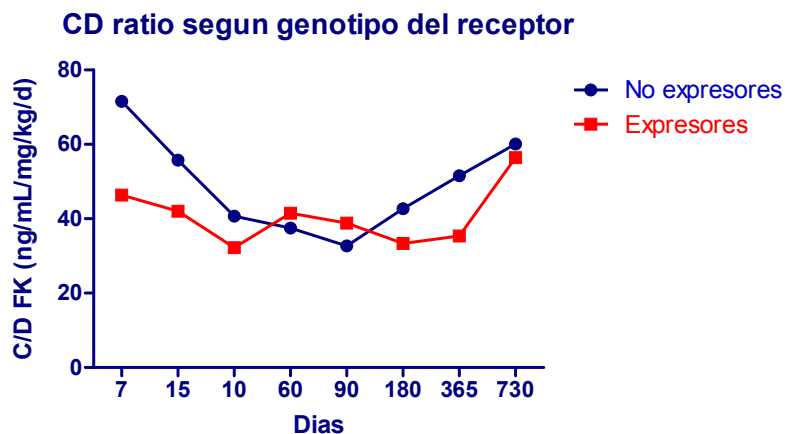
**Figura 6.** Comportamiento temporal de la Co de TAC según genotipo del receptor.

Los pacientes que **recibieron un órgano expresor** presentaron menores concentraciones plasmáticas de TAC con diferencias estadísticamente significativas al día 30, 180 y entre el primer a segundo año postquirúrgico **figura**



**Figura 7.** Comportamiento temporal de la Co de TAC según genotipo del donante

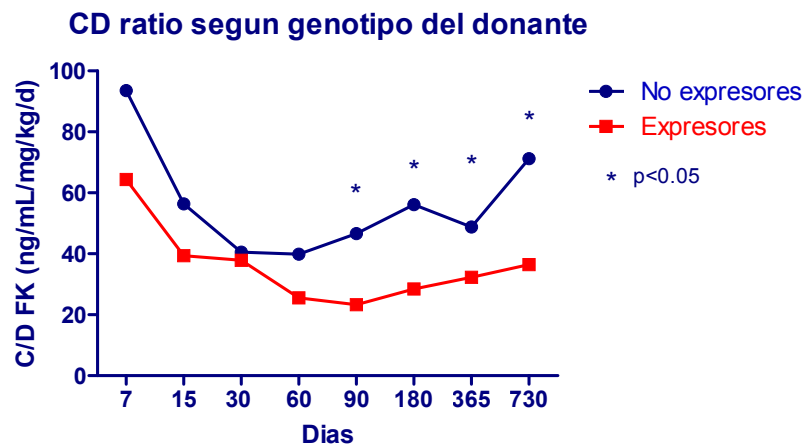
Así mismo al analizar las concentraciones ajustadas por dosis, se evidencia en **receptores expresores** mayores diferencias en las primeras dos semanas postquirúrgicas reduciéndose, al igual que ocurrió con la Co, dichas diferencias con el tiempo respecto a receptores no expresores de CYP3A5, **ver figura 8**.



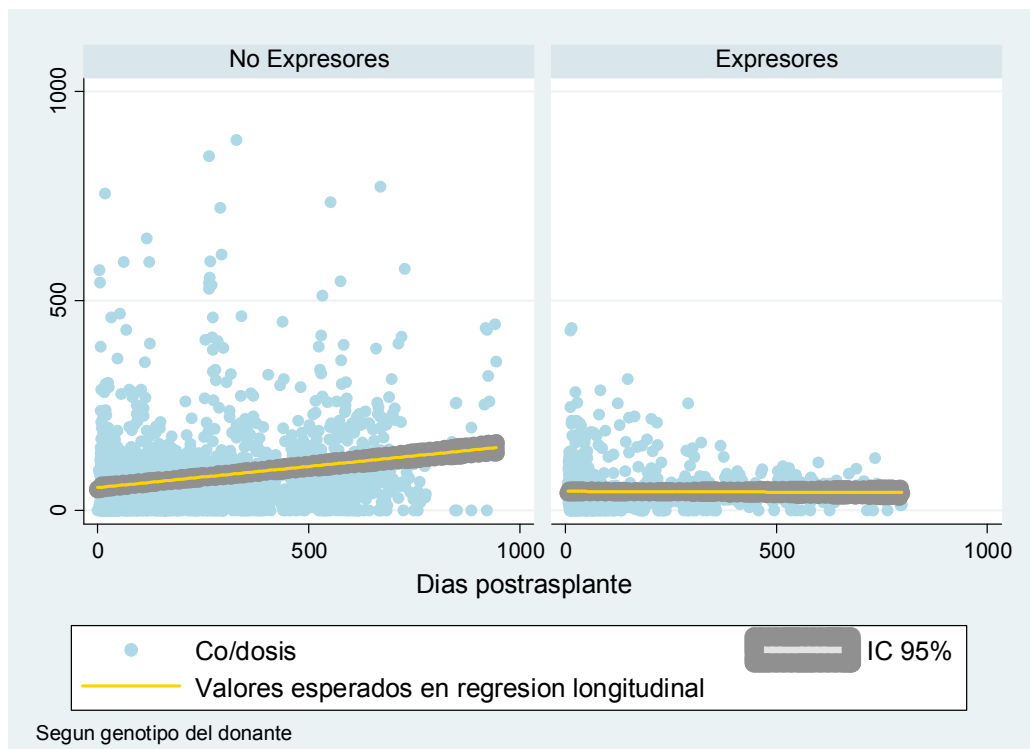
**Figura 8.** Comportamiento temporal de la Co/dosis de TAC según genotipo del receptor

Mientras en aquellos que **recibieron un órgano expresor** especialmente luego de los 90 días postquirúrgicos en las Co/dosis, presentan una reducción de Co/dosis de  $-0.00063$  ug/ml mg/kg/día respecto a los que recibieron un órgano no expresor ( $p=0.001$ ) **ver figura 9 y 10**.





**Figura 9.** Comportamiento temporal de la Co/dosis de TAC según genotipo del donante.



**Figura 10.** Comportamiento temporal de la Co/dosis de TAC según genotipo del donante.

Al analizar las diferencias en las dosis, se observan mayores requerimientos en los **receptores expresores** especialmente en el primer mes postrasplante respecto a los no expresores, sin alcanzar la significancia estadística. En aquellos que recibieron un **órgano expresor** presentaron mayores requerimientos de dosis especialmente luego del sexto mes postrasplante, siendo estas diferencias estadísticamente significativas, ver **tabla 21**.

Según genotipo del receptor	1 semana	2 semana	1 mes	2 mes	3 mes	6 mes	1 año	2 año
<b>Dosis diaria (mg/kg/d)</b>								
G/G	0.07(0.08)	0.12(0.11)	0.12(0.12)	0.14(0.1)	0.19(0.13)	0.11(0.13)	0.08(0.05)	0.07(0.04)
G/A o A/A	0.09(0.11)	0.15(0.14)	0.13(0.12)	0.14(0.13)	0.15(0.12)	0.16(0.09)	0.11(0.1)	0.07(0.04)
<b>Según genotipo del donante</b>								
<b>Dosis diaria (mg/kg/d)</b>								
G/G	0.08(0.08)	0.13(0.08)	0.13(0.1)	0.14(0.09)	0.15(0.1)	0.11(0.1)	0.09(0.06)	0.06(0.03)
G/A o A/A	0.07(0.07)	0.13(0.11)	0.11(0.14)	0.16(0.16)	0.19(0.29)	<b>0.20(0.19)*</b>	<b>0.11(0.14)*</b>	<b>0.09(0.08)*</b>

\*p<0.05 (Kruskal-Wallis)

**Tabla 21.** Distribución de dosis diaria de TAC según genotipo de receptor y donante.

Al analizar el efecto combinatorio de los genotipos de donante y receptor, aquellos pacientes que **recibieron un órgano expresor** y aquellos **receptores expresores que recibieron un órgano expresor**, presentaron menores concentraciones y concentraciones ajustadas por dosis de TAC respecto al resto de combinaciones, especialmente después de los 6 meses postquirúrgicos, ver **tabla 22**.

Receptor	Donante	1 semana	2 semana	1 mes	2 mes	3 mes	6 mes	1 año	2 año
<b>C0 FK (ng/mL)</b>									
G/G mediana(iqt)	G/G	7.3(6.3)	6.3(2.7)	6.7(2.65)	6.43(1.55)	6.2(4.4)	6.88(2.3)	6.07(2.07)	5(2.12)
	G/A o A/A	5.0(1.9)	7.67(6.47)	5.22(1.48)	4.22(2.75)	7.45(3.9)	5.45(3.05)	4.63(2.07)	3.33(2.08)
G/A o A/A mediana(iqt)	G/G	6.35(4.95)	6.9 (5,6)	8(4.45)	6.3(2.5)	7.42(4.05)	6.85(4.18)	5.1(2.9)	5.5(5.6)
	G/A o A/A	6.1(4.35)	5.6(2.55)	5.4(2.4)	5.8(2.1)	6.9(2.3)	6.15(2.1)	5.55(2.65)	4.5 (2.54)
<b>C/D (ng/mL/mg/kg/d)</b>									
G/G mediana(iqt)	G/G	101.22(93.3)	60.8(33.1)	40.42(51.12)	41.63(35.49)	37.82(68.28)	56.13(44.67)	51.54(40.67)	65.19(60.51)
	G/A o A/A	80.5(32.2)	96.8(177.13)	32.33(86.8)	33.85(67.92)	26.27(82.09)	<b>20.37(82.06)*</b>	37.2(62.18)	<b>36.15(48.1)*</b>
G/A o A/A mediana(iqt)	G/G	61.2(92.68)	62.31(41.19)	35.52(19.13)	36.09(37.26)	41.75(82.57)	49.7(77.17)	30.91(74.31)	80.38(81.23)
	G/A o A/A	45.97(73.28)	39.67(35.82)	38.86(26.82)	41.5(34.18)	38.93(26.03)	<b>30.54(23.39)*</b>	32.97(31.26)	<b>50.25(27.83)*</b>

\*p<0.05 (with Bonferroni's correction), iqt : rango intercuartilico

**Tabla 22.** Parámetros farmacocinéticos del TAC según combinaciones de genotipos entre receptor y donante.

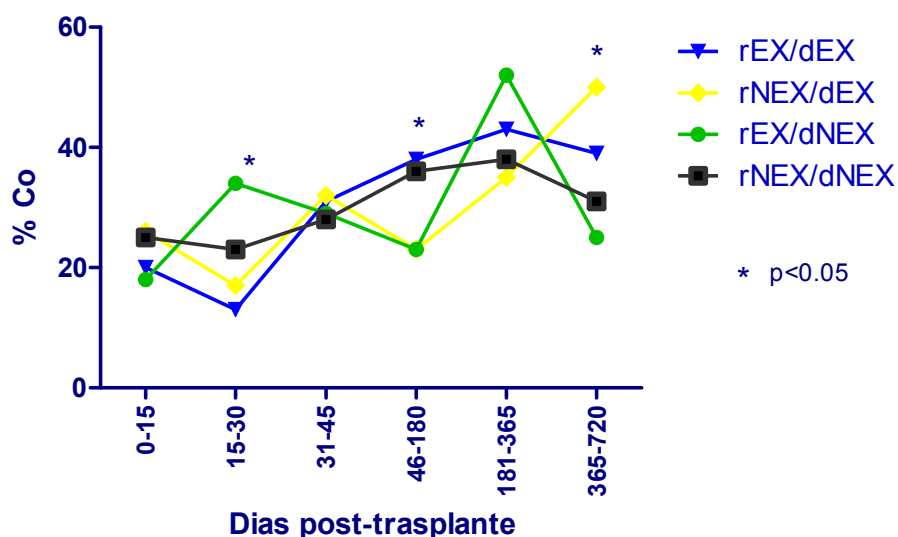
Aquellos pacientes receptores expresores que recibieron un órgano expesor presentaron una tendencia a tener mayores requerimientos de dosis en el tiempo, sin que dichas diferencias alcanzaran la significancia estadística, **ver tabla 23.**

Receptor	Donante	1 semana	2 semana	1 mes	2 mes	3 mes	6 mes	1 año	
<b>Dosis TAC(mg/kg/d)</b>									
G/G mediana(iqt)	G/G	0.07(0.09)	0.12(0.1)	0.12(0.12)	0.14(0.08)	0.18(0.1)	0.10(0.11)	0.09(0.05)	0.07(0.04)
	G/A o A/A	0.05(0.07)	0.09(0.1)	0.09(0.11)	0.11(0.17)	0.25(0.18)	0.25(0.19)*	0.08(0.12)	0.09(0.11)
G/A o A/A (mediana(iqt)	G/G	0.09(0.07)	0.12(0.11)	0.14(0.09)	0.14(0.11)	0.16(0.12)	0.12(0.09)	0.09(0.06)	0.06(0.02)
	G/A o A/A	0.09(0.05)	0.13(0.07)	0.11(0.12)	0.19(0.2)	0.19(0.2)	0.20(0.09)	0.11(0.12)	0.10(0.07)

**Tabla 23.** Parámetros farmacocinéticos del TAC según combinaciones de genotipos entre receptor y donante.

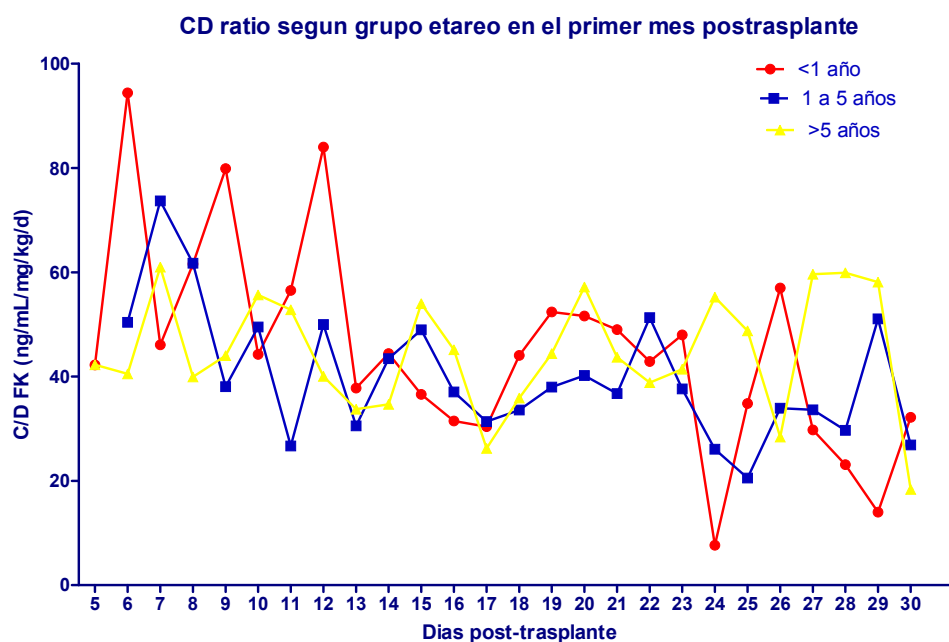
Al analizar el porcentaje de concentraciones Co de TAC que se mantuvieron dentro del rango terapéutico aquellos pacientes **receptores expresores** que recibieron también un **órgano expresor** fueron los que presentaron una mayor proporción de dosis fuera del rango terapéutico especialmente en los primeros 45 días postrasplante, seguido en frecuencia por del grupo de pacientes receptores no expresores que recibieron un órgano expresor. Ambos grupos de pacientes tienen a incrementar con el tiempo la cantidad de Co dentro del rango terapéutico con el tiempo, ver **figura 11**.

### % Concentraciones Co de TAC dentro del rango terapeutico



**Figura 11.** Porcentaje de Co de TAC dentro del rango terapéutico en el tiempo.  
**rEX:** receptor expresor. **rNEX:** receptor no expresor , **dEX:** donante expresor.  
**dNEX:** donante no expresor

Se observa que en pacientes menores de 1 año existe mayor variación en las concentraciones ajustadas por dosis durante el primer mes postrasplante respecto a los pacientes entre 1 a 5 años y mayores de 5 años, ver **figura 12**.



**Figura 12.** Co/dosis según grupo etareo en el primer mes postrasplante.

No se presentó mayor incidencia de rechazo celular agudo, complicaciones post-operatorias, reacciones adversas a TAC o muertes entre expresores y no expresores según genotipo del donante o receptor. Así mismo no se presentaron diferencias en la severidad de rechazos, tipo de complicaciones quirúrgicas, tipo de evento adverso asociado a TAC, parámetros de laboratorio clínico o incidencia de infecciones entre los expresores y no expresores, ver **tabla 24**.

Desenlaces clínicos	CYP3A5 donante		CYP3A5 receptor	
	G/G	G/A o A/A	G/G	G/A o A/A
Rechazo celular agudo	34 (80.95)	14 (73.68)	25 (64.16)	18 (75.00)
Complicaciones post-operatorias	22(52.38)	11(55.00)	17(42.50)	15(62.50)
Reacciones adversas a Tacrolimus	27(64.29)	12(60.00)	19(47.63)	18(74.91)
Mortalidad	2(4.79)	3(15.00)	4(10.26)	3(13.04)
<b>Grado del severidad de los rechazos</b>				
Leve	23 (54.76)	5(25.00)	17(44.74)	8(33.33)
Moderado	18(42.86)	7(35.00)	14(35.90)	10(42.63)
Severo	4(9.52)	5(25.00)	4(10.89)	4(16.39)
<b>Tipo de Complicaciones quirúrgicas</b>				
Biliar	12(28.57)	6(30.00)	8(20.68)	6(25.39)
Obstructiva	3(7.14)	3(15.00)	4(10.53)	2(8.70)
Vascular	12 (28.57)	4(21.05)	10(26.32)	9(39.13)
<b>Eventos adversos asociados a Tacrolimus</b>				
Hipomagnesemia	14(33.33)	8(36.84)	10(25.95)	11 (45.48)
Nefrotoxicidad	10 (32.81)	2(40.00)	7(18.42)	4 (17.39)
PTLD	3(7.14)	1(5.26)	4(10.53)	0
Otros	9(21.43)	3(15.79)	7(18.42)	4 (17.39)
<b>Laboratorio clínico</b>				
Hematocrito (%)	32.20(0.46)	31.34(0.67)	31.80(0.42)	32.19(0.70)
Albumina sérica (g/dl)	3.74(0.58)	3.56(0.08)	3.79(0.06)	3.74(0.10)
Bilirrubina total ( mg/dl)	3.38(0.41)	4.95(1.18)	4.01(0.64)	2.60(0.36)
GPT (U/l)	161.60(18.8)	134.55(10.1)	144.42(20.83)	171.94(42.38)
GOT (U/l)	158.9(43.35)	104.33(46.64)	138.39(45.89)	144.53(42.14)
g-Glutamyl transpeptidase (U/l)	194.47(23.4)	271.4(47.26)	194.47(23.49)	271.48(47.26)
Creatinina sérica (U/l)	0.47(0.031)	0.39(0.029)	0.44 (0.03)	0.49(0.043)
FAL	521.6(45.23)	536.44(56.24)	485.6(47.79)	447.6(59.9)
Nitrógeno Ureico en sangre (mg/dl)	38.45(1.73)	42.61(3.81)	40.09(1.91)	43.94(4.13)
<b>Infecciones</b>				
CMV	20 (47.62)	12(60.00)	21(55.26)	11 (45.48)
EBV	20(47.62)	9(45.11)	20(50.74)	12 (50.52)
Herpesvirus	4(9,52)	1(5.26)	5(12.53)	0
Infección Bacteriana Severa	32(76.19)	16(80.00)	30(78.95)	16(69.57)
Fluconazol	16(38.10)	10(52.63)	14(35.58)	10 (41.48)

**Tabla 24.** Desenlaces clínicos y de laboratorio según combinaciones de genotipos de receptor y donante.

**Modelo de regresión de características clínicas y genéticas asociadas a la Co/dosis.**

Para evaluar de forma exploratoria la asociación ajustada entre características clínicas y genéticas y las concentraciones ajustadas por dosis de TAC a lo largo de los dos años de seguimiento se utilizó un modelo de ecuaciones de estimación generalizadas. Luego del proceso de modelización utilizando técnica *backward*. Fueron retenidas en el modelo las variables donante expresor CYP3A5, edad, tratamiento con fluconazol, y días postrasplante, ver **tabla 25-27**.

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
Intercepto	3.90	3.70 4.10	0.001
Donante expresor CYP3A5	-0.36	-0.63 -0.08	0.009
Edad	0.03	0.006 0.05	0.014
Fluconazol	0.24	0.10 0.39	0.001
Días postrasplante	0.0008	$6 \times 10^{-3}$ $1 \times 10^{-3}$	0.001

**Tabla 25** Modelo global sin interacción.

Durante el proceso de modelización se observó la interacción estadísticamente significativa entre donante expresor CYP3A5 y tiempo, ver **tabla 26**.

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
Intercepto	3.85	3.65 4.06	0.001
Donante expresor CYP3A5	-0.21	-0.50 0.54	0.116
Edad	0.030	0.006 0.05	0.011
Fluconazol	0.25	0.11 0.39	0.001
Días postrasplante	0.001	$8 \times 10^{-4}$ $1 \times 10^{-2}$	0.001
<b>dExp*tiempo</b>	<b>-0.0009</b>	<b>-0.001 -0.005</b>	<b>0.001</b>

**Tabla 26.** Modelo global con interacción.

Dada la presencia de la interacción, el cual indica que la presencia de CYP3A5 en el órgano del donante se comporta como una variable modificadora del efecto en

la relación tiempo y Co/dosis, se reporta un modelo separado para aquellos que recibieron un órgano expresor de CYP3A5 y otro para aquellos no expresores, **ver tablas 27 y 28.**

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
Intercepto	3.63	3.28 3.98	0.001
Edad	0.043	-0.013 0.10	0.205
Fluconazol	0.02	-0.17 0.21	0.824
Días postrasplante	$1 \times 10^{-4}$	$3.1 \times 10^{-4}$ $3.0 \times 10^{-4}$	0.991

**Tabla 27.** Modelo en según genotipo donante expresores de CYP3A5

En pacientes que recibieron un órgano no expresor de CYP3A5 la Co/dosis aumenta de forma significativa con la edad, co-medicación con fluconazol y días postrasplante.

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
Intercepto	3.85	3.65 4.04	0.000
Edad	0.029	0.0050 0.054	0.018
Fluconazol	0.34	0.15 0.53	0.000
Días postrasplante	$1 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-3}$ $1 \times 10^{-3}$	0.000

**Tabla 28 .** Modelo en según genotipo donante no expresores de CYP3A5



## Discusión

En el presente trabajo mediante distintas aproximaciones, y en distintas poblaciones, se evidencia de forma consistente el impacto diferencial en el tiempo de la presencia de polimorfismos del CYP3A5 en la farmacocinética del tacrolimus. A diferencia de los trabajos previos realizados en periodos cortos de seguimiento y generalmente en población no hispana, este es el primer trabajo que en población pediátrica trasplantada hepática evalúa el efecto a dos años de dichos polimorfismos así como el primero en población trasplantada hepática adulta en Latinoamérica; evaluando no solo el efecto de los polimorfismos por separado presentes en el donante y receptor, sino también su papel combinatorio o interactuante en los parámetros cinéticos del TAC.

El CYP3A5 (rs776746) es una variación A/G que ocurre en el intron 3 del gen del CYP3A5 en el cromosoma 7. Pacientes con al menos un alelo A en el CYP3A5 (rs776746) (CYP3A5\*1 o *wild type*) tienen un corte y empalme normal de los 13 exones de este gen; resultando en un transcripto normal y produciendo altos niveles de mRNA y por consiguiente de enzima metabolizadora de TAC. Los pacientes con CYP3A5 alelo G (CYP3A5\*3) tienen una mutación puntual (A/G) resultando en la inserción de un 'exon' inapropiado 3B dentro del transcripto. Este exón introduce un codón de terminación temprano, resultando en un fragmento proteico no funcional (Kuehl, Zhang et al. 2001).

La frecuencia de expresores (CYP3A5\*1) en nuestro estudio se encuentra en un valor intermedio entre lo publicado en población asiática (33% al 66%) y caucásica (9 al 15%). oscilando entre el 17% (receptores adultos) al 37% (receptores pediátricos). Dichas estimaciones concuerdan con resultados previos en estudios en pacientes argentinos adultos (Lavandera J 2010) (Larriba, Imperiali et al. 2010) y trasplantados renales pediátricos (Ferraris, Argibay et al. 2011) los cuales reportaron valores entre 9% al 27%.

En trabajos previos también se han observado diferencias en la frecuencia de mutaciones en el gen EGFR en la población Latinoamericana (asociados a respuesta a inhibidores de tirosin-quinasa de pacientes con cáncer de pulmón), en comparación con la frecuencia reportada para la población caucásica o asiática. Estos valores intermedios, entre la frecuencia caucásica y asiática, pueden revelar la diversidad genética presente en Latinoamérica (Arrieta, Cardona, Bramuglia y col. 2011); la cual es un producto de la convergencia de distintas poblaciones: desde las precolombinas, caucásicos europeos (presentes desde la etapa colonial), africanos (esclavos hasta el siglo 19), e inmigrantes de finales del siglo XIX y primera mitad del siglo XX (la mayoría de España, Italia, Francia, Europa del este). Dicha diversidad en la población suramericana, manifestada por la frecuencia de polimorfismos en valores intermedios entre población caucásica y asiática o africana, también se presenta en estudios farmacogenéticos en genes involucrados en el metabolismo de diversos antineoplásicos como CYP2A6 ,

CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, CYP1A1, CYP2C9, CYP1A1\*2C,

CYP1A2\*1F, CYP3A4\*1B, CYP2D6\*2 (Roco A , Quiñones L et al. 2012). A pesar

que ni el nuestro ni los estudios previos en población argentina tienen como objetivo primario establecer una prevalencia poblacional de expresores CYP3A5, sí colocan de manifiesto la importancia y necesidad de estudios farmacogenéticos en población argentina y latinoamericana , que permitan mejorar la comprensión de las bases en las variaciones étnicas en el metabolismo y el efecto de distintos medicamentos; y de esta forma no continuar extrapolando resultados obtenidos de otras poblaciones los cuales llevan o pueden llevar a estimaciones inexactas.

En pacientes luego del trasplante hepático, tanto polimorfismos del CYP3A5 del donante como del receptor son asociados con cambios en la farmacocinética del TAC. Sin embargo, el papel que juega cada polimorfismo es distinto según avanzan los días luego del trasplante.

Evidenciamos que el genotipo CYP3A5 del **receptor** podría jugar un papel más importante que el genotipo del **donante** en etapas tempranas tanto en población adulta como en pediátrica. Al meta-analizar la evidencia proveniente de 8 estudios, con 694 pacientes adultos, se observa menores dosis y Co/dosis en **receptores** expresores, respecto a los no expresores, de CYP3A5 en los primeros **60** días post-trasplante.

Este hallazgo fue consistente también en los 24 pacientes adultos estudiados donde no se observó efecto de la expresión de CYP3A5 en el **receptor** a los 6 meses post-trasplante. En población pediátrica los receptores expresores presentaron menores concentraciones plasmáticas de TAC, concentraciones ajustadas por dosis especialmente en los primeros 15 días postoperatorios, minimizándose dichas diferencias luego de este periodo de tiempo. Estos hallazgos concuerdan con un reciente estudio realizado por Uesugi (Uesugi, Kikuchi et al. 2014) en el cual evaluó el impacto del CYP3A5 en las primeras 5 semanas post-trasplante en 410 adultos trasplantados hepáticos. Este estudio revela que en pacientes **receptores expresores** presentaron significativamente ( $p < 0.001$ ) menores Co/dosis, respecto a receptores no expresores, independiente del genotipo del hígado del donante en las primeras semanas postrasplante. Inclusive dichas diferencias son más marcadas en las primeras dos semanas postrasplante ( $p = 0.035$ ), tal como se expone en el estudio de Wang (2014), en un estudio en 96 adultos trasplantados hepáticos, periodo luego del cual se reducen las diferencias en la Co/dosis entre receptores expresores y no expresores, y pierden significancia estadística ( $p = 0.08$ ) (Wang, Wu et al. 2014). Este panorama no es muy distinto también al que ocurre en población pediátrica. Un estudio reciente en 64 niños postrasplante hepático, con seguimiento durante 1 año, evidencia menores concentraciones ajustadas por dosis ( $p < 0.05$ ) en receptores expresores, independiente del genotipo del donante, especialmente en los

primeros 7 días postrasplante (Xue, Han et al. 2014). En vista de nuestros resultados tanto en población adulta como pediátrica, y lo reportado por otros autores proponemos que el genotipo CYP3A5 del receptor tendría un rol preponderante en las primeras semanas postrasplante, periodo en el cual el conocimiento de dicha información puede llegar a ser útil con el fin de evitar aumentos excesivos de dosis en pacientes receptores con la expresión de este genotipo y efectos secundarios asociados a la misma (Chen, Li et al. 2013).

A diferencia de la expresión de CYP3A5 en el receptor, el papel del genotipo del **donante** en la cinética del TAC se incrementa con el tiempo postrasplante. El efecto de la expresión de CYP3A5 en el receptor, especialmente el dado por depuración intestinal, es contra-balanceada, a medida que transcurren las semanas postrasplante por el incremento en la depuración hepática del hígado implantado. Esta tendencia fue evidenciada al meta-analizar los estudios en población adulta, donde la diferencia de medias estandarizada de la Co/dosis era creciente especialmente luego de los 90 días postrasplante. Dicho hallazgo se constató en los pacientes adultos a los 6 meses post-trasplante, en los cuales se encontraron no solo diferencias significativas según el genotipo del donante en las dosis de TAC y TAC-XL sino también en las concentraciones ajustadas por dosis luego de este periodo. En población pediátrica se documentó también un aumento en los requerimientos de dosis, una reducción de concentraciones y concentraciones ajustadas por dosis, estadísticamente significativa especialmente luego de los 60 a 90 días postquirúrgicos. Este papel creciente del genotipo del donante en el tiempo podría explicarse por la recuperación de la injuria de isquemia y reperfusión, regeneración y crecimiento del injerto a medida que transcurre los meses postrasplante (Starkel, Laurent et al. 2000). Estos resultados remarcan la importancia de conocer el genotipo del órgano a ser implantado, especialmente durante el seguimiento ambulatorio, información la cual puede ser importante con el fin de seleccionar pacientes que a priori tendrán por su mayor depuración hepática, menores concentraciones y los cuales pueden requerir un seguimiento y acompañamiento más cercano con el fin de evitar la sub-inmunosupresión.

Se evidencio que la concentración ajustada por la dosis, tiene a aumentar a medida que transcurre los días postrasplante. Este aumento encontrado puede ser debido al monitoreo cada vez más espaciado durante los controles ambulatorios con lo cual los pacientes tienen mayor probabilidad de estar sobredosificados debidos al retraso en el ajuste de las dosis según los niveles de TAC del monitoreo terapéutico (Jalil, Hawwa et al. 2014); más aun teniendo en cuenta que la gran mayoría de la población aquí estudiada no vive en Buenos Aires y proviene de otras ciudades o provincias. Sin embargo este efecto fue más marcado en los receptores de hígados no expresores respecto a los receptores de hígados expresores; debido a la mayor tasa de depuración hepática de TAC de estos últimos. Lo cual vuelve y coloca de manifiesto la importancia que tendría el conocer el genotipo con el fin de evitar la sub-inmunosupresión en los que reciben un órgano expresor o la sobre-inmunosupresión en aquellos que reciben un órgano no expresor si no se realiza un seguimiento personalizado.

Estudios en pacientes renales demostraban mayores concentraciones ajustadas por dosis en pacientes con la variante genotípica ACBB1 1236CT o TT comparados con aquellos CC luego de un mes postrasplante; siendo este hallazgo consistente con una posible mayor actividad funcional de la PGP en pacientes con la variante genotípica (CT o TT) (Anglicheau, Flamant et al. 2003) (Singh, Srivastava et al. 2011). Así mismo pacientes con la variante alélica ABCB1 2677GT o TT, comparados con el genotipo GG, presentaban mayores Co/dosis en trasplantados de pulmón (Zheng, Zeevi y col. 2004), y renales (Min y Ellingrod 2003, Li Zhang y col. 2007); hallazgo relacionado con una posible menor actividad funcional de la PGP en estas portadores de dichas variantes. En nuestro estudio encontramos que existiría poca influencia de los polimorfismos en los alelos del ABCB1 1236C<T y 2677G>T en las concentraciones, dosis y Co/dosis de TAC y TAC-XL en pacientes adultos en fase estable.

Al analizar el genotipo ACBB1 1236C<T, los pacientes quienes expresaron la variante alélica (T/T o C/T) presentaron menores concentraciones ajustadas por dosis y mayores requerimientos de dosis de TAC y TAC-XL, respecto a los expresores *wild type* (C/C) aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Así mismo, al analizar los pacientes según el genotipo ABCB1 2677G>T no se evidenciaron diferencias entre aquellos con variantes alélicas (G/T, TT, G/A&T/A) frente aquellos con variante *wild type* (GG). Si bien nuestros resultados pueden ser debidos al bajo tamaño muestral, no son muy distintos al estudios previos publicados; donde el papel de dichos polimorfismos permanece incierto dado que son más los estudios que han fallado en encontrar algún tipo de asociación frente a los que han encontrado alguna relación débil (Staatz CE 2004) tanto para el caso de ABCB1 1236C<T (Tanabe, Ieiri et al. 2001) (Op den Buijsch, Christiaans et al. 2007) (Haufroid, Mourad et al. 2004) (Mourad, Mourad et al. 2005, Fredericks, Moreton et al. 2006, Mourad, Wallemacq et al. 2006) (Cheung, Op den Buijsch et al. 2006) (Choi, Lee et al. 2007) (Haufroid, Wallemacq et al. 2006) , como para ABCB1 2677G>T (Tanabe, Ieiri et al. 2001) (Haufroid, Mourad et al. 2004) (Mourad, Wallemacq et al. 2006) (Roy, Barama et al. 2006) (Renders, Frisman et al. 2007) (Mourad, Mourad et al. 2005) (Tsuchiya, Satoh et al. 2004) (Li, Lu et al. 2007) (Choi, Lee et al. 2007) (Haufroid, Wallemacq et al. 2006) (Goto M 2004). Así mismo un reciente estudio en 216 pacientes adultos trasplantados hepáticos, al analizar las Co/dosis según genotipo ABCB1 1236C<T no encontró diferencias estadísticamente significativas en la Co/dosis entre las variantes alélicas CT, TT (Shi, y col 2013). Estos hallazgos sugieren que no habría una asociación entre los polimorfismos del ABCB1 y la farmacocinética del TAC en la población estudiada.

Es esencial identificar covariables que puedan explicar la variabilidad del TAC, y que permitan de esta manera ayudar a los clínicos en adaptar y anticipar la posología. En nuestro estudio identificamos que no solo la presencia de CYP3A5 reduce las Co/dosis, sino que este efecto es diferencial en el tiempo, y que

distintas variables influyen en la manera en que dicha expresión modifica las concentraciones ajustadas por dosis en el tiempo.

En pacientes que reciben un órgano no expresor, las variables condicionantes de la Co/dosis fueron la edad, la co-medicación con fluconazol y los días postrasplante. En el caso de la edad se observó menores concentraciones ajustadas por dosis a menor edad, inclusive con alta variabilidad en los menores de 1 año. Este efecto posiblemente es secundario a una mayor depuración de TAC a menor edad (Durand, Debray et al. 2013). Así mismo esta mayor actividad puede ser a expensas de una mayor expresión intestinal de CYP3A5, respecto a la hepática, en niños (Fakhoury, Litalien et al. 2005) y a la presencia de otras isoenzimas del CYP3 en los primeros meses como la CYP3A7 e isoformas fetales de CYP3A4 en menores de 6 meses (van den Anker, Schwab et al. 2011).

El Fluconazol es un imidazol hidrofílico que causa interacciones significativas con el TAC al ser también sustrato del CYP3A4 y CYP3A5 reduciendo la depuración de TAC. En nuestro estudio el uso concomitante de Fluconazol se asoció con mayores concentraciones ajustadas por dosis y consecuentemente con mayores requerimientos de dosis de TAC pacientes. Este hallazgo concuerda con estudios previos en población trasplantada hepática en donde esta medicación puede reducir hasta en un 60% la depuración de TAC (Guy-Viterbo, Baudet et al. 2014). En este estudio realizado en 114 pacientes pediátricos trasplantados hepáticos, con mediada de edad de 1.32 años, encontramos que pacientes tratados con Fluconazol presentaban mayores Co/Dosis durante los primeros 30 días postrasplante. Al considerar el efecto del Fluconazol según el genotipo CYP3A5 del donante, encuentran justamente un factor de incremento de 0.292 ( $p < 0.001$ ) significativo en la Co/Dosis en los que recibieron órganos no expresores; mientras que en los que recibieron órganos expresores dicho incremento no fue significativo (0.202,  $p = 0,279$ ). Nuestro estudio con un periodo de seguimiento más prolongado (1 mes vs 2 años), encuentra el mismo resultado al evidenciar un efecto diferencial de la administración concomitante de Fluconazol y la Co/dosis según el genotipo del donante. En aquellos que reciben **órganos no expresores** la Co/dosis se

incrementa con la administración concomitante de Fluconazol (0.33,  $p=0.000$ ) mientras que en aquellos que reciben **órganos expresores** dicho aumento no fue significativo (0.31,  $p=0.751$ ). Esta menor susceptibilidad al efecto inhibitorio del Fluconazol en el metabolismo del TAC -en aquellos que reciben un **órgano CYP3A5 expresor** -ha sido reportado no solo asociado a la Co/dosis sino también en los requerimientos de dosis diaria de TAC en trasplantados hepáticos (Durand, Debray et al. 2013) y renales (Kuypers, de Jonge et al. 2008). Esta reducida susceptibilidad del efecto inhibitorio del Fluconazol en el metabolismo del TAC en órganos expresores de CYP3A5 es acorde con resultados obtenidos *in vitro* en los cuales el Fluconazol es un inhibidor más potente (constante de inhibición o  $K_i$  9 veces mayor) para CYP3A4 respecto al CYP3A5 (Gibbs, Thummel et al. 1999), por lo cual su efecto en expresores no es tan marcado. Este efecto tiende a ser más marcado en expresores debido además a la mayor cantidad y actividad de CYP3A5 proporcional respecto a la CYP3A4 (las concentraciones de mRNA intestinal son 140 veces superiores en los expresores frente a los no expresores) (Kuypers, de Jonge et al. 2008) la cual como se menciona es menos susceptible al efecto inhibitorio del Fluconazol. Todo lo anterior explica el por qué concentraciones ajustadas por dosis no incrementan significativamente durante la inhibición con Fluconazol, causando cambios no significativos en los requerimientos de TAC. El genotipo no expresor, entonces, parece ser más susceptible a la inhibición inducida por el Fluconazol en el metabolismo del TAC, resultando no solo en mayores dosis y exposición las cuales pueden ser supra terapéuticas.

Si bien en el análisis bivariado evidenciamos mayores concentraciones y concentraciones ajustadas por dosis en pacientes con rechazo celular agudo durante el periodo de seguimiento, dicha variable no asocio ni a la presencia de CYP3A5 ni a las Co/dosis en el modelo multivariado, hallazgos también documentados previamente donde se evidencia la falta de relación significativa entre rechazo y genotipo. (Staatz CE 2004).



Nuestro estudio tiene limitaciones, principalmente dada la naturaleza retrospectiva entre las cuales se encuentran sesgos por mal-clasificación de pacientes ya sea por sesgo de memoria o problemas de registro de información en historias clínicas por información omitida o mal registrada en dichos documentos; sesgos los cuales son inherentes al diseño de estudio y que trataron de ser minimizados obteniendo siempre información a partir de registros primarios (historia clínica física o electrónica) y en caso de datos faltantes o no coherentes se contrastó con otros registros clínicos (registros de enfermería, farmacia hospitalaria). Así mismo, dado el carácter exploratorio del modelo de regresión al solo analizar un punto de concentraciones (C<sub>0</sub>) en el tiempo dado que se usan datos de monitoreo hospitalario rutinario de medicamentos; las asociaciones multivariadas encontradas entre edad, Fluconazol, genotipo CYP3A5 del donante, y duración del evento con las concentraciones ajustadas por dosis, deben ser confirmadas por modelos farmacocinéticos poblacionales en estudios posteriores.

En conclusión, en pacientes luego del trasplante hepático, tanto polimorfismos del CYP3A5 del donante como del receptor son asociados con cambios en la farmacocinética del TAC. Sin embargo, el papel que juega cada polimorfismo es distinto según avanzan los días luego del trasplante y deben ser tenidos en cuenta con el fin de optimizar los beneficios del TAC durante la fase de inducción y mantenimiento postrasplante.

## Bibliografía

Anglicheau, D., M. Flamant, M. H. Schlageter, F. Martinez, B. Cassinat, P. Beaune, C. Legendre and E. Thervet (2003). "Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **18**(11): 2409-2414.

Arrieta, O., A. F. Cardona, G. Federico Bramuglia, A. Gallo, A. D. Campos-Parra, S. Serrano, M. Castro, A. Aviles, E. Amarin, R. Kirchuk, M. Cuello, J. Borbolla, O. Riemersma, H. Becerra, R. Rosell and ClicaP (2011). "Genotyping non-small cell lung cancer (NSCLC) in Latin America." J Thorac Oncol **6**(11): 1955-1959.

Balss, K. M., C. T. Avedisian, R. E. Cavicchi and M. J. Tarlov (2005). "Nanosecond imaging of microboiling behavior on pulsed-heated au films modified with hydrophilic and hydrophobic self-assembled monolayers." Langmuir **21**(23): 10459-10467.

Barrera-Pulido, L., I. Aguilera-Garcia, F. Docobo-Perez, J. M. Alamo-Martinez, F. Pareja-Ciuro, A. Nunez-Roldan, M. A. Gomez-Bravo and A. Bernardos-Rodriguez (2008). "Clinical Relevance and Prevalence of Polymorphisms in CYP3A5 and MDR1 Genes That Encode Tacrolimus Biotransformation Enzymes in Liver Transplant Recipients." Transplantation Proceedings **40**(9): 2949-2951.

Bekersky I, D. D., Mekki Q. (2001). "Effect of time of meal consumption on bioavailability of a single oral 5mg tacrolimus dose. ." J Clin Pharmacol **41**(3): 289-297.

Bekersky I, D. D., Mekki QA (2001). "Effect of low- and high-fat meals on tacrolimus absorption following 5mg single oral doses to healthy human subjects." J Clin Pharmacol **41**(2): 176-182.

Benet LZ, I. T., Zhang Y, et al. (1999). "Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery." J Control Release **62** (1-2): 25-31.  
Beysens AJ, W. R., Beuman GH, et al (1991). "FK 506: monitoring in plasma or in whole blood?" Transplant Proc **23**(6): 2745-2747.

Cummins, C. L., W. Jacobsen and L. Z. Benet (2002). "Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4." J Pharmacol Exp Ther **300**(3): 1036-1045.

Chen, S. Y., J. L. Li, F. H. Meng, X. D. Wang, T. Liu, J. Li, L. S. Liu, Q. Fu, M. Huang and C. X. Wang (2013). "Individualization of tacrolimus dosage basing on cytochrome P450 3A5 polymorphism - a prospective, randomized, controlled study." Clin Transplant **2013**(24): 12101.

Chen, Y.-I. and W.-M. Lin (2013). "Statistical model and inference for pharmacokinetic data." Journal of Statistical Computation and Simulation **84**(12): 2607-2618.

Cheung, C. Y., R. A. Op den Buijsch, K. M. Wong, H. W. Chan, K. F. Chau, C. S. Li, K. T. Leung, T. H. Kwan, J. E. de Vrie, P. A. Wijnen, M. P. van Dieijen-Visser and O. Bekers (2006). "Influence of different allelic variants of the CYP3A and ABCB1 genes on the tacrolimus pharmacokinetic profile of Chinese renal transplant recipients." Pharmacogenomics **7**(4): 563-574.

Choi, J. H., Y. J. Lee, S. B. Jang, J. E. Lee, K. H. Kim and K. Park (2007). "Influence of the CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Korean subjects." Br J Clin Pharmacol **64**(2): 185-191.

Christiaans M, v. D. E., Beysens T, et al. (1998). "Effect of breakfast on the oral bioavailability of tacrolimus and changes in pharmacokinetics at different times posttransplant in renal transplant recipients." Transplant Proc **30**(4): 1271-1273.

Christians U, B. F., Schmidt M, et al. (1992). "Specific and sensitive measurement of FK506 and its metabolites in blood and urine of liver-graft recipients." Clin Chem **38**(10): 2025-2032.

Christians, U. and K. F. Sewing (1995). "Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity." Clin Biochem **28**(6): 547-559.

Christians, U., T. Strom, Y. L. Zhang, W. Steudel, V. Schmitz, S. Trump and M. Haschke (2006). "Active drug transport of immunosuppressants: new insights for pharmacokinetics and pharmacodynamics." Ther Drug Monit **28**(1): 39-44.

Dai, Y., M. F. Hebert, N. Isoherranen, C. L. Davis, C. Marsh, D. D. Shen and K. E. Thummel (2006). "Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro." Drug Metab Dispos **34**(5): 836-847.

de Waziers I, C. P., Yang CS, et al (1990). "Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues." J Pharmacol Exp Ther **253**(1): 387-394.

Durand, P., D. Debray, M. Kolaci, J. Bouligand, V. Furlan, M. Fabre, A. Letierce, C. Verstuyft and L. Becquemont (2013). "Tacrolimus dose requirement in pediatric liver transplantation: influence of CYP3A5 gene polymorphism." Pharmacogenomics **14**(9): 1017-1025.

Evans, W. E. and H. L. McLeod (2003). "Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects." N Engl J Med **348**(6): 538-549.

Fakhoury, M., C. Litalien, Y. Medard, H. Cave, N. Ezzahir, M. Peuchmaur and E. Jacqz-Aigrain (2005). "Localization and mRNA expression of CYP3A and P-glycoprotein in human duodenum as a function of age." Drug Metab Dispos **33**(11): 1603-1607.

Ferraris, J. R., P. F. Argibay, L. Costa, G. Jimenez, P. A. Coccia, L. F. Ghezzi, V. Ferraris, W. H. Belloso, M. A. Redal and J. M. Larriba (2011). "Influence of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus maintenance doses and serum levels after renal transplantation: age dependency and pharmacological interaction with steroids." Pediatr Transplant **15**(5): 525-532.

First MR (2008). "First Clinical Experience With the New Once-Daily Formulation of Tacrolimus." Therapeutic Drug Monitoring. **30**: 159-166.

Fitzsimmons WE, B. I., Dressler D, et al. (1998). "Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics." Transplantation Proceedings **30**(4): 1359-1364.

Florman S, A. R., Kalayoglu M, et al. (2005). "Conversion of stable liver transplant recipients from a twice-daily Prograf-based regimen to a once daily modified release tacrolimus-based regimen. ." Transplant Proc. **37**: 1211-1213.

Fredericks, S., M. Moreton, S. Reboux, N. D. Carter, L. Goldberg, D. W. Holt and I. A. MacPhee (2006). "Multidrug resistance gene-1 (MDR-1) haplotypes have a minor influence on tacrolimus dose requirements." Transplantation **82**(5): 705-708.

Fromm, M. F. (2003). "Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans." Eur J Clin Invest **33 Suppl 2**: 6-9.

Fukudo, M., I. Yano, A. Yoshimura, S. Masuda, M. Uesugi, K. Hosohata, T. Katsura, Y. Ogura, F. Oike, Y. Takada, S. Uemoto and K. Inui (2008). "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 **18**(5): 413-423.

Gellner KR, E. R., Hustert E, et al. (2001). "Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. ." Pharmacogenetics **11**(2): 111-121.

Gibbs, M. A., K. E. Thummel, D. D. Shen and K. L. Kunze (1999). "Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of Ki values and impact of CYP3A5 expression." Drug Metab Dispos **27**(2): 180-187.

Goto M, M. S., Kiuchi T, et al. . (2004). "CYP3A5\*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. ." Pharmacogenetics. **14**: 471-478.

Gruber SA, H. J., Sorenson AL, et al (1994). "Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients awaiting renal transplantation." J Clin Pharmacol **34** (8): 859-864.

Guy-Viterbo, V., H. Baudet, L. Elens, V. Haufroid, F. Lacaille, M. Girard, D. Debray, C. Chardot, R. Reding, P. Wallemacq and F. Musuamba (2014). "Influence of donor-recipient CYP3A4/5 genotypes, age and fluconazole on tacrolimus pharmacokinetics in pediatric liver transplantation: a population approach." Pharmacogenomics **15**(9): 1207-1221.

Haufroid V, e. a. (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**: 147-154.

Haufroid, V., M. Mourad, V. Van Kerckhove, J. Wawrzyniak, M. De Meyer, D. C. Eddour, J. Malaise, D. Lison, J. P. Squifflet and P. Wallemacq (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.

Haufroid, V., P. Wallemacq, V. VanKerckhove, L. Elens, M. De Meyer, D. C. Eddour, J. Malaise, D. Lison and M. Mourad (2006). "CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms and tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant candidates: guidelines from an experimental study." Am J Transplant **6**(11): 2706-2713.

Heffron TG, P. M., Florman S, et al. (2007). "Once-daily tacrolimus extended-release formulation: 1-year post-conversion in stable pediatric liver transplant recipients. ." Am J Transplant.(7): 1609-1615.

Hesselink DA, v. S. R., van der Heiden IP, et al. (2003;). "Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. ." Clin Pharmacol Ther. **74**: 245-254.

Higgins JPT, G. S. (2011). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* T. C. Collaboration.

Hoffmeyer, S., O. Burk, O. von Richter, H. P. Arnold, J. Brockmoller, A. John, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum and U. Brinkmann (2000). "Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3473-3478.

Huang ML, V. R., Burckart GJ, et al. (1988). "Drug binding proteins in liver transplant patients." J Clin Pharmacol **28**(6): 505-506.

Jain AB, A.-E. K., Abdallah H, et al. (1993). "Pharmacokinetics of FK506 in liver transplant recipients after continuous intravenous infusion." J Clin Pharmacol **33**(7): 606-611.

Jalil, M. H., A. F. Hawwa, P. J. McKiernan, M. D. Shields and J. C. McElnay (2014). "Population pharmacokinetic and pharmacogenetic analysis of tacrolimus in paediatric liver transplant patients." Br J Clin Pharmacol **77**(1): 130-140.

Johnson C, A. N., Gonwa T, et al. (2000). "Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus cyclosporine (Neoral) with mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation." Transplantation **69**: 834-841.

Jun, K. R., W. Lee, M. S. Jang, S. Chun, G. W. Song, K. T. Park, S. G. Lee, D. J. Han, C. Kang, D. Y. Cho, J. Q. Kim and W. K. Min (2009). "Tacrolimus concentrations in relation to CYP3A and ABCB1 polymorphisms among solid organ transplant recipients in Korea." Transplantation **87**(8): 1225-1231.

Kapturczak M.H, M.-K. H. U., Kaplan B (2004). "Pharmacology of Calcineurin Antagonists." Transplantation Proceedings **36**( Suppl 2S), 25S232S).

Kroetz, D. L., C. Pauli-Magnus, L. M. Hodges, C. C. Huang, M. Kawamoto, S. J. Johns, D. Stryke, T. E. Ferrin, J. DeYoung, T. Taylor, E. J. Carlson, I. Herskowitz, K. M. Giacomini, A. G. Clark and I. Pharmacogenetics of Membrane Transporters (2003). "Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene." Pharmacogenetics **13**(8): 481-494.

Kuehl, P., J. Zhang, Y. Lin, J. Lamba, M. Assem, J. Schuetz, P. B. Watkins, A. Daly, S. A. Wrighton, S. D. Hall, P. Maurel, M. Relling, C. Brimer, K. Yasuda, R. Venkataramanan, S. Strom, K. Thummel, M. S. Boguski and E. Schuetz (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression." Nat Genet **27**(4): 383-391.

Kuehl P, Z. J., Lin Y, et al. (2001). "Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. ." Nat Genet **27**(4): 383-391.

Kuypers, D. R., H. de Jonge, M. Naesens and Y. Vanrenterghem (2008). "Effects of CYP3A5 and MDR1 single nucleotide polymorphisms on drug interactions between tacrolimus and fluconazole in renal allograft recipients." Pharmacogenet Genomics **18**(10): 861-868.

Lamba JK, L. Y., Schuetz EG, et al. (2002). "Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism." Adv Drug Deliv Rev **54**(10): 1271-1294.

Lamba JK, L. Y., Schuetz EG, et al. (2002). "Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism." Adv Drug Deliv Rev **54** (10): 1271-1294.

Lampen A, C. U., Guengerich FP, et al (1995). "Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability." Drug Metab Dispos **23** (12): 1315-1324.

Larriba, J., N. Imperiali, R. Groppa, C. Giordani, S. Algranatti and M. A. Redal (2010). "Pharmacogenetics of immunosuppressant polymorphism of CYP3A5 in renal transplant recipients." Transplant Proc **42**(1): 257-259.

Lavandera J, M. M., Parera V, Rossetti MV, Batlle A, Buzaleh AM (2010). Identificación de polimorfismos del CYP3A5 y CYP2B6 en infección por VIH asociada a Porfiria Cutánea Tardía en la población Argentina. Reunion Científica anual de la Sociedad Argentina de Investigacion Clinica ( SAIC), Sociedad Argentina de Investigacion Clinica ( SAIC).

Lefebvre, H. P., A. Cardona, P. L. Toutain, E. Morel, J. F. Bach and B. Vernet-der-Garabedian (1992). "A simple method for the quantitative evaluation of neuromuscular blockade in mice." J Pharmacol Toxicol Methods **27**(3): 129-133.

Li, D., W. Lu, J. Y. Zhu, J. Gao, Y. Q. Lou and G. L. Zhang (2007). "Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients." J Clin Pharm Ther **32**(5): 505-515.

Li, D., G. L. Zhang, Y. Q. Lou, Q. Li, X. Wang and X. Y. Bu (2007). "Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A5 and MDR1 haplotype in mainland Chinese Han, Uygur and Kazakh ethnic groups." J Clin Pharm Ther **32**(1): 89-95.

Lown KS, M. R., Leichtman AB, et al (1997). "Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine." Clin Pharmacol Ther **62**(3): 248-260.

Mancinelli LM, F. L., Floren LC, et al (2001). "The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: a comparison across ethnic groups." Clin Pharmacol Ther **69**(1): 24-31.

Martin SR, A. P., Anand R, Lindblad AS (2004). "Studies of pediatric liver transplantation 2002: Patient and graft survival and rejection in pediatric recipients of a first liver transplant in the United States and Canada " Pediatr Transpl **8**: 273-283.

Mekki Q, L. C., Carrier S, et al. (1993). "The effect of food on oral bioavailability of tacrolimus (FK506) in liver transplant." Clin Pharmacol Ther **53** (2): 229.

Min, D. I. and V. L. Ellingrod (2003). "Association of the CYP3A4\*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects." Ther Drug Monit **25**(3): 305-309.

Mittal N, T. J., Kato T, et al. (2001). "Tacrolimus and diarrhea:pathogenesis of altered metabolism." Pediatr Transplant **5**(2): 75-79.

Mourad, M., G. Mourad, P. Wallemacq, V. Garrigue, C. Van Bellingen, V. Van Kerckhove, M. De Meyer, J. Malaise, D. C. Eddour, D. Lison, J. P. Squifflet and V. Haufroid (2005). "Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids." Transplantation **80**(7): 977-984.

Mourad, M., P. Wallemacq, M. De Meyer, D. Brandt, V. Van Kerckhove, J. Malaise, D. Chaib Eddour, D. Lison and V. Haufroid (2006). "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 **44**(10): 1192-1198.

Muraki, Y., M. Usui, S. Isaji, S. Mizuno, K. Nakatani, T. Yamada, T. Iwamoto, S. Uemoto, T. Nobori and M. Okuda (2011). "Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients." Ann Transplant **16**(4): 55-62.

Murray M, G. T., Lever J, et al. (1998). "Comparison of tacrolimus absorption in transplant patients receiving continuous versus interrupted enteral nutritional feeding." Ann Pharmacother **32**(8): 633-636.

Nagashima, K., Y. Sato, H. Noma and C. Hamada (2013). "An efficient and robust method for analyzing population pharmacokinetic data in genome-wide pharmacogenomic studies: a generalized estimating equation approach." Stat Med **32**(27): 4838-4858.

Nakazawa Y, C. H., Ikegami T, et al (1998). "Relationship between in vivo FK506 clearance and in vitro 13-demethylation activity in living-related liver transplantation." Transplantation **66**(8): 1089-1093.

Olivera-Martinez, M. (2005). "Avances en inmunosupresión en trasplante hepático." Revista de Investigacion Clinica **57**(3): 237-243.



Op den Buijsch, R. A., M. H. Christiaans, L. M. Stolk, J. E. de Vries, C. Y. Cheung, N. A. Undre, J. P. van Hooff, M. P. van Dieijen-Visser and O. Bekers (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.

Provenzani, A., M. Notarbartolo, M. Labbozzetta, P. Poma, F. Biondi, R. Sanguedolce, G. Vizzini, U. Palazzo, P. Polidori, F. Triolo, B. Gridelli and N. D'Alessandro (2009). "The effect of CYP3A5 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on tacrolimus dose requirements in Caucasian liver transplant patients." Annals of Transplantation **14**(1): 23-31.

Rahsaz, M., N. Azarpira, S. Nikeghbalian, M. H. Aghdaie, B. Geramizadeh, M. Moini, M. Banihashemi, M. Darai, Z. Malekpour and S. A. Malekhosseini (2012). "Association between tacrolimus concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and ABCB1 during the early stage after liver transplant in an Iranian population." Exp Clin Transplant **10**(1): 24-29.

Renders, L., M. Frisman, M. Ufer, I. Mosyagin, S. Haenisch, U. Ott, A. Caliebe, M. Dechant, F. Braun, U. Kunzendorf and I. Cascorbi (2007). "CYP3A5 genotype markedly influences the pharmacokinetics of tacrolimus and sirolimus in kidney transplant recipients." Clin Pharmacol Ther **81**(2): 228-234.

Roco A , Quiñones L, Agundez JA , E. Garcia-Marti, Squicciarini V , Miranda C , Garay J , Farfan N , Saavedra I , Cacecers D , C. Ibarra and V. N. . (2012). "Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the Chilean population: comparison with Caucasian and Asian populations." Frontiers in Genetics **3**(229): 1-9.

Rojas, L. E., M. J. Herrero, V. Boso, M. Garcia-Eliz, J. L. Poveda, J. Librero and S. F. Alino (2013). "Meta-analysis and systematic review of the effect of the donor and recipient CYP3A5 6986A>G genotype on tacrolimus dose requirements in liver transplantation." Pharmacogenet Genomics **23**(10): 509-517.

Roy, J. N., A. Barama, C. Poirier, B. Vinet and M. Roger (2006). "Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients." Pharmacogenet Genomics **16**(9): 659-665.

Satoh S, T. H., Tachiki Y, et al. (2001). "Chrono and clinical pharmacokinetic study of tacrolimus in continuous intravenous administration." Int J Urol **8**(7): 353-358.

Singh, R., A. Srivastava, R. Kapoor and R. D. Mittal (2011). "Do drug transporter (ABCB1) SNPs influence cyclosporine and tacrolimus dose requirements and renal allograft outcome in the posttransplantation period?" J Clin Pharmacol **51**(4): 603-615.

Staatz CE, T. P., Lynch SV, Willis C, Charles BG, Tett SE (2001). "Population pharmacokinetics of tacrolimus in children who receive cut-down or full liver transplants." Transplantation **72**: 1056-1061.

Staatz CE, T. S. (2004). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation." Clin Pharmacokinet **43**: 623-653.

Starkel, P., S. Laurent, M. Petit, V. Van Den Berge, L. Lambotte and Y. Horsmans (2000). "Early down-regulation of cytochrome P450 3A and 2E1 in the regenerating rat liver is not related to the loss of liver mass or the process of cellular proliferation." Liver **20**(5): 405-410.

Taber DJ, D. R., Fann AL, et al (2002). "Tacrolimus dosing requirements and concentrations in adult living donor liver transplant recipients." Liver Transpl **8**(3): 219-223.

Tanabe, M., I. Ieiri, N. Nagata, K. Inoue, S. Ito, Y. Kanamori, M. Takahashi, Y. Kurata, J. Kigawa, S. Higuchi, N. Terakawa and K. Otsubo (2001). "Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene." J Pharmacol Exp Ther **297**(3): 1137-1143.

Thervet, E., D. Anglicheau, C. Legendre and P. Beaune (2008). "Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation." Ther Drug Monit **30**(2): 143-150.

Thervet E, e. a. (2008). " Role of Pharmacogenetics of Immunosuppressive Drugs in Organ Transplantation. ." Ther Drug Monit **30**: 143-150.

Tsuchiya, N., S. Satoh, H. Tada, Z. Li, C. Ohyama, K. Sato, T. Suzuki, T. Habuchi and T. Kato (2004). "Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients." Transplantation **78**(8): 1182-1187.

Uesugi, M., M. Kikuchi, H. Shinke, T. Omura, A. Yonezawa, K. Matsubara, Y. Fujimoto, S. Okamoto, T. Kaido, S. Uemoto and S. Masuda (2014). "Impact of cytochrome P450 3A5 polymorphism in graft livers on the frequency of acute cellular rejection in living-donor liver transplantation." Pharmacogenet Genomics **24**(7): 356-366.

Undre, N. (1999). "Pharmacokinetics of Tacrolimus: Clinically Relevant Aspects. ." Transplantation Proceedings, **31** ((Suppl 7A), 21S-24S ).

Undre, N. (2003). "Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies." Nephrol Dial Transplant **18** (Suppl 1:i12-5.).

Undre NA, S. A. (1998). "Factors affecting the pharmacokinetics of tacrolimus in the first year after renal transplantation. European Tacrolimus Multicentre Renal Study Group." Transplant Proc **30**(4): 1261-1263.

Utecht, K. N., J. J. Hiles and J. Kolesar (2006). "Effects of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors." Am J Health Syst Pharm **63**(23): 2340-2348.

van den Anker, J. N., M. Schwab and G. L. Kearns (2011). "Developmental pharmacokinetics." Handb Exp Pharmacol **205**: 51-75.

van den Berg AP, H. E., Gouw AS, et al (2001). "Recurrent HCV infection reduces the requirement for tacrolimus after liver transplantation." Transplant Proc **33**(1-2): 1467.

van Duijnhoven E, C. M., Schafer A, et al (1998). "Tacrolimus dosing requirements in diabetic and nondiabetic patients calculated from pretransplantation data." Transplant Proc **30**(4): 1266-1267.

Varela G , D. R., Hernandez A , Castañeda P, Fuentes V , Nieto J (2005). "Transplante Hepatico en Niños." Revista de Investigacion Clinica **57**(2): 273-282.

Venkataramanan R, S. A., Prasad T, et al (1995). "Clinical pharmacokinetics of tacrolimus." Clin Pharmacokinetics **29**((6)): 404-430.

Vincenti F, J. S., Filo R, et al. (2002;). " A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. ." Transplantation. **73**.

von Elm, E., D. G. Altman, M. Egger, S. J. Pocock, P. C. Gøtzsche and J. P. Vandenbroucke (2007). "The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies." Lancet **370**(9596): 1453-1457.

Wallemacq, P., V. W. Armstrong, M. Brunet, V. Haufroid, D. W. Holt, A. Johnston, D. Kuypers, Y. Le Meur, P. Marquet, M. Oellerich, E. Thervet, B. Toenshoff, N. Undre, L. T. Weber, I. S. Westley and M. Mourad (2009). "Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference." Ther Drug Monit **31**(2): 139-152.

Wallemacq PE, V. R. (2001). "Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients." Clin Pharmacokinet **40**(4): 283-295.

Wang, L., H. L. McLeod and R. M. Weinshilboum (2011). "Genomics and drug response." N Engl J Med **364**(12): 1144-1153.

Wang, Z., S. Wu, D. Chen, F. Guo, L. Zhong, J. Fan and Z. Peng (2014). "Influence of TLR4 rs1927907 locus polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics in the early stage after liver transplantation." Eur J Clin Pharmacol **70**(8): 925-931.

Webster AC, W. R., Taylor RS, et al. (2005). "Tacrolimus versus cyclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomized trial data.." Br Med J. **33**: 810-814.

Wei-lin, W., J. Jing, Z. Shu-sen, W. Li-hua, L. Ting-bo, Y. Song-feng and Y. Sheng (2006). "Tacrolimus dose requirement in relation to donor and recipient ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms in Chinese liver transplant patients." Liver Transpl **12**(5): 775-780.

Wilkinson, G. (1996). "Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism prediction of in vivo activity in humans." J Pharmacokinet Biopharm **24**(5): 475-490.

Xue, F., L. Han, Y. Chen, Z. Xi, Q. Li, N. Xu, Y. Xia, K. Streicher, J. Zhang and Q. Xia (2014). "CYP3A5 genotypes affect tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications in Chinese pediatric liver transplant patients." Pediatr Transplant **18**(2): 166-176.

Yu, S., L. Wu, J. Jin, S. Yan, G. Jiang, H. Xie and S. Zheng (2006). "Influence of CYP3A5 gene polymorphisms of donor rather than recipient to tacrolimus individual dose requirement in liver transplantation." Transplantation **81**(1): 46-51.

Zeger, S. L. and K. Y. Liang (1986). "Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes." Biometrics **42**(1): 121-130.

Zheng, H., A. Zeevi, E. Schuetz, J. Lamba, K. McCurry, B. P. Griffith, S. Webber, J. Ristich, J. Dauber, A. Iacono, W. Grgurich, D. Zaldonis, K. McDade, J. Zhang and G. J. Burckart (2004). "Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism." J Clin Pharmacol **44**(2): 135-140.

